

Aus der Klinik für Neonatologie, CCM  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Intrapulmonale Verteilung von Perfluorkarbon und Surfactant  
sowie deren Einfluss auf Lungenvolumen und Gasaustausch  
am ARDS-Modell neugeborener Ferkel

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Hartenstein

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Wauer  
2. Prof. Dr. med. E. Herting  
3. Prof. Dr. med. M. Rüdiger

Datum der Promotion: 19.03.2010

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>03</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>05</b>
1.1 Hintergrund der Studie.....	05
1.2 Pathophysiologische Grundlagen ARDS.....	06
1.3 Historischer Überblick Perfluorkarbon- und Surfactanttherapie.....	08
1.4 Eigenschaften der Perfluorkarbone (PFC).....	09
1.5 Formen der Flüssigkeitsbeatmung.....	09
1.5.1 Totale Flüssigkeitsbeatmung (TLV).....	09
1.5.2 Partielle Flüssigkeitsbeatmung (PLV).....	10
1.6 Detektion von intrapulmonal appliziertem PFC und Surfactant (S).....	10
1.6.1 Mikrosphären.....	10
1.6.2 Fluoreszenzmarkierung .....	11
1.7 Hypothesen.....	12
<b>2. Methodik.....</b>	<b>13</b>
2.1 Vorversuchsreihe.....	13
2.1.1 Fluoreszenzmarkierung des PFC mit Mikrosphären.....	13
2.1.2 Fluoreszenzmarkierung von PFC / S.....	14
2.1.2.1 Lösungseigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs (FF) in Aceton.....	16
2.1.2.2 Nachweis des FF im Lungengewebe.....	16
2.2 Hauptversuchsreihe (neonatales ARDS-Modell).....	18
2.2.1 Versuchstiere.....	18
2.2.2 Prämedikation und Präparation.....	18
2.2.3 Beatmung.....	19
2.2.4 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) / Lungenschädigung.....	20
2.2.5 Randomisierung der Gruppen.....	21
2.2.6 Zwei Therapiemodelle der Lungenschädigung (PFC vs. S).....	21
2.2.7 Versuchsprotokoll und Messmethoden.....	22
2.2.8 Präparation und Fixierung der Lungen.....	23
2.2.9 Topographische Gliederung der Lungen.....	24
2.2.10 Darstellung der intrapulmonalen FF-Verteilung.....	28

2.2.11	Totales Lungenvolumen.....	29
2.2.11.1	Berechnung totales Lungenvolumen.....	29
2.2.11.2	Berechnung Lungendichte.....	30
2.2.11.3	Berechnung Pulmonary Expansion Factor (PEF).....	30
2.3	Statistik.....	30
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1	Ergebnisse der Vorversuchsreihen.....	32
3.1.1	Fluoreszenzmarkierung des PFC mit Mikrosphären.....	32
3.1.2	Nachweis des FF in Aceton.....	33
3.1.3	Nachweis des FF im Lungengewebe.....	34
3.2	Ergebnisse der Hauptversuchsreihe.....	35
3.2.1	Darstellung der intrapulmonalen PFC- und S-Verteilung.....	35
3.2.1.1	3-dimensionales Würfelmodell der Lunge.....	35
3.2.1.2	Regionale Verteilung (ventral-dorsal).....	40
3.2.1.3	Regionale Verteilung (apikal-basal).....	43
3.2.2	Totales Lungenvolumen.....	44
3.2.2.1	Totales Lungenvolumen und Ratio.....	43
3.2.2.2	Lungendichte.....	44
3.2.2.3	Pulmonary Expansion Faktor (PEF).....	44
3.2.3	Gasaustausch.....	46
3.2.3.1	Ventilatory Efficacy Index (VEI).....	46
3.2.3.2	Oxygenation Index (OI).....	48
3.2.3.3	Arterio-endexpiratorische CO <sub>2</sub> -Differenz (P(a-et)CO <sub>2</sub> )...	49
3.2.4	Hämodynamik.....	51
3.2.4.1	Herzfrequenz (HF).....	51
3.2.4.2	Mittlerer arterieller Blutdruck (MBP).....	51
3.2.5	Sauerstoffsättigung (SaO <sub>2</sub> ), pH-Wert, Basenabweichung (BE).....	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>54</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Erklärung über Selbständigkeit.....</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>83</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>84</b>

## **1. Einleitung:**

### **1.1 Hintergrund der Studie:**

In dieser tierexperimentellen Studie an neugeborenen Ferkeln wurde der Einfluss von partieller Flüssigkeitsbeatmung (PLV) mit Perfluorkarbonen (PFC) auf Lungenmechanik und Gasaustausch nach induzierter Lungenschädigung<sup>(3)</sup> hin untersucht und mit der Applikation von exogenem Surfactant (S) verglichen. Durch die Erzeugung eines Surfactantmangels<sup>(3)</sup> zuvor gesunder Lungen, entsprach dieses Lungenschädigungsmodell dem akuten Atemnotsyndroms (acute respiratory distress syndrome, ARDS) beim Neugeborenen. Therapie der Wahl bei neonatalem Surfactantmangel war bislang die intrapulmonale Surfactantsubstitution<sup>(4-7)</sup>. In Studien konnte demgegenüber gezeigt werden, dass die Applikation von PFC bei schwerer respiratorischer Insuffizienz zu einer effektiven Verbesserung von Oxygenierung und Lungenmechanik führte<sup>(8-19)</sup>, ähnlich den Effekten exogener Surfactantsubstitution. Um die Auswirkungen von PFC auf Gasaustausch und Lungenmechanik im Vergleich zu S besser zu verstehen, stellte sich für uns die Frage nach der intrapulmonalen PFC-Verteilung.

Ziel dieser Studie war die hochauflösende räumliche Darstellung der intrapulmonalen PFC-Verteilung nach induzierter Lungenschädigung und Therapie für 240 Minuten, im Vergleich zur Surfactantsubstitution. Eine Verteilungsdarstellung von PFC gelang bisher entweder durch bildgebende<sup>(17;20-24)</sup> oder histologische Verfahren<sup>(12;25-30)</sup>, wobei sich PFC in Röntgen- und CT-Untersuchungen der Lunge durch ihrer speziellen physikochemischen Eigenschaften wie Kontrastmittel darstellten. Röntgenaufnahmen sind zwar klinisch einfach durchführbar, lieferten jedoch nur eine 2-dimensionale Aussage über die intrapulmonale Verteilung. Im Vergleich dazu zeigten CT-Untersuchungen ein eher inhomogenes Verteilungsmuster der PFC<sup>(31)</sup> mit bevorzugter Anreicherung in den abhängigen (dorsobasalen) Bereichen der Lunge<sup>(32)</sup>. Histologische Untersuchungen verdeutlichten die Therapieeffekte von PFC auf zellulärer Ebene, lediglich innerhalb einzelner Lungenbereiche<sup>(12;25;26;33-36)</sup>.

Bisher gab es kein geeignetes Verfahren, das einen direkten Vergleich der räumlichen Verteilung von intrapulmonal appliziertem PFC bzw. Surfactant ermöglichte. Altemeier und Glenn et al.<sup>(37)</sup> führten Untersuchungen an erwachsenen Schweinen zur Darstellung der regionalen Ventilation innerhalb der Lunge mit als Aerosol applizierten fluoreszierenden Mikrosphären durch. Nach 3-dimensionaler Lungenrekonstruktion in

einem Würfelmodell und anschließenden Fluoreszenzmessungen der Mikrosphären in jedem Würfel gelang dort eine 3-dimensionale, hochauflösende Darstellung der räumlichen Mikrosphärenverteilung innerhalb der Lunge. In Anlehnung an diese Arbeit sahen wir die Möglichkeit zur Erstellung einer hochauflösenden Verteilungsdarstellung von PFC und S in unserem Lungenschädigungsmodell neugeborener und surfactantdepletierter Ferkel.

Durch direkte Fluoreszenzmarkierung von PFC und Surfactant mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FF), wurden beide Substanzen als Carrier für den FF verwendet. Folglich repräsentierte die regionale Verteilung des FF auch die regionale Verteilung des entsprechenden Carriers (PFC bzw. S). Somit wird es durch die direkte Markierung von PFC und Surfactant mit einem FF erstmals möglich, die intrapulmonale Verteilung beider Substanzen innerhalb der gesamten Lunge darzustellen und miteinander zu vergleichen. Über die Möglichkeiten der direkten Fluoreszenzmarkierung von PFC und S durch einen FF gab es jedoch bisher keine Literaturangaben.

Neben dem Vergleich der räumlichen regionalen Verteilung von PFC und Surfactant nach induzierter Lungenschädigung wurde anhand unseres Lungenmodells zudem der Einfluss beider Substanzen auf das totale Lungenvolumen, die Lungengewebsdichte, den Gasaustausch und die Hämodynamik untersucht und miteinander verglichen.

## **1.2 Pathophysiologische Grundlagen ARDS:**

In der Veröffentlichung der American-European Consensus Conference on ARDS von 1994 wurde das ARDS („acute respiratory distress syndrome“) als akute Gasaustauschstörung definiert, einhergehend mit bilateralen Infiltraten im Röntgenthoraxbild und fehlender linksatrialer Hypertension (pulmonalkapillärer Verschlussdruck  $\leq 18$  mmHg). Beim ARDS liegt der Quotient zwischen arteriellem Sauerstoffpartialdruck (paO<sub>2</sub>) und der fraktionellen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO<sub>2</sub>) =  $paO_2/FiO_2 \leq 200$ . Davon abzugrenzen ist die akute Lungenschädigung (ALI, acute lung injury), die unter Erfüllung der ARDS-Kriterien durch einen Quotienten  $paO_2/FiO_2 \leq 300$  definiert ist<sup>(38)</sup>. Die Entstehung eines ARDS erfolgt zumeist durch eine schwere Infektion<sup>(39)</sup>, mit Schädigung der alveolo-kapillären Schranke und Entwicklung eines Lungenödems. Durch Plasmaproteinaustritt kommt es zur Schädigung des Surfactantsystems der zuvor gesunden Lunge (Surfactantdysfunktion)<sup>(40-42)</sup>. Dies führt zu einer Änderung der alveolären Ventilation

mit Ausbildung einer inhomogenen Belüftungssituation innerhalb der Lunge, mit Atelektasenbildung vorrangig in den „abhängigen“ (dorsobasalen) Lungenbereichen (<sup>43-45</sup>). Die hypoxiebedingte Widerstandserhöhung der Lungengefäße führt zu einer Änderung der pulmonalen Durchblutung. Die zusätzliche Perfusion minderbelüfteter Lungenbereiche führt zur Ausbildung intrapulmonaler Rechts-Links-Shunts, mit zusätzlicher Verschlechterung des Gasaustauschs.

Vom ARDS ist das neonatale Atemnotsyndrom (RDS, „respiratory distress syndrome“) zu unterscheiden, das aufgrund eines primären Surfactantmangels der morphologisch und funktionell unreifen Lunge typischerweise im Frühgeborenenalter entsteht. Hier ist die Bildung von endogenem Surfactant durch Pneumozyten (Typ II) vermindert, wobei die Inzidenz des RDS mit zunehmender Unreife der Patienten steigt. Der Mangel an Surfactant führt zu einer Erhöhung der Oberflächenspannung an der Gasaustauschfläche der Alveolen. Dies bewirkt einen Kollaps der Alveolen (Atelektasenbildung) mit Hypoxie und Verschlechterung des Gasaustauschs. Um dem entgegenzuwirken ist zumeist eine künstliche Beatmung mit hohen Beatmungsdrücken erforderlich. Dies kann zu einer mechanischen Schädigung der Alveolarmembran durch Scherkräfte für das empfindliche und noch unreife Lungengewebe führen (<sup>46</sup>). Diese hohen Beatmungsdrücke sind häufig – zumindest kurzfristig – auch dann erforderlich, wenn exogenes Surfactant substituiert wird. Es kommt zum Austritt von Plasmaproteinen und Exsudat in Alveolarraum und Lungeninterstitium und dadurch zur Ausbildung hyaliner Membranen. Inflammatorische Reaktionen und das proteinreiche Exsudat bewirken eine zusätzliche Inaktivierung von Surfactant (Circulus vitiosus). Die hypoxiebedingte Widerstandserhöhung der Lungengefäße führt ebenfalls zu einer Änderung der pulmonalen Durchblutung.

Lachmann et al entwickelte im Tierversuch an erwachsenen Schweinen, wo durch repetitive bronchoalveoläre Lavage ein Lungenschädigungsmodell durch Surfactantdepletion erzeugt wurde, welches elektronenmikroskopisch und histologisch ähnliche Gewebeveränderungen wie beim ARDS zeigte (<sup>3</sup>). Im Vergleich dazu entsprach unser Lungenschädigungsmodell durch bronchoalveoläre Lavage bei neugeborenen Ferkeln am ehesten einem ARDS beim Neugeborenen.

### 1.3 Historischer Überblick Perfluorkarbon- und Surfactanttherapie:

Seit Kylstra et al. 1962 die Durchführbarkeit einer Flüssigkeitsbeatmung (LV) mit hyperbar oxygenierter Kochsalzlösung demonstrierte (<sup>47</sup>), folgten weitere Studien mit LV bei respiratorischer Insuffizienz im Rahmen einer akuten Lungenschädigung. 1966 demonstrierte Clark et al., dass LV mit PFC an Säugetieren ohne Zeichen mangelnder Gewebeoxygenierung durchführbar war (<sup>48</sup>), was die Eignung der PFC für den Einsatz als alveolären O<sub>2</sub>-Träger bewies (<sup>49;50</sup>). Nach dieser Pionierarbeit folgten weitere Untersuchungen, mit Auswirkungen der LV u.a. auf Gasaustausch, Lungenperfusion und Lungenmechanik (<sup>24;31;51-59</sup>), sowohl bei gesunden (<sup>60;61</sup>), als auch bei unreifen frühgeborenen Tieren und nach induzierter Lungenschädigung (<sup>8;9;14;16</sup>). Dies bildete die Grundlage für erste klinische Studien (Phase I/II-Studien) mit Anwendung der partiellen Flüssigkeitsbeatmung (PLV) an neonatologischen, pädiatrischen und erwachsenen Patienten (<sup>17-19</sup>).

Auf eine ausführliche Zusammenstellung über die Historie der Surfactanttherapie sei auf die Reviews von Obladen und Halliday verwiesen (<sup>4;5</sup>). 1959 zeigten Avery und Mead den Zusammenhang zwischen Surfactantmangel und Ausbildung hyaliner Membranen bei RDS frühgeborener Kinder (<sup>62</sup>). 20 Jahre später konnte Fujiwara bei Frühgeborenen mit RDS die positiven Effekte auf die Oxygenierung nach Applikation von exogenem Surfactant zeigen (<sup>6</sup>). Weitere Studien demonstrierten u.a. eine Senkung von Mortalität, Hirnblutungen, interstitielles Emphysem und Pneumothoraces (<sup>63</sup>). Entsprechend beeinflusste die Surfactanttherapie die klinische Tätigkeit des Neonatologen in den letzten 25 Jahren maßgeblich und wurde zum Therapiestandard des Atemnotsyndroms frühgeborener Kinder (<sup>7</sup>), wobei weitere Studien mit Schwerpunkt Therapieindikation, Stellenwert synthetischer Surfactantpräparate sowie die Möglichkeit nicht-invasiver Applikationsmethoden folgen werden (<sup>5;7</sup>).

### 1.4 Eigenschaften der Perfluorkarbonate (PFC):

PFC gehören in die Gruppe der Organofluoride (Summenformel C<sub>n</sub>F<sub>n</sub>). Sie sind flüssig, farb- und geruchlos, inert, haben eine geringe kinematische Viskosität und eine niedrige Oberflächenspannung (<sup>34</sup>). Sie besitzen eine hohe Kapazität, Sauerstoff und Kohlendioxid in Lösung zu bringen und in gelöster Form zu transportieren (Tab. 1). Ihre hohe Dichte führt innerhalb der Lunge zu einer schwerkraftabhängigen Verteilung,



wobei die Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht minimiert wird. Durch die speziellen physikochemischen und teilweise auch surfactantähnlichen Eigenschaften der PFC kann eine Verbesserung der Oxygenierung, der Atemmechanik und der Homogenität der Lungenbelüftung erzielt werden <sup>(64)</sup>. Minderbelüftete Areale der Lunge werden dem Gasaustausch wieder zugänglich gemacht, die funktionelle Residualkapazität (FRC) der Lunge kann stabilisiert und ein zuvor entstandener Rechts-Links-Shunt verringert werden. Aufgrund ihres niedrigen Dampfdrucks erfolgt die Eliminierung von PFC aus den Lungen durch Evaporation <sup>(46;65;66)</sup>, nur ein minimaler Anteil wird vom Organismus aufgenommen (retikuloendotheliales System) und kann in geringer Konzentration nach PLV im Blut gemessen werden <sup>(67)</sup>. PFC verringern zudem durch oxidativen Stress hervorgerufene Zellschäden <sup>(33;68;69)</sup> und wirken auf immunkompetente Zellen durch einen antiinflammatorischen Effekt protektiv.

physikalische Eigenschaften	NaCl 0.9%	PFOB (C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> Br)	PF5080 (C <sub>8</sub> F <sub>18</sub> )
Dichte, 25 °C (g/ml)	1,0	1,93	1,77
Dampfdruck, 37 °C (torr)	47	11	64
Kinematische Viskosität, 25 °C (mPa·s)	1,0	1.10	1,4
Oberflächenspannung, 25 °C (mN·m <sup>-1</sup> )	72	18	15
O <sub>2</sub> -Löslichkeit, 37°C (ml Gas in 100ml Lsg.)	3	53	53
CO <sub>2</sub> -Löslichkeit, 37°C (ml Gas in 100ml Lsg.)	57	210	160

Tab. 1: Vergleich der physikalischen Eigenschaften von 0.9%iger Kochsalzlösung gegenüber C<sub>8</sub>F<sub>18</sub> (PF5080, 3M Neuss, Germany) und C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>Br (PFOB, Perflubron, Alliance Pharmaceutical Corp.) <sup>(1;2)</sup>

## 1.5 Formen der Flüssigkeitsbeatmung:

### 1.5.1 Total liquid ventilation (TLV):

Bei der TLV zirkuliert das PFC im Unterschied zur PLV in einem geschlossenen, speziellen Beatmungssystem („Liquidventilator“). Ein eingestelltes Atemzugvolumen von vollständig oxygeniertem PFC wird in der Inspirationsphase insuffliert („PFC-Atemzug“), die anschließende Flüssigkeitsdrainage in der Expirationsphase (Kohlendioxidabgabe) erfolgt passiv. Hierbei wird sowohl das Atemzugvolumen als auch die funktionelle Residualkapazität durch PFC ersetzt <sup>(46)</sup>.

### **1.5.2 Partial liquid ventilation (PLV):**

Fuhrmann et al. demonstrierte 1991 eine Methode, PFC ohne den großen apparativen Aufwand der TLV (siehe 1.5.1) intrapulmonal zu applizieren (Perfluorocarbon-associated gas exchange - PAGE) <sup>(70)</sup>. Diese Methode etablierte sich später unter dem Namen „Partial liquid ventilation“ (PLV) und ermöglichte den Durchbruch für eine Vielzahl weiterer Studien mit PFC <sup>(8-15;23;71)</sup>. PLV stellt die Anwendung einer konventionellen maschinellen Beatmung dar, wobei zusätzlich PFC tracheal appliziert und somit klinisch einfach durchführbar wird. Die Suche nach einem optimalen Beatmungsschema in der Anwendung der PLV <sup>(46;72-74)</sup> war Gegenstand vieler Studien. Ebenso die Frage der zu applizierenden Flüssigkeitsmenge (PFC) sowie der Instillationstechnik (über einen speziellen Sideport am Tubusansatzstück oder als Bolus intratracheal <sup>(16;46;75)</sup>). Ersteres hatte den Vorteil, dass es zu keiner Dekonnektion vom Beatmungsgerät mit Verlust des positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP) kam. Mögliche Komplikationen unter PLV traten auf in Form von transienten Hypoxämien, Liquothoraces (Eindringen von PFC in den Pleuraspalt) und Tubusverlegungen durch Tracheobronchialsekret und Mukus <sup>(17)</sup>. Die Umstellung der PLV auf konventionelle Beatmung wurde sowohl in Tierversuchen, als auch beim Menschen toleriert <sup>(17;76)</sup>.

## **1.6 Detektion von intrapulmonal appliziertem PFC und S:**

### **1.6.1 Mikrosphären:**

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Mikrosphären ist eine etablierte Methode, um Perfusionsänderungen innerhalb der Lunge nach deren Applikation in die Blutbahn darzustellen <sup>(37;77;78)</sup>. Zudem besteht die Möglichkeit, fluoreszenzmarkierte Mikrosphären als Aerosol intrapulmonal zu applizieren und somit Belüftungszustände der Lunge sowohl in hochauflösenden Verteilungsdarstellungen <sup>(37)</sup> als auch in histologischen Schnittbildern darzustellen <sup>(77)</sup>. Aber nicht nur Mikrosphären, auch PFC wurde bereits via Aerosol intrapulmonal appliziert <sup>(79;80)</sup>.

Aufgrund der dargelegten Möglichkeiten zur Darstellung von Ventilations- und Perfusionsänderungen innerhalb der Lunge, wurde im Rahmen unserer Studie versucht, PFC mit fluoreszierenden Mikrosphären zu markieren, und zur Darstellung der räumlichen Verteilung von PFC innerhalb der Lunge zu verwenden. Bisher lagen keine

Literaturangaben vor, mit Mikrosphären fluoreszenzmarkiertes PFC direkt (als Bolus) oder als Aerosol intrapulmonal zu applizieren und nachzuweisen. Der in unserer Studie durchgeführte Versuch einer direkten PFC-Markierung durch fluoreszierende Mikrosphären fand jedoch aufgrund inhomogener Lösungseigenschaften der bei uns verwendeten Mikrosphären (in vitro) nicht für einen Einsatz in vivo (tierexperimentell) Verwendung (siehe 2.1.1, 3.1.1).

### **1.6.2 Fluoreszenzmarkierung:**

Ventilation und Perfusion der Lungen haben jeweils einen Einfluss auf den Gasaustausch. In bisherigen Studien fehlte jedoch die Möglichkeit, die intrapulmonale Verteilung von PFC und S miteinander zu vergleichen und in einem neugeborenen Lungenschädigungsmodell räumlich darstellen zu können. In der hier verwendeten Methode der Fluoreszenzmarkierung von PFC und S mit einem FF in seiner Reinform (siehe 2.1.1), dienten beide Substanzen als „Carrier“ für den gelösten FF. Entsprechend konnte nach ihrer intrapulmonalen Applikation von einer simultanen Ausbreitung von PFC / S und dem FF ausgegangen werden. Durch spezielle Präparation der Lungen nach 240 Minuten Therapie wurden die Carriersubstanzen innerhalb der Lunge fixiert (siehe 2.2.8). Das Schneiden der Lungen in kleine Würfel ermöglichte die spätere Rekonstruktion der Lungen in einem 3-dimensional rekonstruierten Würfelmodell (siehe 2.2.9). Innerhalb jedes Lungenwürfels wurde die Fluoreszenzintensität (INT) des FF gemessen. Die Höhe der INT spiegelte indirekt die Menge an Carriersubstanz (PFC, S) wieder und ermöglichte somit den Vergleich in ihrer intrapulmonalen räumlichen Verteilung.

Durch das kleine Schnittmaß der Lungenwürfel ergab das Zerschneiden der Lungen jeweils eine hohe Anzahl an Lungenwürfeln, entsprechend konnte eine hohe Auflösung in der Darstellung der regionalen Verteilung von PFC und S erzielt werden.

## 1.7 Hypothesen:

Unsere Hypothesen waren,

- 1) Die direkte Fluoreszenzmarkierung von PFC und S (Carrier) mit einem Fluoreszenzfarbstoff ist möglich und zur Darstellung der intrapulmonalen Verteilung beider Carriersubstanzen geeignet.
  
- 2) Die Aufarbeitung der Lungen in unserem 3-dimensionalem Würfelmodell ist eine geeignete Methode zur hochauflösenden Darstellung der regionalen intrapulmonalen Verteilung von fluoreszenzmarkiertem PFC und S.
  
- 3) In unserem Lungenschädigungsmodell führt die Applikation von PFC zu einer bevorzugten Anreicherung in abhängigen Lungenregionen und zu einem größeren Lungenvolumen im Vergleich zu Surfactantsubstitution.

## **2. Methodik:**

Ein Studienziel war die Darstellung der intrapulmonalen Verteilung von PFC und S am ARDS-Modell neugeborener Ferkel durch Fluoreszenzmarkierung beider Substanzen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FF). Nach Therapie der experimentell induzierten Lungenschädigung für 240 Minuten Dauer erfolgte die Extraktion, Fixierung und Präparation der Lungen (siehe 2.2.8). Dabei wurden die Lungen jeweils standardisiert in Würfel geschnitten und nach räumlicher Zuordnung in einem 3-dimensionalen Koordinatensystem rekonstruiert (siehe 2.2.9). Neben der therapeutischen Anwendung von PFC und S, dienten beide Substanzen als Carrier für den gelösten FF Yellowgreen (YG). Der Nachweis des FF erfolgte wiederum durch spektrometrische Messung seiner Fluoreszenzintensität (INT) innerhalb jedes Lungenwürfels, wobei die Höhe der gemessenen INT indirekt die Menge an Carriersubstanz (PFC, S) widerspiegelte. Entsprechend ermöglichte die 3-dimensionale Rekonstruktion mit Darstellung der gemessenen INT eine Aussage über die räumliche Verteilung PFC und S innerhalb der Lungen.

Hierzu waren jedoch verschiedene „vorbereitende“ Arbeitsschritte erforderlich. Anhand der im Folgenden dargestellten Vorversuchsreihen sollte die Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung beider Substanzen (PFC und S) mit dem verwendeten FF (YG) überprüft werden.

### **2.1 Vorversuchsreihe:**

#### ***2.1.1 Fluoreszenzmarkierung des PFC mit Mikrosphären:***

Im Vorfeld sollte ebenfalls die Möglichkeit überprüft werden, ob eine direkte Fluoreszenzmarkierung von PFC durch fluoreszierende Mikrosphären möglich war, was anhand von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (in vitro) erfolgte. Hierzu wurden jeweils 2mg zwei verschiedener Mikrosphären (SiO<sub>2</sub>RITC7(C<sub>18</sub>) und MF-RhB-B183; microparticles® GmbH, Größe 1µm) sowohl in einem PFC-Gemisch (0,5ml Perfluooctylbromid, 4,5ml Perfluoroctan) als auch in 5ml Perfluooctylbromid, beziehungsweise 5ml Perfluoroctan, gelöst. Um zu überprüfen, ob die Mikrosphären im PFC homogene Lösungseigenschaften aufwiesen, wurde nach Vortexen jeweils 15µl der insgesamt 6 Proben zur licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung in

eine Bürker-Zählkammer pipettiert. Der Aufbau der Zählkammer durch ein Raster sollte eine optische Aussage über die Verteilung der Mikrosphären im PFC innerhalb der Zählkammer ermöglichen. Im Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RA) stellte sich unter 100-facher Vergrößerung pro Gesichtsfeld ein Quadrat (1x1mm, Abb. 1a) dar. Die Bilder wurden über ein Digitalkamera-System (Digital Kamera Leica DC200) auf einen Computer übertragen. Nach jedem Mikroskopievorgang wurde die Zählkammer gereinigt. Hier zeigte in wiederholt durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Kontrollen die Kombination aus Ethanol (70%) und Wasser mit abschließender Säuberung der Kammer mit einem fusselreien Tuch keine fluoreszierenden Rückstände von Mikrosphären (Abb. 1b).

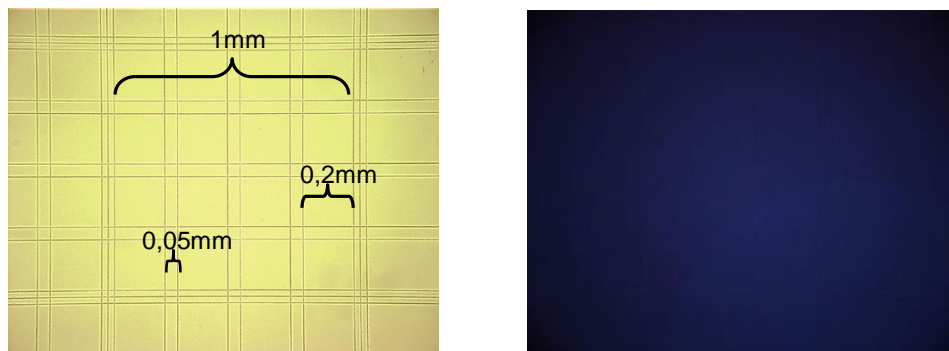


Abb. 1a: Darstellung des Gesichtsfeldes (Quadrat 1x1mm) der Bürker-Zählkammer unter 100-facher Vergrößerung. Die Zählkammer hat eine Tiefe von 0,1mm und besteht aus jeweils 9 quadratischen Feldern (3x3 Quadrate), wobei jedes Quadrat eine Kantenlänge von 1mm aufweist. Jedes dieser 9 Quadrate besteht wiederum aus jeweils 16 kleineren Quadraten mit einer Kantenlänge von 0,2mm. Abb. 1b: Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle nach Reinigung der Zählkammer in Anschluss an jeden Mikroskopievorgang. Die Reinigung erfolgte mit Ethanol (70%) und Wasser sowie Anwendung eines fusselreien Tuchs, um die Mikrosphären und eventuelle Schmutzpartikel aus der Kammer zu entfernen. Gegenüber anderen Reinigungsmöglichkeiten zeigten sich bei dieser Methode keine fluoreszierenden Rückstände von Mikrosphären innerhalb der Zählkammer.

### **2.1.2 Fluoreszenzmarkierung von PFC / S:**

Vor der intrapulmonalen Anwendung (in vivo) wurden sowohl das PFC als auch das S fluoreszenzmarkiert (in vitro). Der FF YG (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene, Fa. FEW Chemicals) wurde zu PFC hinzugegeben, bis sein Lösungsmaximum überschritten war und ungelöste FF-Bestandteile sichtbar wurden.

Anschließend wurde für 10 min gevortext und auf 37°C erhitzt. Der verbleibende FF-Überstand wurde dann durch ein Filterpapier abfiltriert, so dass unter Schwarzlichtkontrolle eine optisch homogene Lösung ohne Farbstoffüberstände entstand.

In unserer Studie verwendeten wir ein PFC-Gemisch aus Perfluorooctylbromid ( $C_8F_{17}Br$ , PFOB, ABCR Germany) und Perfluorooctan ( $C_8F_{18}$ , PF5080, 3M Neuss Germany) im Verhältnis 1:10.

Die Fluoreszenzmarkierung des exogenen S (Curosurf®) erfolgte ebenfalls durch Zugabe des FF YG (100 µg + 0,3 ml NaCl 0.9%) zu 1,2 ml S, wobei der hier verwendete FF zusätzlich Lipidanteile enthielt (2-(4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Fa. Molecular Probes Europe B.V.). Anschließender Durchmischung (10 min Vortexen) und makroskopische Kontrolle der entstandenen Lösung unter Schwarzlicht.

Nach Fluoreszenzmarkierung beider Carriersubstanzen (PFC, S) sollte der zuvor intrapulmonal applizierte FF durch Messung seiner Fluoreszenzintensität (INT) in seiner räumlichen Verteilung nachgewiesen werden. Hierzu war es erforderlich, nach Fixierung und Zerschneiden der Lungen (siehe 2.2.8, 2.2.9), den FF aus jedem Lungenwürfel (LC) zu extrahieren um somit seine INT spektrometrisch messen zu können. Jeder LC wurde für einen Zeitraum von 96h in 1,8 ml Aceton ( $C_3H_6O$ ) eingelegt (FF-Aceton-Lösung), um den FF aus dem Lungengewebe wieder in Lösung zu bringen. Zur Messung der INT wurden von der FF-Aceton-Lösung jeweils 1 ml in eine Küvette (Semi Micro-Cell Quarzglas-Küvette 1,4ml Part No B0631118, Perkin-Elmer Instruments, Uitslag / Leveringen) pipettiert. Die Geräteeinstellung (Fluoreszenzspektrometer LS50, Fa. Perkin Elmer, Software FL Winlab 4.0, Fa. Perkin Elmer) war bei jeder Messung identisch, die optimalen Extinktions- und Emissionswellenlängenbereiche für den FF lagen nach Herstellerangaben und Überprüfung in mehreren Testdurchläufen bei  $Ex = 493 \text{ nm}$  (Extinktionsmaximum) und  $Em = 505 \text{ nm}$  (Emissionsmaximum) (<sup>78</sup>). Die untere Grenze der Messgenauigkeit wurde geräteabhängig bei einer  $INT \geq 10$  festgelegt. Die Reinigung der Küvette erfolgte durch Ausspülen mit Aceton, nachdem wiederholte Kontrollmessungen nach dem Reinigungsvorgang mit reiner Acetonlösung keine fluoreszierenden Messrückstände mehr zeigten.

### **2.1.2.1 Lösungseigenschaften des FF in Aceton:**

Da bisher keine Ergebnisse über das Lösungsverhalten des hier verwendeten FF in Aceton vorlagen, sollte in dieser ersten Vorversuchsreihe überprüft werden, ob der FF nach Zugabe zu Aceton stabile Lösungseigenschaften aufwies. Hierzu wurden 6 Verdünnungsreihen erstellt und die jeweilige INT gemessen (siehe 3.1.2). 1000µg FF wurden in 1ml Aceton gelöst (Stammlösung) und nach Messung der INT bis in den Messbereich des Fluoreszenzspektrometers (INT <1000) verdünnt. Dies entsprach einer Verdünnung der Stammlösung von 1:200000, bzw. einer Konzentration des FF von 0,005µg/ml. Weitere Verdünnungsschritte (Verhältnis 1:2) sollten eine Aussage über die Stabilität der Lösungseigenschaften des FF in Aceton ermöglichen (siehe 3.1.2).

### **2.1.2.2 Nachweis des FF im Lungengewebe:**

Die zweite Vorversuchsreihe diente dem Nachweis, ob Aceton ebenfalls in der Lage ist, den FF aus den gefriergetrocknetem Lungengewebewürfeln in Lösung zu bringen. Hierzu wurde fluoreszenzmarkiertes PFC (siehe 2.1.2) bei 10 zuvor getöteten Wistar-Ratten (MW 315g) intratracheal appliziert. Aufgrund der gezielten Fragestellung nach den Lösungseigenschaften des Acetons, stellte diese Vorversuchsreihe jedoch ein vereinfachtes Modell gegenüber der späteren Hauptversuchsreihe dar. Durch einen medialen Abdominalschnitt entlang des Rippenbogens wurde das Zwerchfell als Zugangsweg zum Thoraxraum eröffnet und nach zusätzlicher Sternotomie die „en bloc“-Entnahme von Herz und Lungen (inklusive Trachea) durchgeführt. Nach Einführen einer modifizierten Kanüle (mit Adapter für ein Beatmungssystem) in die Luftröhre, wurden die Lungen in physiologischer Kochsalzlösung in Rückenlage schwimmend maschinell beatmet (Modus CMV, PIP 12 cmH<sub>2</sub>O, PEEP 2 cmH<sub>2</sub>O, f 30/min; Bourns BP200; BP2001, Bear Medical Systems, Riverside, CA). PFC wurde als Bolus (5ml/kg) intratracheal appliziert und partielle Flüssigkeitsbeatmung (PLV) nach Anpassung der Beatmungseinstellung (MW Pip 17 cmH<sub>2</sub>O, PEEP 4 cmH<sub>2</sub>O) für weitere 10 min (MW) durchgeführt. Unter kontinuierlicher Insufflation eines PEEP entsprechend dem Pip (MW 17 cmH<sub>2</sub>O) erfolgte das Einfrieren der Lungen in flüssigem Stickstoff mit anschließender endgültiger Fixierung durch Gefriertrocknung (siehe 2.2.8). Die gefriergetrockneten Lungen wurden schematisch mit einem anatomischen Präparationsmesser in Lungengewebewürfel (LC) zerschnitten (n = 12 LC/Tier):



Bei den in Rückenlage befindlichen Lungen erfolgte nach Entfernung des Herzens zuerst die Trennung in rechte und linke Lunge durch mediane Schnittführung. Anschließend wurde jede Lunge durch quere Schnittführung in einen apikalen (Lungenoberfeld) und basalen (Lungenunterfeld) Anteil getrennt. Jeder der 4 entstandenen Würfel wurde durch horizontale Schnittführung nochmals in 3 Schichten unterteilt (ventral, medial, dorsal), so dass am Ende 12 Lungenwürfel pro Lunge verblieben (Abb. 2).

Jeder einzelne Lungenwürfel wurde auf einer elektronischen Feinwaage (siehe 2.2.9) gewogen und für 96h in 1,8ml Aceton eingelegt, um den in den Lungenwürfeln fixierten FF wieder in Lösung zu bringen (siehe 2.1.2) und anschließend die INT fluoreszenzspektrometrisch zu messen. In zweiter Linie sollte die INT innerhalb der Lunge verglichen werden. Um dies zu ermöglichen, wurde der Quotient (Q) aus INT und jeweiligem Würfelgewicht gebildet. Q war somit von den unterschiedlichen Gewichten der LC unabhängig.

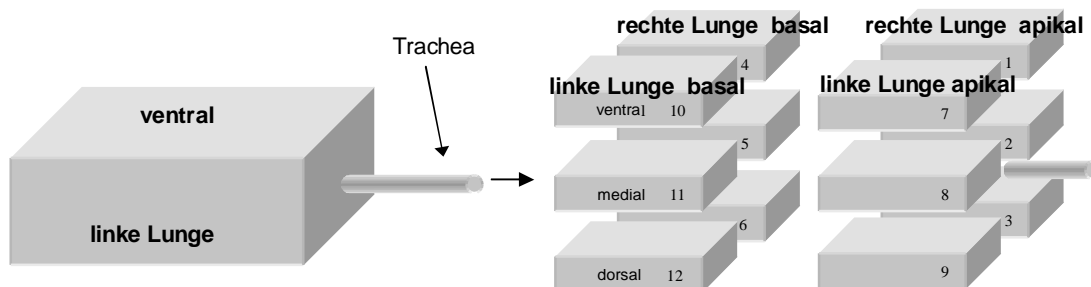


Abb. 2: Schematische Darstellung des Schneidevorgangs der gefriergetrockneten Lungen in Lungengewebewürfel (LC). Die in Rückenlage positionierten Lungen wurden durch einen medianen Schnitt und Entfernen des Herzens in rechte und linke Lunge aufgeteilt. Anschließend erfolgte eine weitere Trennung jeder Lunge jeweils in Oberfeld (apikal) und Unterfeld (basal). Die Endgültige Auftrennung in die insgesamt 12 LC jeder Lunge wurde durch horizontale Schnittführung der jeweiligen apikalen und basalen Lungenabschnitte von ventral über medial nach dorsal erzielt.

## **2.2 Hauptversuchsreihe (neonatales ARDS-Modell):**

### **2.2.1 Versuchstiere:**

Die im Folgenden beschriebene tierexperimentelle Versuchsreihe fand nach Genehmigung durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (G 0009/2000) statt und wurde an einer tierexperimentellen Versuchseinrichtung der Medizinischen Fakultät der Charité (Universitätsmedizin) in Berlin durchgeführt. Die tierpflegerische Betreuung erfolgte in Übereinstimmung mit dem deutschen Gesetz für Tierschutz. An der Studie nahmen 16 neugeborene Ferkel mit einem Lebensalter < 12 Stunden und einem Gewicht von  $678\text{g} \pm 156$  ( $435\text{g} - 960\text{g}$ ) teil. Ein Tier verstarb während der experimentell erzeugten Surfactantdepletion durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) und ging daher nicht in die Auswertung mit ein.

### **2.2.2 Prämedikation und Präparation:**

Alle Ferkel wurden gewogen und erhielten zur Narkoseeinleitung intramuskulär eine Kombination aus Azaperon (8mg/kg), Ketamin (10mg/kg) und Fentanyl (10µg/kg). Nach Punktion der Vena jugularis externa wurde ein mehrlumiger zentraler Venenkatheter (4 Ch.) platziert. Darüber erhielten die Tiere eine Dauerinfusion zur Analgosedierung und Relaxierung, bestehend aus Jonosteril Päd II-Infusionslösung (74ml/kg), Glukose 40% (6ml/kg), Pancuronium (1ml), Ketamin (10mg/kg) und Midazolam (0,8ml/kg). Zur Aufrechterhaltung stabiler Kreislaufverhältnisse wurde zusätzlich Thomajonin-Lösung (5ml/kg) infundiert. Die maschinelle Beatmung wurde nach Tracheotomie mit einem ungeblockten Endotrachealtubus (3,5mm ID, Vygon, Ecoen, France) begonnen (siehe 2.2.3), zur Vermeidung eines Tubuslecks erfolgte eine peritracheale Ligation des Tubus. Die korrekte Tubuslage wurde durch Auskultation und anschließende etCO<sub>2</sub>-Messung überprüft, wobei der Infrarotsensor (CO<sub>2</sub>SMO Plus Neonatal Sensor CAPNOSTAT® CO<sub>2</sub> Sensor) des CO<sub>2</sub>SMO Plus-Monitor (Novamatrix Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) zwischen dem Tubusansatzstück und dem Y-Stück des Beatmungssystems angebracht wurde. Als Zugangsweg für arterielle Blutentnahmen und invasive Blutdruckmessung wurde die Nabelarterie (3,5 Ch.) kanüliert und nach Anschluss an den arteriellen Druckabnehmer kontinuierlich mit einer Heparin-Infusion

(500 I.E. Heparin ad 50ml NaCl 0.9%, 2ml/h) gespült. Die Überwachung der Vitalparameter (HF, MBP, SaO<sub>2</sub>, Temperatur) erfolgte nach Anlage von EKG-Elektroden, Sättigungssensor und peripherer Temperatursonde durch ein Monitoring-System (Servo SMV 178 Monitor, Hellige, Germany). Der Urin wurde kontinuierlich über einen suprapubischen Blasenkatheter abgeleitet. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer beheizbaren Unterlage innerhalb eines Inkubators fixiert (siehe Abb. 3), um die Körpertemperatur kontinuierlich in einem Bereich von 36–37°C zu halten (MW 36,3°C).

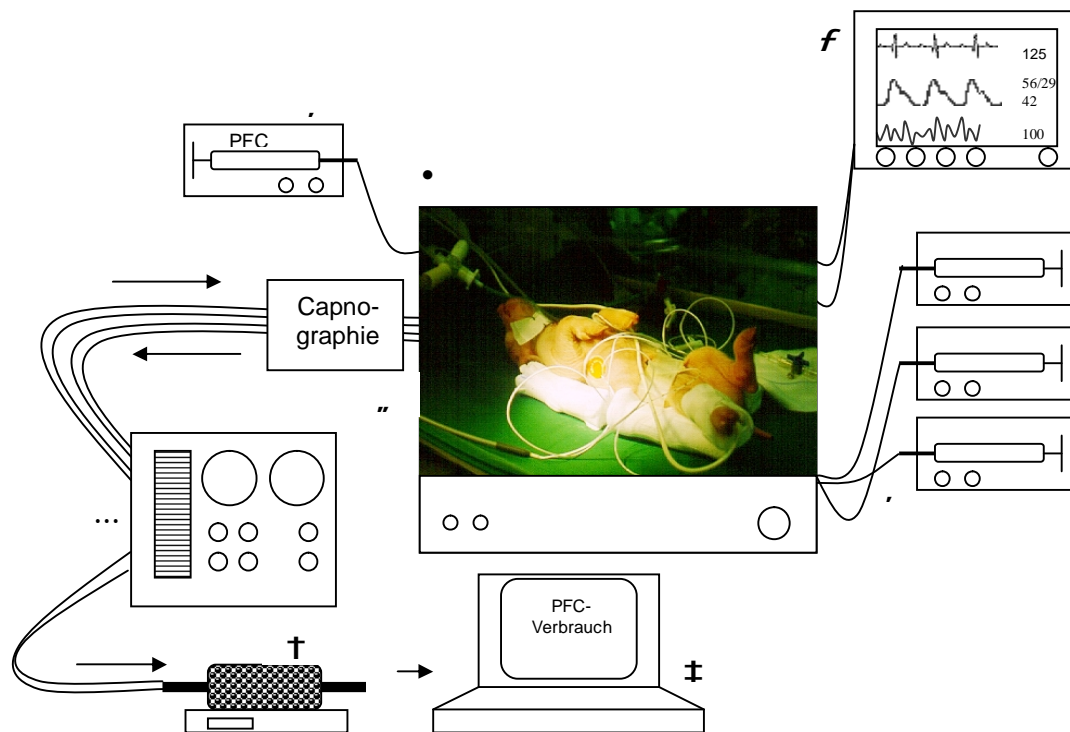


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: • Inkubator, , Perfusorspritzen, *f* Monitoring-System, „ Capnographie-Messung, ... Beatmungsgerät, † elektronische Feinwaage mit Zeolite-Filtersystem, ‡ PC zur Messdatenerfassung.

### 2.2.3 Beatmung:

Nach Durchführung der Tracheotomie wurden zunächst alle Tiere standardisiert druckkontrolliert beatmet (Bourns BP200; BP2001, Bear Medical Systems, Riverside, CA): Spitzendruck (Pip) 10 cmH<sub>2</sub>O, positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) 2 cmH<sub>2</sub>O, Atemfrequenz (AF) 30/min (Inspirationszeit 0,4 sec, Expirationszeit 1,6 sec) und FiO<sub>2</sub> 0.21. Zusätzlich erfolgte eine capnographische CO<sub>2</sub>-Messung (etCO<sub>2</sub>) mit Hilfe des

CO2SMO Plus-Monitor unter Verwendung der Software VenTrak für Windows. Zu Beginn der bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde die  $FiO_2$  auf 1.0 und der PEEP auf 5  $cmH_2O$  erhöht. Während der BAL wurde der Pip individuell angepasst (MW 22  $cmH_2O$ ), um eine normale Thoraxexkursion und einem Ziel- $PaCO_2$  nach Beendigung der BAL auf Werte  $<70$  mmHg (MW 51 mmHg) zu gewährleisten. Für die weitere Versuchsdauer (Therapie für 4h) wurde die o.g. Beatmungseinstellung beibehalten, wobei sich wiederum der Pip nach den  $PaCO_2$ -Werten (Ziel  $>30 / <50$  mmHg) richtete.

#### **2.2.4 Bronchoalveoläre Lavage (BAL):**

Die experimentelle Induktion der Lungenschädigung erfolgte durch Surfactant-depletion aufgrund repetitiver bronchoalveoläre Lavage (BAL) <sup>(3;81)</sup>. Nach Dekonnektion vom Beatmungsgerät wurden 30 ml/kg erwärmte 0.9% NaCl-Lösung durch den Tubus intratracheal appliziert (Einfülldauer max. 20 sec.). Die physiologische Kochsalzlösung wurde nach 1 Minute oder bis zum Auftreten von Bradykardien mit einem Absaugkatheter (max. 0,2 bar) wieder abgesaugt und die BAL nach standardisiertem Schema (siehe Abb. 4) fortgeführt, bis in den Blutgaskontrollen der  $paO_2 <100$  mmHg unter einer  $FiO_2$  von 1.0 abfiel. Die ermittelte  $paO_2/FiO_2$  -Ratio war zu diesem Zeitpunkt bei allen Tieren  $<100$  mmHg <sup>(25)</sup>, entsprechend lag per Definitionem ein ARDS vor <sup>(41)</sup>. Im Anschluss an die BAL wurden die Tiere für einen Zeitraum von 30-60 min überwacht, bis sich ein „steady state“ der induzierten Lungenschädigung einstellte (Messzeitpunkt 2, „LI“).

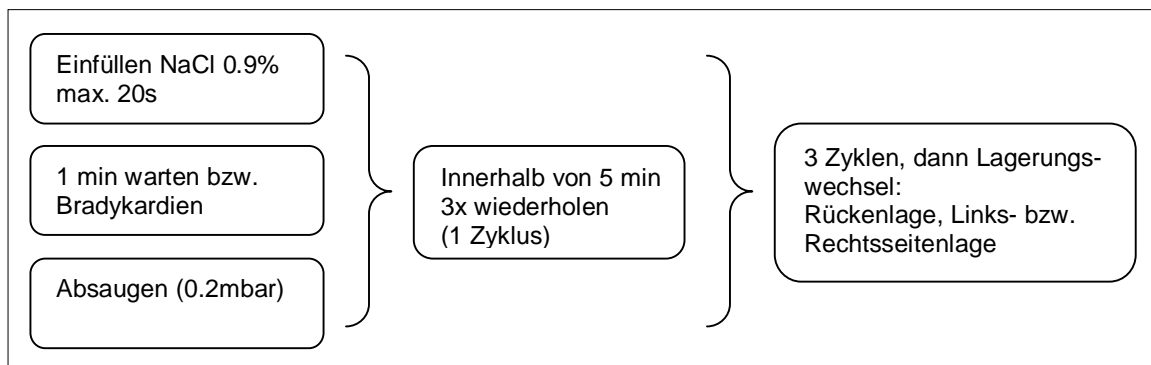


Abb. 4: Schema für die Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL).

### **2.2.5 Randomisierung der Gruppen:**

Die Randomisierung der Tiere erfolgte nach Durchführung der experimentell induzierten Lungenschädigung <sup>(3)</sup>. Die Partial-Liquid-Ventilation-Gruppe (PFC-Gruppe) bestand aus 8 Tieren, die Surfactant-Gruppe (S-Gruppe) aus 7 Tieren.

### **2.2.6 Zwei Therapiemodelle des neonatalen ARDS (PFC vs. S)**

Die Tiere der PFC-Gruppe erhielten initial 30 ml/kg des zuvor fluoreszenzmarkierten PFC-Gemischs (siehe 2.1.2), das über einen Sideport am Tubusansatzstück mit 1,5 ml/kg/min intratracheal appliziert wurde. PFC-Verluste durch Evaporation wurden im geschlossenen Beatmungssystem am Ende des Expirationsschenkels über eine spezielle Filtervorrichtung (siehe Abb. 3) gespeichert. Das Filtersystem bestand aus einem speziellen Glaskolben <sup>(82)</sup>, der mit Zeolite DAY-F63 (De-Aluminated Zeolite; Degussa AG, Frankfurt/Main, Germany) gefüllt und auf einer elektronischen Feinwaage (LC 2200 P; Sartorius, Göttingen, Germany) befestigt war. DAY-F63 war in der Lage, das evaporierte PFC zu adsorbieren <sup>(82)</sup>. Die Messgenauigkeit der Feinwaage lag bei 10 mg. Alle 5 Sekunden wurde kontinuierlich die Gewichtsänderung registriert und zur Datenspeicherung auf einen Computer übertragen (Software Winwedge V1.1b, T.A.L. Enterprises, Philadelphia, USA). Durch Kenntnis des spezifischen Gewichts (siehe 1.4) sowie der verabreichten Menge des PFC (30 ml/kg) in Gramm, konnte die Menge an verbrauchtem (evaporiertem) PFC indirekt aus der Gewichtszunahme des Absorbers berechnet werden. Nach Applikation von 30ml/kg PFC (1,5 ml/kg/min), wurde die Applikationsrate zunächst auf 0,2 ml/kg/h gesenkt (Erhaltungsdosis) und entsprechend den jeweils aktuellen PFC-Verlusten durch Evaporation (Gewichtszunahme des Absorbers) angepasst. Somit war es möglich, die gewünschte PFC-Menge von 30ml/kg kontinuierlich über den Versuchszeitraum von 240min konstant zu applizieren.

Die Surfactant (S)-Gruppe erhielt eine einmalige Gabe von exogenem Surfactant (1,5ml, 120mg Curosurf®, Serono, Parma Italy), das ebenfalls im Vorfeld fluoreszenzmarkiert wurde (siehe 2.1.2). Curosurf® ist ein natürliches, aus Schweinelungen zubereitetes Präparat, das fast ausschließlich Phospholipide enthält, und zu ca. 1% die niedermolekularen, hydrophoben Apoproteine SP-B und SP-C <sup>(83)</sup>.

Nach kurzer Dekonnektion vom Beatmungssystem erfolgte die Bolus-Substitution von S über eine bis auf Höhe der Trachealbifurkation eingeführte Magensonde (<sup>84</sup>). Anschließend erfolgte die maschinelle Beatmung (siehe 2.2.3), ebenfalls für den Zeitraum von 240 Minuten.

### **2.2.7 Versuchsprotokoll und Messmethoden:**

Das Versuchsprotokoll bestand aus insgesamt 3 festgelegten Messzeitpunkten. Messzeitpunkt 1 entsprach der Ausgangsmessung („Baseline“) vor Induktion der Lungenschädigung. Messzeitpunkt 2 erfolgte nach induzierter Lungenschädigung („LI“) und Messzeitpunkt 3 nach 240 Minuten Therapie („240min“). Die PFC-Gruppe erhielt über den Messzeitraum 240 min eine kontinuierliche PFC-Applikation, wogegen die S-Gruppe einmalig 120mg Surfactant substituiert bekam. Zu jedem der Messzeitpunkte wurden beatmungs- und hämodynamische Parameter sowie Daten aus den arteriellen Blutgasanalysen (ABL 500, Radiometer Medical, Copenhagen Denmark) erfasst (siehe Tab. 4, 5). Um den Einfluss beider Therapiemethoden auf den Gasaustausch zu untersuchen, wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt: der „Ventilatory Efficacy Index“ (VEI) ermöglichte eine Aussage über mögliche Auswirkungen der maschinellen Beatmung auf die Ventilation, insbesondere unter Berücksichtigung der Messgröße PaCO<sub>2</sub>. Der VEI berechnet sich nach folgender Formel, wobei „3800“ eine CO<sub>2</sub>-Produktionskonstante [(ml·Torr)/(kg·min)] ist (<sup>85;86</sup>):

$$VEI = \frac{3800}{[RR \times (P_{ip} - PEEP) \times PaCO_2]}$$

Auch durch die Berechnung des „Oxygenation Index“ (OI) konnte die Ausprägung einer respiratorischen Insuffizienz bei Lungenschädigung eingeschätzt werden (<sup>25</sup>). Erhöhter mittlerer Atemwegsdruck (MAP), erhöhte FiO<sub>2</sub> sowie Hypoxie (Verringerung des paO<sub>2</sub>) bewirkten eine Zunahme des OI, entsprechend führten steigende paO<sub>2</sub>-Werten zu einer Abnahme.

$$OI = \frac{(MAP \times FiO_2 \times 100)}{PaO_2}$$

Neben den festgelegten 3 Messzeitpunkten „Baseline, LI, 240min“ wurden zur Überprüfung möglicher Kurzzeiteffekte beider Therapieformen zusätzlich nach 30 und 60 Minuten Therapiedauer beide genannten Messparameter erfasst (siehe 3.2.3.1, 3.2.3.2). Zur Darstellung kamen hier jeweils die prozentuale Änderung des VEI (% Änderung VEI) und OI (% Änderung OI) ausgehend vom Messzeitpunkt 2 (LI) im Abstand von jeweils 30 und 60 Minuten Therapie (Abb.16+18).

### **2.2.8 Präparation und Fixierung der Lungen:**

Am Ende des Therapiezeitraums (240 min) erhielten alle Versuchstiere unter Fortführung der Analgesie einen letalen Bolus Kaliumchloridlösung (10 ml KCl 7.45%), was im abgeleiteten EKG zum Herzstillstand führte. Nach dem Versterben der Tiere wurde der Beatmungsmodus in beiden Gruppen auf CPAP (PEEP 10 cmH<sub>2</sub>O) umgestellt, wodurch die Lungen endexpiratorisch kontinuierlich gebläht und somit am Kollabieren gehindert wurden. Dies ermöglichte die Freipräparation, Extraktion (siehe 2.1.2) und anschließende Fixierung der geblähten Lungen in flüssigem Stickstoff. Dadurch sollte eine weitere Umverteilung beider Carriersubstanzen (PFC, S) innerhalb der Lungen nach Therapieende verhindert werden. Die nachfolgende Gefriertrocknung der Lungen (Gefriertrocknungsanlage Modell Lyovac GT 2, Fa. Finn-Aqua, Germany) bewirkte einen direkten Übergang von gefrorenen in festen Zustand, um speziell beim leicht flüchtigen PFC eine nachträgliche Umverteilung durch Evaporation ebenfalls zu vermeiden. Die Gefriertrocknung erfolgte bei -25°C und einem eingestellten Druck unter 10<sup>-3</sup> mbar, für einen Zeitraum von 48-72 Stunden. Sowohl während der Therapie und der Präparation, als auch während der endgültigen Fixierung befanden sich alle Tiere / Lungen kontinuierlich in Rückenlage, um ebenfalls eine iatrogen hervorgerufene Umverteilung von PFC bzw. S durch Lageänderung zu verhindern.

### 2.2.9 Topographische Gliederung der Lungen:

Um eine spätere Aussage über die intrapulmonale Verteilung des PFC und S treffen zu können, wurden die Lungen in Würfel definierter Größe zerschnitten und nach Zuordnung im Koordinatensystem (X-, Y-, Z-Achse) als 3-dimensionales Lungenmodell wieder rekonstruiert. Um das Schneiden der gefriergetrockneten Lungen in Lungenwürfel (LC) zu ermöglichen, wurden sie mit einer Nadel auf einer Unterlage in Rückenlage fixiert und anschließend schichtweise vollständig in Bauschaum eingebettet (Abb. 4). Nachdem Aushärtung des Bauschaums konnten die eingeschäumten Lungen in zwei von uns speziell angefertigten Schneidelehren standardisiert in Würfel definierter Größe ( $0,7\text{cm}^3$ ) geschnitten werden (Abb. 5a). Dazu war es erforderlich, den überschüssigen Bauschaum an den Außenseiten quaderförmig abzuschneiden,

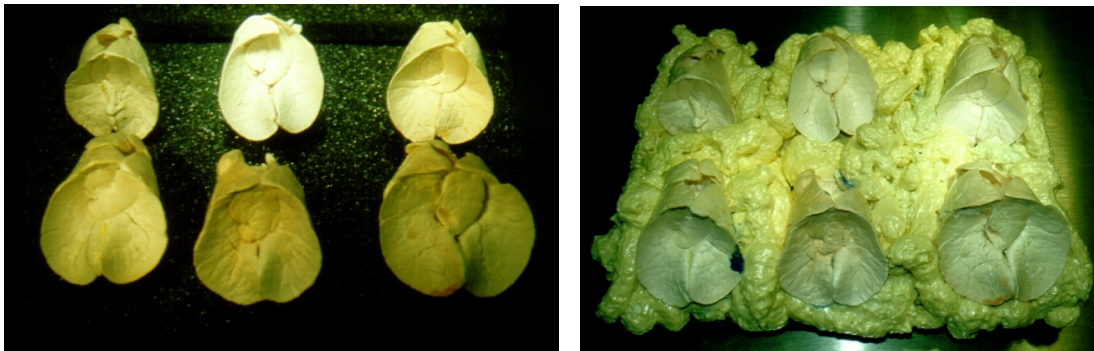


Abb. 4: Fixierung der gefriergetrockneten Lungen in Rückenlage (linke Abbildung). Anschließende Fixierung der Lungen durch Einschäumen in schnell trocknendem Bauschaum, jeweils unter Einhaltung einer kurzen Antrocknungszeit. Dies sollte eine nachträgliche Kompression der Lungen durch den beim Aushärten sich geringfügig ausdehnenden Bauschaum verhindern (rechte Abbildung). Durch die Fixierung der gefriergetrockneten Lungen in Bauschaum wurde das spätere Zerschneiden in Lungenwürfel ermöglicht.

so dass die Lungen in einem „Rechteck“ aus Bauschaum eingebettet lagen. In der Schneidelehre Nr. 1 war in der Plexiglaswand ein dünner Spalt im Abstand von 0,7 cm zur Wand eingelassen, was das standardisiertes Schneiden der eingebetteten Lungen in Schichten von jeweils 0,7 cm Stärke gewährleistete (dünnen Präparationsmesser, Allgauer Instrumente). Hierbei wurde darauf geachtet, dass die eingeschäumten Lungen zum Schneiden in basoapikaler Richtung (vom Zwerchfell in Richtung Lungenspitze) in die Schneidelehre geschoben und die rechte Seite in der unteren Ecke angelegt wurden (Abb. 5a). Jede Lungenscheibe erhielt in ihrer basoapikalen Schnittrichtung eine



entsprechende Koordinate (Y-Achse), und wurde – verglichen einer abgeschnittenen Brotscheibe - auf ihre basale Seite gelegt, so dass die apikale Seite nach oben zeigte (Abb. 5a, 5b).

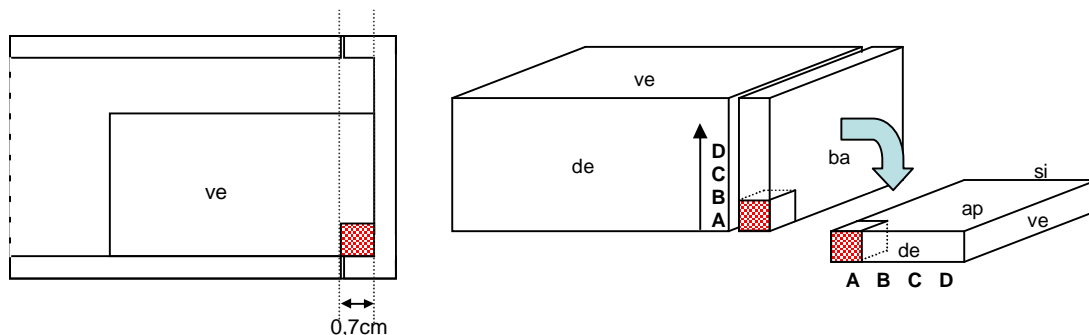


Abb. 5a, 5b: Abkürzungen: ve – ventral, do – dorsal, ap – apikal, ba – basal, de – dexter (rechts), si – sinistre (links). Schematische Darstellung der Schneidelehre Nr.1 mit Ansicht von oben (5a, Abb. links). Die in Bauschaum eingebetteten Lungen wurden in Rückenlage in basoapikaler Richtung in die untere Ecke der Schneidelehre eingepasst, so dass die rechte Lungenseite der Wand anlag. In die Plexiglaswand der Schneidelehre war ein dünner Spalt im Abstand von 0,7 cm zur Wand eingelassen, um das schichtweise Schneiden der Lungen in Scheiben von jeweils 0,7 cm zu ermöglichen.

In einer zweiten, ebenfalls aus Plexiglas speziell angefertigte Schneidelehre (Nr. 2) wurde jede der entstandenen Lungenscheiben so platziert, dass die apikale Seite nach oben verwies und die rechte sowie dorsale Kante in der linken unteren Ecke zum liegen kam (siehe Abb. 5c). In den vier Seitenwänden waren in das Plexiglas ebenfalls im 7mm-Abstand Schnittführungen eingearbeitet worden, um die Lungenscheiben in Würfel von 0,7x0,7x0,7 cm schneiden zu können. Damit erhielt jeder Lungenwürfel seine Zuordnung im Koordinatensystem in X-, Y- und Z-Richtung. Die Y-Achse entsprach dabei den einzelnen Lungenschichten (basal nach apikal), die Z-Achse stand für die Ausbreitungsrichtung von dorsal nach ventral und die X-Achse zeigte die Koordinaten von rechts (dexter) nach links (sinister), was die spätere Rekonstruktionen der Lungen als 3-dimensionales Würfelmodell ermöglichte.

LC aus dem Randbereich die nur Bauschaum ohne Lungengewebe beinhalteten gingen nicht in die Auswertung mit ein und wurden verworfen. LC aus dem Randbereich, die sowohl Lungengewebe als auch Bauschaum enthielten, wurden innerhalb jeder Lunge einzeln ausgezählt um spätere Berechnungen von Volumen- und Dichteänderungen der gefriergetrockneten Lungen zu ermöglichen (Abb. 5c, 2.2.11).

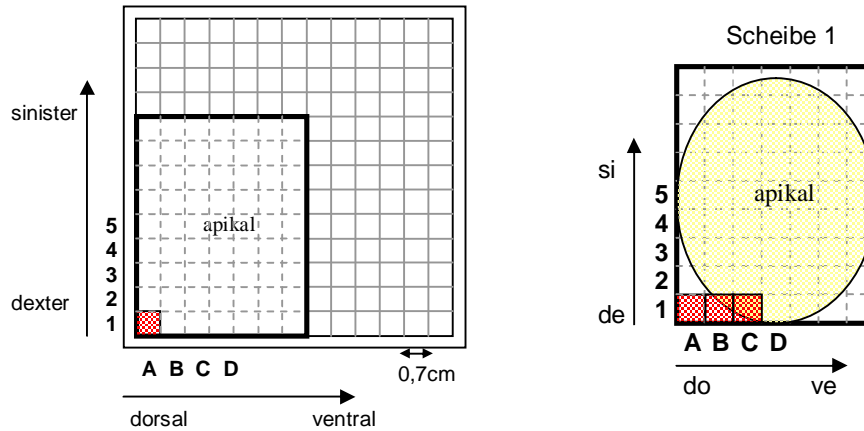


Abb. 5c (links): Schematische Darstellung der zweiten Schneidelehre (Nr. 2), wo exemplarisch eine Lungenscheibe in die linke untere Ecke eingepasst wurde. Nach dem Schneiden erhielt jeder Lungenwürfel eine vorläufige Koordinate sowohl in dorso-ventraler Richtung (Z-Achse, hier: alphabetische Abfolge) als auch in der Ausbreitungsrichtung von dexter - de nach sinister - si (X-Achse, hier: Durchnummerierung). Die Y-Achse entsprach dabei den einzelnen Lungenscheiben (apiko-basale Richtung, Schneidelehre Nr.1) jeder Lunge. Durch standardisiertes Schneiden der Lungen in den zwei angefertigten Schneidelehren, besaß jeder Lungenwürfel eine Kantenlänge von jeweils 0,7cm.

Abb. 5c (rechts): Schematische Darstellung einer quaderförmig in Bauschaum eingebetteten Lungenscheibe (Lungengewebe = gelb) in der Schneidelehre Nr. 2. Jedes hier rot markierte Quadrat stellt exemplarisch einen einzelnen Würfel nach Zerschneiden der Lungenscheibe dar, wobei Würfel aus dem Randbereich ohne Lungengewebe (z.B. Würfel A1) nach Zuordnung im Koordinatensystem verworfen wurden und nicht in die Auswertung mit gingen. LC mit anteiligem Lungengewebe (z.B. Würfel B1) wurden innerhalb jeder Lunge ausgezählt, um spätere Berechnungen von Lungenvolumen und Lungendichte zu ermöglichen (siehe 2.2.11).

Nach Schneiden der gesamten Lunge und vorläufiger Zuordnung jedes LC zu einer Koordinate (X-, Y-, Z-Achse) wurde die Carina des Tracheobronchialsystems als Nullpunkt des Koordinatensystems definiert, weil sie beim Schneiden jeder Lunge eindeutig zu definieren einfach aufzufinden war. Davon ausgehend wurde das Koordinatensystem neu angelegt: die Ebene der Carina wurde in der entsprechenden Verteilungsrichtung (X-, Y-, Z-Achse) als „zentral“ definiert („Nullpunkt“, „Schicht 0“). Entsprechend wurden die Ausbreitungsrichtungen apikal/basal, ventral/dorsal und dexter/sinister neu definiert.

Die dadurch entstandenen 3-dimensionalen Würfelmodelle der gefriergetrockneten Lungen konnten durch Verwendung der Software Miner3D EXCEL (Fa. DIMENSION 5) am Computer visualisiert werden (siehe 3.2.1). Hier wurden die rekonstruierten Lungenmodelle so dargestellt, so dass man von unten (basal) auf die in Rückenlage

befindlichen Lungen schaute, wobei die linke Bildseite der rechten Lungenseite und die rechte Bildseite der linken Lungenseite entsprach (Abb. 5d). Der Punkt in dem sich alle 3 Achsen des Koordinatensystems trafen war die Carina des Tracheobronchialsystems (Nullpunkt des Koordinatensystems). Dadurch konnten alle Lungen standardisiert im 3-dimensionalen Koordinatensystem rekonstruiert und untereinander auf regionale Verteilungsunterschiede hin untersucht werden.

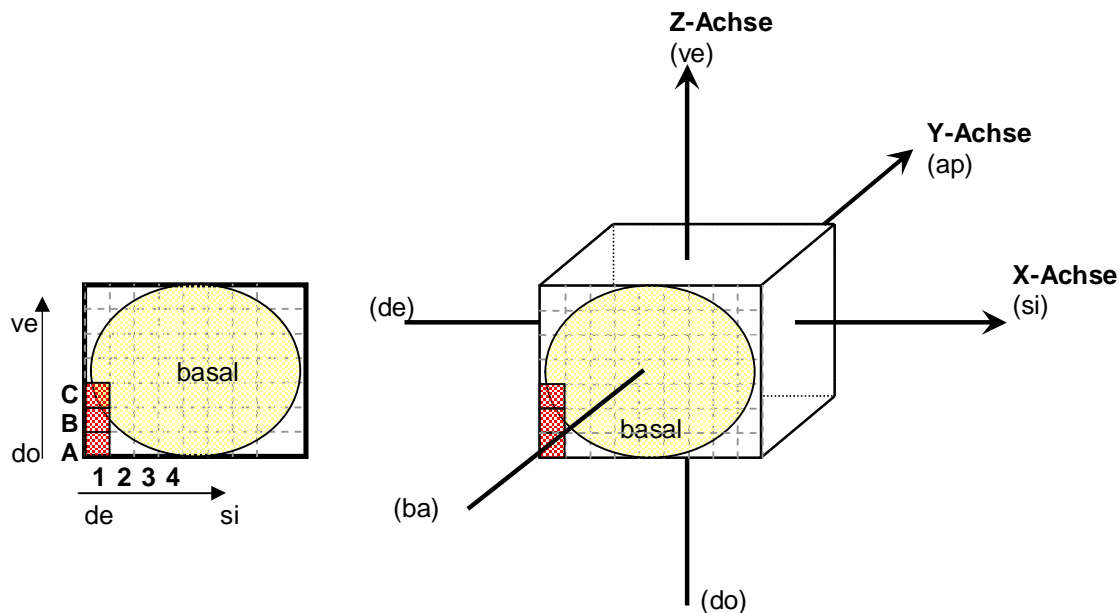


Abb. 5d: das linke Bild zeigt die schon in Abb. 5b verwendete Lungenscheibe (Rückenlage), diesmal in der Ansicht von basal. Die rot markierten Würfel und die Achsenbeschriftungen wurden zur besseren Orientierung belassen.

Das rechte Bild zeigt die entsprechende Darstellung der Lungenscheibe im 3-dimensionalen Koordinatensystem. Man betrachtet hier die in Rückenlage befindliche Lunge von basal (Lungenbasis) in Richtung apikal (Lungenspitze), wobei die linke Bildseite der rechten Lunge und die rechte Bildseite der linken Lunge entspricht. In dem Punkt wo sich alle 3 Achsen des Koordinatensystems treffen lag die Carina des Tracheobronchialsystems, der als Nullpunkt definiert wurde.

Zudem konnten bei Verwendung der Software (Miner3D EXCEL) die Würfelmodelle beliebig um alle 3 Achsen (X-, Y-, Z-Achse) rotiert werden, was die Visualisierung regionaler Verteilungsunterschiede zusätzlich verbesserte.

Nach Schneiden und Zuordnung im Koordinatensystem wurde abschließend jeder einzelne LC auf einer elektronischen Feinwaage (LC 2200 P; Sartorius, Göttingen, Germany) gewogen. Somit war die Anzahl (nLC) und das Gewicht der Würfel (wLC),

sowie das Gewicht der gesamten gefriergetrockneten Lunge bekannt, was als Grundlage für spätere Berechnungen der Änderung von Lungenexpansion und Lungenvolumen diente (siehe 2.2.11).

### **2.2.10 Darstellung der intrapulmonalen FF-Verteilung:**

Durch Erstellung des 3-dimensionalen Würfelmodells jeder Lunge (siehe 2.2.9), waren die unterschiedlichen Lungenregionen zur Untersuchung der intrapulmonalen Verteilung von PFC und S definiert. Für unsere Fragestellungen spielte die Verteilung beider Substanzen, dargestellt als relative Verteilung von Fluoreszenzintensitäten, innerhalb der Lungen von ventral nach dorsal sowie von apikal nach basal eine Rolle. Da die Größen der gefriergetrockneten Lungen und entsprechend auch die Anzahl der Lungenschichten zum Teil unterschiedlich waren, wurden 2 Auswertungsmodelle herangezogen:

Um eine Gesamtbetrachtung zu ermöglichen wurden einerseits die Lungen in der Anzahl ihrer Schichten normiert, auf 8 Schichten in der Ausbreitungsrichtung von ventral nach dorsal und auf 11 Schichten in der Ausbreitungsrichtung von basal nach apikal. Dann wurden innerhalb der Lungenschichten die Summe der INT (YG) bezogen auf die Gesamtmenge des FF berechnet, um jeweils Unterschiede der Farbstoffmenge feststellen zu können (siehe 3.2.1.2).

Bei einer weiteren Methode zur Betrachtung und Analyse der intrapulmonalen Farbstoffverteilung, diente die Carina des Tracheobronchialsystems als Nullpunkt bzw zentrale Schicht des Koordinatensystems. Die Schichten oberhalb des Nullpunkts wurden als ventrale bzw. apikale Schichten definiert, die Schichten unterhalb des Nullpunkts als dorsale bzw. basale Lungenschichten. Dadurch konnten die Lungen unabhängig von der Anzahl ihrer Schichten in der Ausbreitungsrichtung ventral-zentral-dorsal und apikal-zentral-basal ebenfalls miteinander verglichen werden (siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3).

Die Darstellung der FF-Verteilung in den 3-dimensionalen Würfelmodellen als indirekter Nachweis für die Carriersubstanzen PFC und S (siehe 3.2.1), machte weitere Arbeitsschritte in Anlehnung an unsere Vorversuche erforderlich (siehe 2.1.2).

Nach Wiegen und Zuordnung im Koordinatensystem wurde jeder Lungenwürfel in 1,8 ml Aceton eingelegt, um den Fluoreszenzfarbstoff (FF) wieder in Lösung zu bringen.

Nach spektrometrischer Messung der jeweiligen Fluoreszenzintensität (INT), wurde der Quotient „Q“ aus INT pro Würfelgewicht gebildet (siehe 2.1.2), was den Vergleich der INT jedes Lungenwürfels innerhalb einer Lunge ermöglichte. Um die regionale Verteilung der beiden Carrier (PFC, S) ebenfalls zwischen beiden Therapiegruppen vergleichen zu können, wurde der Mittelwert von Q in jeder Gruppe gebildet, und davon abweichende Werte als „prozentuale Änderung von Q“ angegeben (siehe 3.2.1).

Aufgrund der geräteabhängig festgelegten unteren Messgrenze des Fluoreszenzspektrometers bei  $INT \geq 10$  wurden vor Berechnung von Q alle Lungenwürfel mit  $INT < 10$  gleich  $INT = 10$  gesetzt.

In der Visualisierung der regionalen Verteilung im Würfelmodell (siehe 3.2.1.1) reichte das Farbspektrum der gemessenen INT/Würfelgewicht (Q) der einzelnen Lungenwürfel von blau (niedriges Q) bis rot (hohes Q).

### **2.2.11 Totales Lungenvolumen:**

Nach Präparation und Zerschneiden der gefriergetrockneten Lungen (siehe 2.2.9) war es durch Kenntnis von Anzahl und Gewicht der Lungenwürfel (LC) möglich, Berechnungen über das totale Lungenvolumen und die Lungendichte durchzuführen und auf Gruppenunterschiede hin zu untersuchen (siehe 3.2.2).

#### **2.2.11.1 Berechnung totales Lungenvolumen:**

Die Berechnung des totalen Lungenvolumens erfolgte durch Kenntnis von Anzahl und Größe der Lungenwürfel ( $0,7 \times 0,7 \times 0,7 \text{ cm} = 0,343 \text{ cm}^3 = 0,343 \text{ ml}$ ), wobei die Randstücke innerhalb jeder Lunge einzeln ausgezählt und wegen der unterschiedlichen Anteile von Lungengewebe im Randbereich nur mit der Hälfte an Lungenvolumen ( $0,1715 \text{ cm}^3$ ) in die Auswertung mit einbezogen wurden. Entsprechend wurde bei jeder der gefriergetrockneten Lungen die Summe aus Lungenvolumen ohne Randbeteiligung und Lungenwürfel mit Randbeteiligung zur Berechnung des gesamten Lungenvolumens gebildet:

$$\text{Lungenvolumen} = (0,343 \text{ cm}^3 \times nLC) + (0,1715 \text{ cm}^3_{\text{Rand}} \times nLC_{\text{Rand}})$$

### **2.2.11.2 Berechnung Lungendichte:**

Zur Berechnung der Lungendichte (Masse pro Volumen) war es erforderlich, das zuvor berechnete Volumen jeder Lunge mit einzubeziehen, das sich nach Gefriertrocknung aus Lungengewebe und luftgefüllten Atemwegen zusammensetzte. Die Lungendichte berechnete sich entsprechend durch Bildung des Quotienten aus Lungengewicht (in mg) und Lungenvolumen (siehe 3.2.2.2).

### **2.2.11.3 Berechnung Pulmonary Expansion Factor (PEF):**

Das Verhältnis (Ratio) aus dem Gewicht der gefriergetrockneten Lungen (in mg) und der jeweiligen Anzahl der Lungenwürfel (LC) diente als Berechnungsgrundlage zur Darstellung von Größenunterschieden zwischen den Lungen (siehe 3.2.2). Hierbei würde eine höhere Anzahl von Lungengewebewürfeln bei gleich bleibenden Gewichten der gefriergetrockneten Lungen zu einer Abnahme der Ratio führen.

Auf der Basis dieser Ratio wurde ein Faktor berechnet („PEF“ – Pulmonary Expansion Factor), der eine Aussage über die Änderung der Lungengröße nach 240 min Therapiedauer zwischen beiden Gruppen (PFC vs. S) ermöglichen und mögliche Therapieeffekte weiter veranschaulichen sollte. Die Ratio S-Gruppe im Verhältnis zur Ratio PFC-Gruppe ergibt einen Unterschied in Prozent. PEF dient entsprechend als Multiplikator um den Unterschied der Ratio zwischen den Gruppen weiter zu verdeutlichen.

## **2.3 Statistik:**

Die statistische Analyse und graphische Auswertung erfolgte durch Verwendung der Software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, USA).

Die Ergebnisse wurden, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) angegeben, dass Signifikanz-Niveau wurde mit  $p < 0.05$  festgelegt. Die Analyse der Daten auf regionale Verteilungsunterschiede, sowohl innerhalb als auch zwischen beiden Therapiegruppen (PFC vs. S), fand unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests statt.

Die Untersuchung der Respiration (VEI, OI), Messergebnisse aus Blut- und Atemgasanalysen (etCO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub>, pH-Wert, Basenabweichung), Kreislaufparameter (HF,

MBP) sowie der Therapieeinfluss auf Lungenexpansion und Lungendichte erfolgte ebenfalls durch Anwendung des Mann-Whitney U-Tests auf signifikante Unterschiede. Der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte zwischen den Messzeitpunkten Baseline vs. LI, Baseline vs. 240min, LI vs. 240min, die Untersuchung der Kurzeffekte (VEI, OI) erfolgte zu den Messzeitpunkten 30 und 60 Minuten nach induzierter Lungenschädigung.

### 3. Ergebnisse:

#### 3.1 Ergebnisse der Vorversuchsreihen:

##### 3.1.1 Fluoreszenzmarkierung des PFC mit Mikrosphären:

Der Versuch einer direkten Nachweismethode von im PFC gelösten Mikrosphären (fluoreszierenden Farbpartikeln), fand aufgrund inhomogener Lösungseigenschaften der Mikrosphären (in vitro) keine Verwendung. Beide Mikrosphären ( $\text{SiO}_2$  RITC7(C18), MF-RhB-B183) zeigten nach PFC-Zugabe (Perfluorooctylbromid, Perfluorooctan) und Vermischen (Vortexen) bereits makroskopisch erkennbare unzureichende Lösungseigenschaften. Bei der Betrachtung der Mikrosphären innerhalb der Bürker-Zählkammern waren unterschiedlich große Farbpartikel darstellbar, die entsprechend nicht homogen verteilt waren (siehe Abb. 6 a-h).

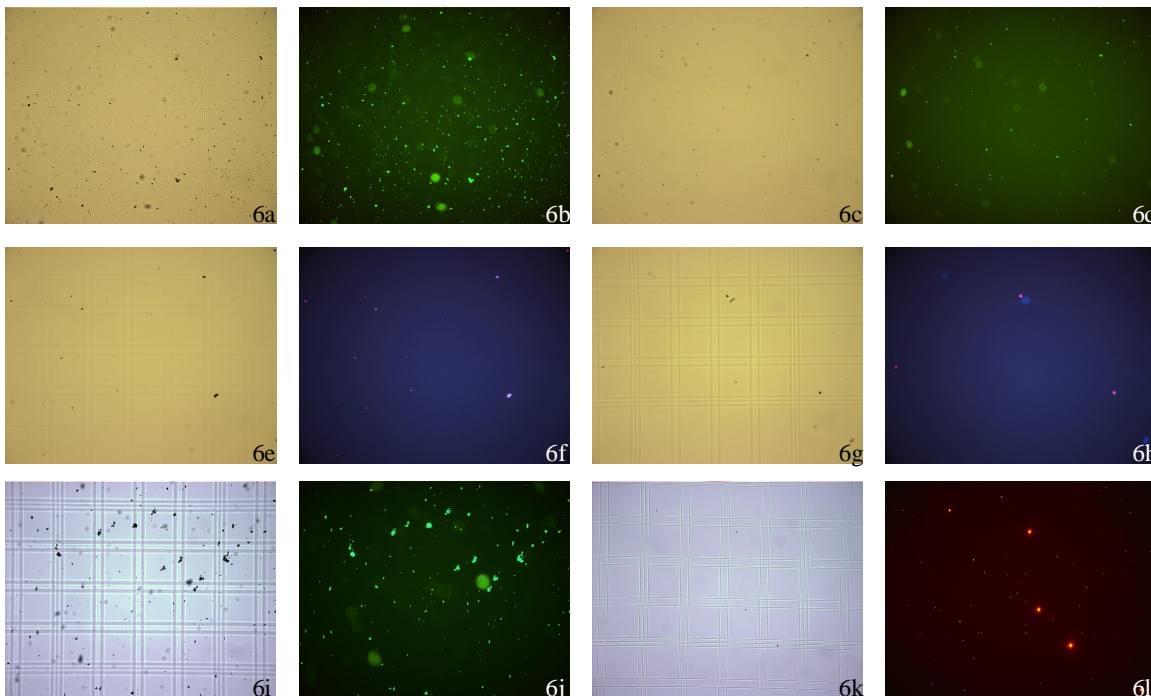


Abb. 6: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Darstellung der im PFC inhomogen gelösten Farbpartikel (Mikrosphären); Abb. 6a/b – 2mg  $\text{SiO}_2$  RITC7(C18) in 5ml Perfluorooctylbromid; Abb. 6c/d – 2mg  $\text{SiO}_2$  RITC7(C18) in 5ml Perfluorooctan. Abb. 6e/f - 2mg MF-RhB-B183 in 5ml Perfluorooctylbromid; Abb. 6g/h – 2mg MF-RhB-B183 in 5ml Perfluorooctan.

Abb. 6i/j -  $\text{SiO}_2$  RITC7(C18) in PFC-Gemisch ( $\text{C}_8\text{F}_{18}$  und  $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{Br}$  im Verhältnis 1:10) und Abb. 6k/l - MF-RhB-B183 in PFC-Gemisch ( $\text{C}_8\text{F}_{18}$  und  $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{Br}$  im Verhältnis 1:10).



Ebenfalls bei Verwendung eines PFC-Gemischs ( $C_8F_{18}$  und  $C_8F_{17}Br$  im Verhältnis 1:10) zeigten die Mikrosphären  $SiO_2-RiTC_7$  ( $C_{18}$ ) (Abb. 6i/j) und MF-RhB-B183 (Abb. 6k/l) in licht- und fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung ebenfalls die schon makroskopisch sichtbaren, inhomogenen Lösungseigenschaften (Klumpen-/ Haufenbildung).

### 3.1.2 Nachweis des FF in Aceton:

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten (INT) der 6 erstellten Verdünnungsreihen ergaben stabile Lösungseigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs (FF) gelöst in Aceton. In der graphischen Darstellung (Abb. 7) ist auf der Y-Achse die spektrometrisch gemessenen INT des FF logarithmisch aufgetragen. Die X-Achse zeigt die jeweilige Konzentration des FF in  $\mu g/ml$ . Unterschiede in der Höhe des Ausgangswertes jeder Messreihe entstanden durch Titration der Stammlösung (Konzentration = 1000  $\mu g/ml$ ) bis in den messbaren Bereich des Fluoreszenzspektrometers (INT < 1000).

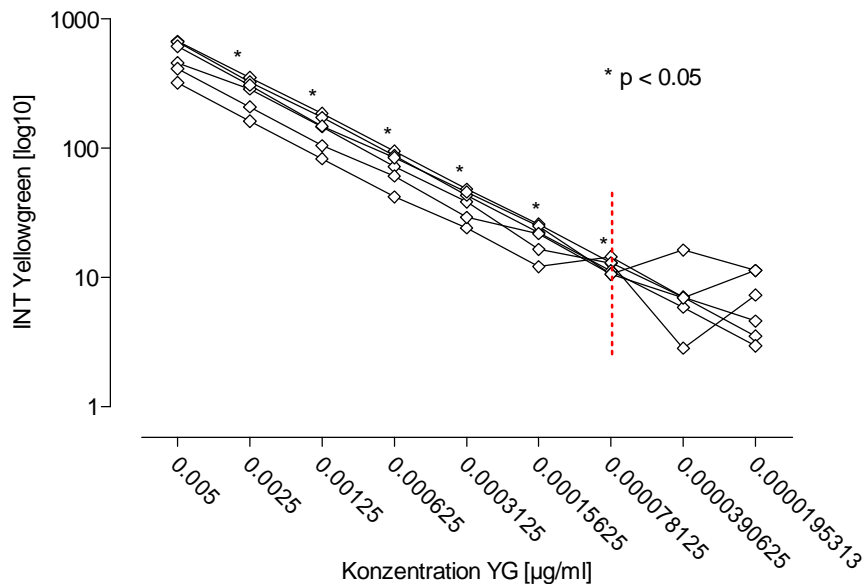


Abb. 7: Eichkurven zur Untersuchung der Lösungseigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs (FF) in Aceton. Darstellung der FF-Konzentrationen (X-Achse) unter schrittweiser Verdünnung der Stammlösung sowie logarithmischer Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensität (INT) auf der Y-Achse. Die unterschiedliche Höhe der Ausgangswerte entstanden durch Titration der Stammlösung bis in den messbaren Bereich des Spektrometers (INT < 1000).

Bis zu einer Verdünnung der Stammlösung bis auf 1:12800000 zeigten alle Verdünnungsschritte einen statistisch sig. Unterschied, bezogen auf die gemessene INT ( $p < 0.05$ ). Erst bei Unterschreiten dieser Verdünnung (rote Markierung) traten

Schwankungen der Messwerte auf, die in weiteren Verdünnungsschritten keine sig. Veränderungen ihrer INT mehr zeigten:  $8 \pm 4,5$  bei 1:25600000;  $7 \pm 3,8$  bei 1:51200000 (MW $\pm$ SD). Bei einer Verdünnung von 1:12800000 lag die gemessene INT des FF bei  $12 \pm 1,6$  (MW $\pm$ SD).

Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten wir, dass Aceton als Lösungsmittel für den bei uns verwendeten FF Yellowgreen geeignet war.

### **3.1.3 Nachweis des FF im Lungengewebe:**

Der Nachweis des FF (YG) gelöst in der Carriersubstanz PFC war nach intrapulmonaler Applikation durch spektrometrische Messung der INT möglich (siehe 2.1.2.2).

Regionale Unterschiede im Sinne einer bevorzugten schwerkraftabhängigen Verteilung des PFC in abhängige Bereiche der Lunge konnten in dieser Vorversuchsreihe durch eine statistische Analyse nicht gezeigt werden. Bei Betrachtung der gesamten und rechten Lungen zeigten sich tendenziell höhere Werte der gemessenen INT/mg (Q) zwischen ventralen und dorsalen Lungenschichten, beziehungsweise zeigten sich bei Betrachtung separat der linken Lungen tendenziell höhere Werte (Q) in dorsalen Lungenschichten. Dies war jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen im Vergleich zwischen den Schichten ventral vs. medial, ventral vs. dorsal sowie medial vs. dorsal nicht signifikant (Tab. 2).

Tab. 2: Tabellarische Darstellung von Q (INT/mg) als Mittelwert (MW $\pm$ SD). Entsprechend Abb.1 (siehe 2.1.2) werden bei Betrachtung der gesamten gefriergetrockneten Rattenlungen die Schichten aus folgenden Lungenwürfeln zusammengesetzt: ventral (LC 1+4+7+10), medial (LC 2+5+8+11) und dorsal (LC 3+6+9+12) bzw. bei separater Betrachtung von rechter und linker Lunge: ventral rechts (LC 1+4), medial rechts (LC 2+5), dorsal rechts (LC 3+6) sowie ventral links (LC 7+10), medial links (LC 8+11) und dorsal links 9+12).

MW $\pm$ SD	gesamte Lunge	rechte Lunge	linke Lunge
ventral	$7,18 \pm 8,99$	$9,64 \pm 11,72$	$4,73 \pm 3,97$
medial	$6,81 \pm 5,64$	$8,36 \pm 7,04$	$5,26 \pm 3,27$
dorsal	$5,51 \pm 4,60$	$5,01 \pm 3,10$	$6,06 \pm 5,77$

## **3.2 Ergebnisse der Hauptversuchsreihe:**

### **3.2.1 Darstellung der intrapulmonalen PFC- und S-Verteilung:**

#### ***3.2.1.1 3-dimensionales Würfelmodell der Lunge:***

Die Darstellung und der Vergleich der regionalen Verteilung von PFC und S sowohl durch Normierung der Würfelmodelle auf eine definierte Anzahl Lungenschichten als auch durch Erstellung von Lungenregionen anhand der Carina (Nullpunkt des Koordinatensystems) war möglich (siehe 2.2.10). Anhand von Q (Fluoreszenzintensität pro Würfelgewicht) eines jeden Lungenwürfels wurde die intrapulmonale Verteilung von PFC und S nach 3-dimensionaler Rekonstruktion der Würfelmodelle am Computer visualisiert. Die zusätzliche Möglichkeit der freien Rotation des Würfelmodells um alle 3 Achsen (X-, Y-, Z-Achse) erleichterte hierbei die Betrachtung der regionalen Verteilung beider Substanzen.

Die folgende exemplarische Darstellung eines Würfelmodells aus beiden Gruppen zeigte jeweils eine Lunge mit Ansicht von basal auf dem Rücken liegend und nach Rotation um die Z-Achse in einer Rechtsseitenansicht (siehe Abb. 8-11). In der PFC-Gruppe sah man optisch eine bevorzugte dorsobasale Verteilung des PFC (siehe Abb. 8+9a/b), dargestellt als relative Änderung von Q (INT/mg). Das Intensitätsspektrum reichte hierbei von blau (niedriges Q) bis rot (hohes Q). Sowohl in Ansicht von basal (siehe Abb. 8a) als auch von rechts-seitlich (siehe Abb. 9a) war gut zu erkennen, wie sich das PFC bevorzugt in den abhängigen Lungenregionen (basal, dorsal) anreicherte, dargestellt als Zunahme der Fluoreszenzintensität (INT) pro mg (Q) in diesen Bereichen (grün > blau). Zur besseren Orientierung war einerseits jeweils eine schematische Darstellung des Koordinatensystems mit abgebildet, zum einen in der Ansicht von basal (siehe Abb. 8b), zum anderen mit Blick von rechts auf die auf dem Rücken liegenden Lunge (siehe Abb. 9b). Zudem zeigte ein Foto der gefriergetrockneten Lungen eine entsprechende Aufsicht zur weiteren Orientierungsmöglichkeit.

In der S-Gruppe sah man in beiden Darstellungen (von basal und von rechts-basal) ein eher homogeneres Verteilungsmuster des Carriers Surfactant im Vergleich zu PFC. Hier kam es zu einer Mehranreicherung von S in verschiedenen kleineren Bereichen der Lunge.

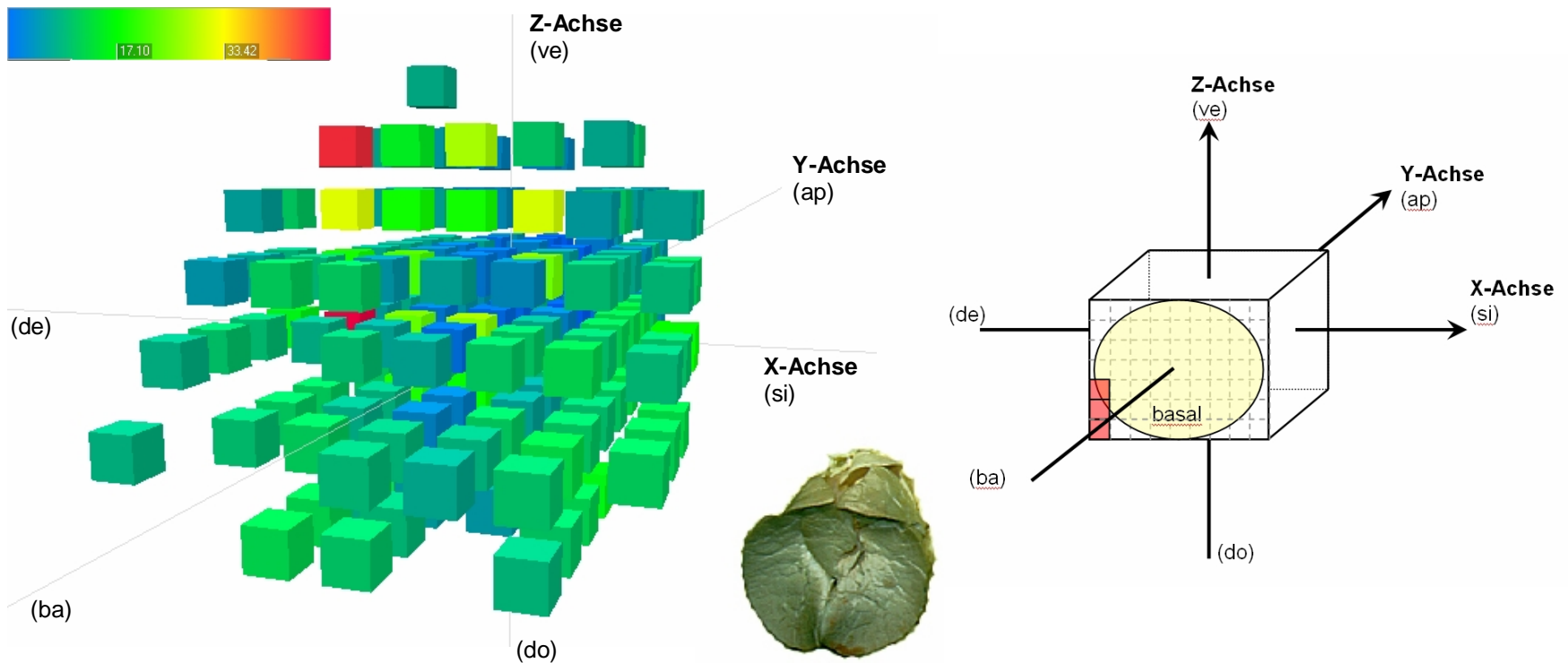


Abb. 8a: Exemplarische Darstellung der regionalen Verteilung von intrapulmonal appliziertem PFC durch Darstellung der Fluoreszenzintensitäten von im PFC gelösten FF. Das 3-dimensionale Würfelmodell zeigte die regionale Verteilung des Carriers PFC nach 240 Minuten Therapie nach induzierter Lungenschädigung. In Analogie zu konventionellen MRT-Bildern blickte man von basal auf die auf dem Rücken liegenden Lungen, vereinfacht dargestellt im Koordinatensystem Abb. 8b (rechtes Bild). Die Abkürzungen bedeuteten: ve – ventral, do – dorsal, ap – apikal, ba – basal, de – dexter, si – sinister. Die unterschiedlichen Farben der einzelnen Lungenwürfel entstanden durch die unterschiedlich hohe Fluoreszenzintensität (INT) des FF, dargestellt als Q (INT/mg), wobei das Intensitätsspektrum von blau (niedrige INT/mg) bis rot (hohe INT/mg) reichte. In Ansicht von basal war gut zu sehen, wie es zu einer bevorzugten Anreicherung des PFC in abhängigen Lungenregionen (basal, dorsal) kam.

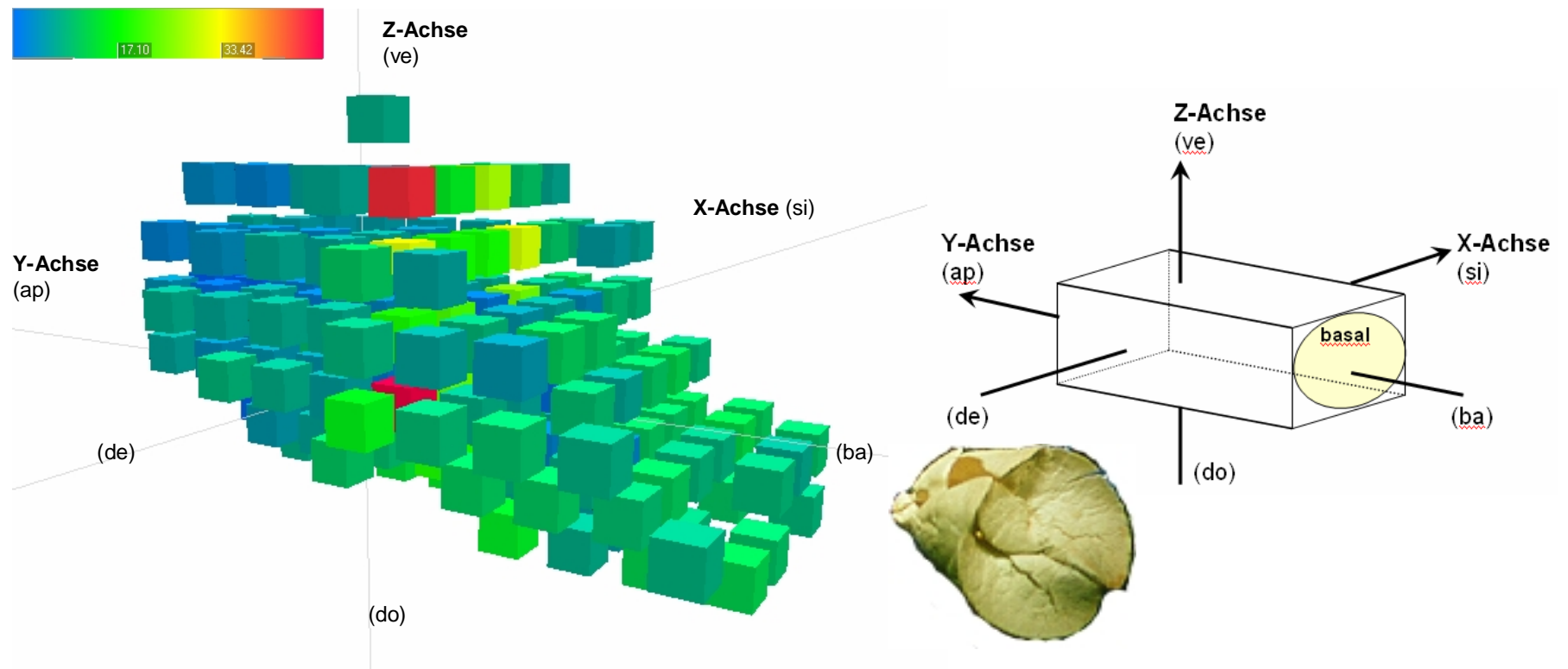


Abb. 9a: Ansicht der PFC-Verteilung von rechts-basal im 3-dimensionalen Würfelmodell. Abkürzungen: ve – ventral, do – dorsal, ap – apikal, ba – basal, de – dexter, si – sinister. Nach Rotation der Lunge um die Z-Achse sah man in dieser Darstellung wiederholt die bevorzugte Verteilung der Carriersubstanz PFC in die abhängigen Lungenbereiche (dorsal / basal). Die X-, Y-, und Z-Achse trafen sich jeweils im Nullpunkt des Koordinatensystems (Carina). Zentral und apikal waren vor allem die Würfel mit geringeren Intensitäten lokalisiert, gegenüber Würfeln mit höherem Q in basalen und dorsalen Lungenregionen.

Abb. 9b. Zur räumlichen Orientierung eine schematische Darstellung des 3-dimensionalen Würfelmodells nach Rotation der auf dem Rücken liegenden Lunge um die Z-Achse, sowie eine entsprechendes Foto der zuvor gefriergetrockneten Lunge ebenfalls nach Rotation um die Z-Achse.

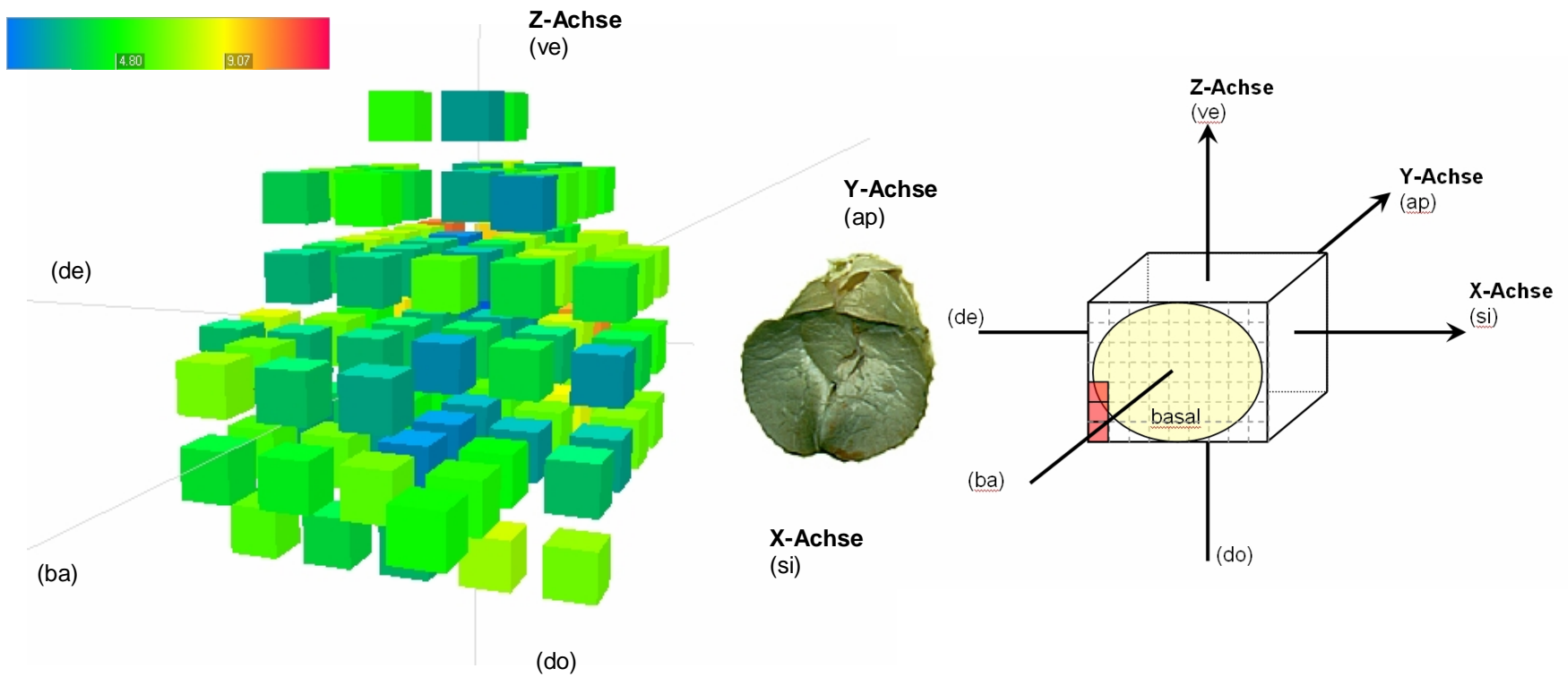


Abb. 10a: Exemplarische Darstellung der regionalen Verteilung von intrapulmonal appliziertem Surfactant (S) nach 240 Minuten Therapie, durch Darstellung der Fluoreszenzintensitäten des im S gelösten FF. Die Lungen befanden sich alle in Rückenlage. Wie Abb. 10b schematisch zeigte, blickte man von basal nach apikal, die linke Bildseite entsprach demnach der rechten Lunge, die rechte Bildseite der linken Lunge. Die Abkürzungen standen für: ve – ventral, do – dorsal, ap – apikal, ba – basal, de – dexter, si – sinister. Durch die unterschiedliche Höhe der gemessenen Fluoreszenzintensität pro Würfelgewicht (Q) entstand ein Intensitätsspektrum, das von blau (niedriges Q) bis rot (hohes Q) reichte. Die Verteilung von Q zeigte hier ein eher homogeneres Verteilungsmuster. Ebenfalls erkennt man hier gut den Größenunterschied zwischen der S- und der PFC-Lunge.

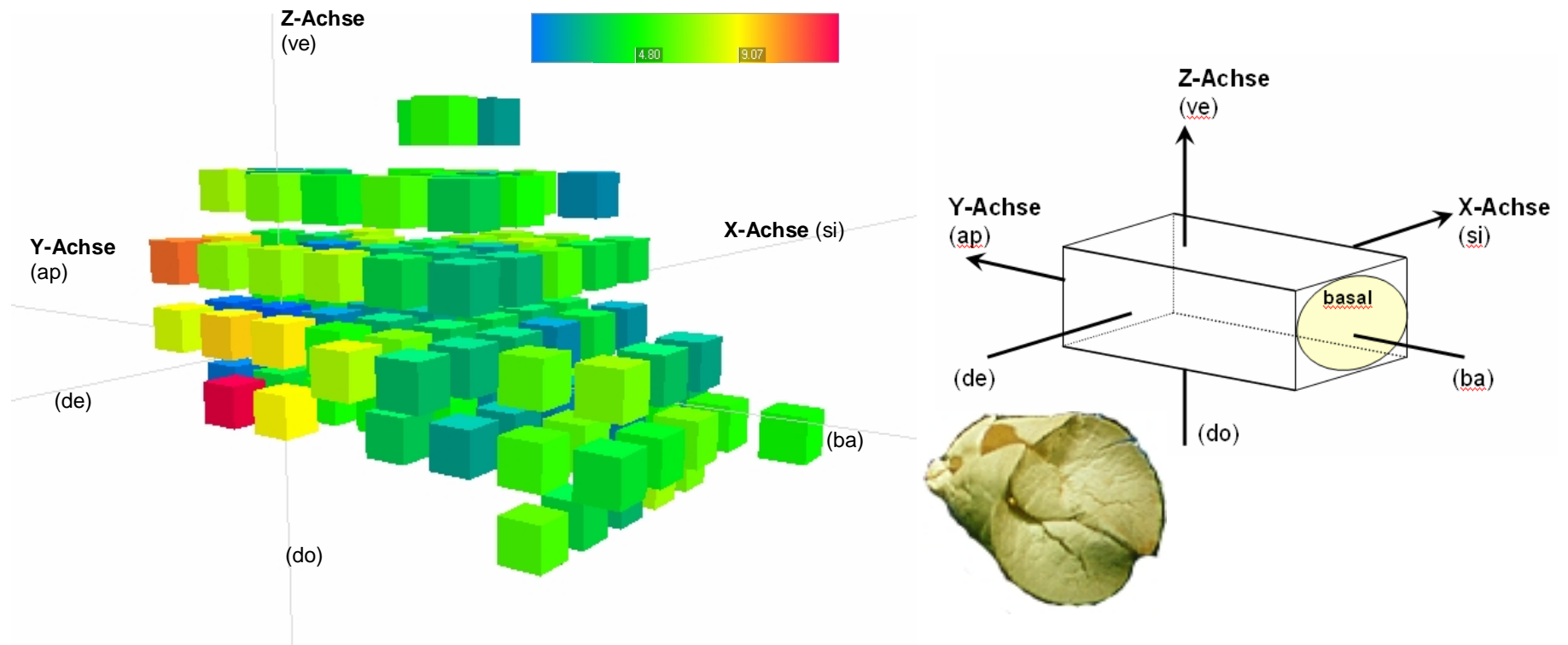


Abb. 11a: Ansicht der S-Verteilung von basal und seitlich rechts sowohl im 3-dimensionalen Würfelmodell als auch schematisch und als Foto der gefriergetrockneten Lunge (Abb. 11b). Die Abkürzungen standen für: ve – ventral, do – dorsal, ap – apikal, ba – basal, de – dexter, si – sinister. Nach Rotation der Lunge um die Z-Achse zeigte sich hier exemplarisch wie auch schon in der Ansicht von basal die eher homogenere Verteilung des S, wobei es zu einer Mehranreicherung von S in verschiedenen kleineren Bereichen der Lunge kam. Das Spektrum der Fluoreszenzintensität (INT) reicht von blau (niedrige INT/mg = Q) bis rot (hohe INT/mg). Die 3 Achsen treffen sich jeweils im Nullpunkt des Koordinatensystems (Carina).

### 3.2.1.2 Regionale Verteilung (ventral-dorsal):

Die statistische Auswertung der regionalen intrapulmonalen Verteilung des FF Yellowgreen von ventral nach dorsal zeigte sowohl zwischen als auch innerhalb beider Therapiegruppen (PFC, S) signifikante Unterschiede.

Bei der Auswertung der regionalen Verteilung anhand des Nullpunkts (zentrale Schicht) ist auf der Y-Achse die prozentuale Abweichung vom errechneten Mittelwert Q (MW, 95%-Konfidenzintervall) dargestellt (siehe 2.2.10). Die X-Achse zeigt die regionale Aufteilung der Lungen von ventral nach dorsal.

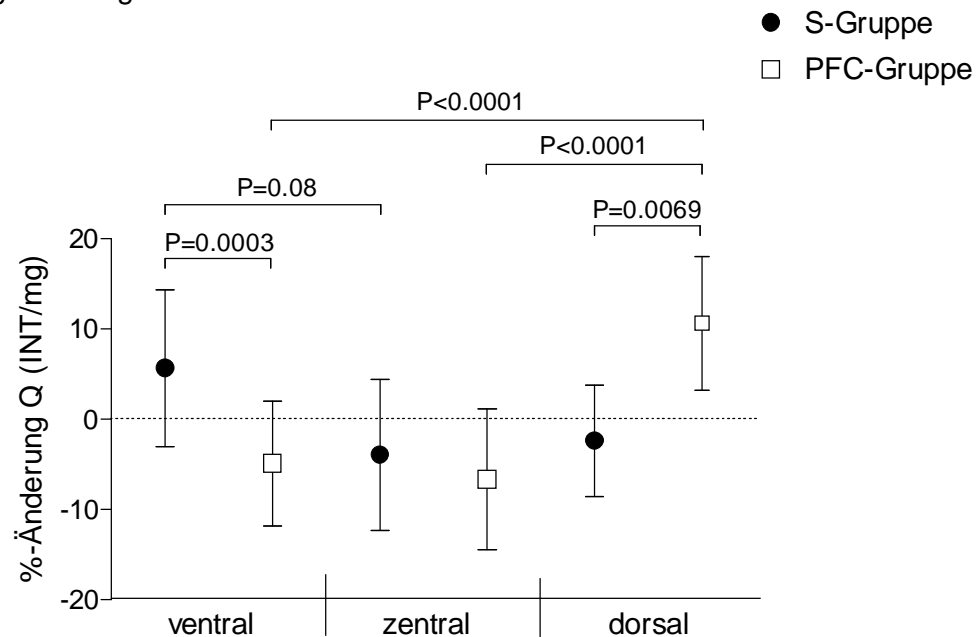


Abb. 12: Graphische Darstellung der regionalen Verteilung des FF Yellowgreen von ventral nach dorsal (X-Achse) als prozentuale Änderung von Q (INT/mg) nach Berechnung des Mittelwerts von Q in der jeweiligen Gruppe (PFC, S). Die Nulllinie entspricht dabei dem berechneten Mittelwert (Q) innerhalb der jeweiligen Gruppe (Siehe 2.2.10).

Zwischen den Gruppen zeigte die PFC-Gruppe gegenüber S in der Region dorsal sig. höhere Werte ( $p=0.0069$ ), wobei die S-Gruppe in der Region ventral sig. höhere Werte (Q) gegenüber der PFC-Gruppe ( $p=0.0003$ ) aufwies. Innerhalb der Gruppen kam es in der PFC-Gruppe zu sig. höheren Werten (Q) bei Vergleich der Regionen ventral vs. dorsal sowie zentral vs. dorsal ( $p<0.0001$ ). Trotz tendenziell höherer Werte (Q) in der S-Gruppe in der Region ventral, ist dies gegenüber zentral ( $p=0.08$ ) und dorsal nicht statistisch signifikant.

Zwischen beiden Gruppen zeigte die PFC-Gruppe dorsal sig. höhere Werte ( $p=0.0069$ ), gegenüber der S-Gruppe (siehe Abb. 12). Demgegenüber lagen bei Betrachtung der



ventralen Lungenschichten in der S-Gruppe sig. höhere Werte ( $p=0.0003$ ) im Vergleich zur PFC-Gruppe vor.

Innerhalb der PFC-Gruppe bestand in der Ausbreitung von ventral nach dorsal (ventral vs. dorsal, zentral vs. dorsal) ebenfalls ein signifikanter Unterschied ( $p<0.0001$ ) mit höheren Werten (Q) in dorsalen Lungenregionen, dargestellt als höchste Abweichung vom errechneten Mittelwert Q (Abb. 12). Die S-Gruppe zeigte die höchsten Werte (Q) in der Region ventral gegenüber zentral und dorsal, jedoch war dies nicht statistisch signifikant ( $p=0.08$  ventral vs. zentral).

Eine weitere Methode zur Betrachtung der intrapulmonalen Farbstoffverteilung bestand in der Normierung der Lungen auf 8 Schichten (siehe Abb. 13, 2.2.10). Hier zeigten sich in der PFC-Gruppe, gegenüber der S-Gruppe, sowohl in der Darstellung der Gesamtmenge an FF als auch in der kumulativen Menge eine Mehranreicherung an FF in den dorsalen Lungenanteilen.

Die obere Abbildung (Abb. 13) zeigt auf der Y-Achse die Menge an Fluoreszenzfarbstoff (in %) innerhalb der jeweiligen Lungenschichten und Therapiegruppe an. Hier erkannte man in der PFC-Gruppe eine höhere Menge an FF in den dorsalen Lungenschichten gegenüber der S-Gruppe, mit anteilig mehr FF in den ventralen Schichten.

Die Darstellung der kumulativen FF-Menge (Y-Achse, untere Abb.13) demonstrierte ebenfalls die zuvor beschriebene Mehranreicherung des FF in die abhängigen (dorsalen) Lungenschichten innerhalb der PFC-Gruppe, im Vergleich zu S (72% vs. 58%), die statistisch signifikant war ( $p<0.001$ ).

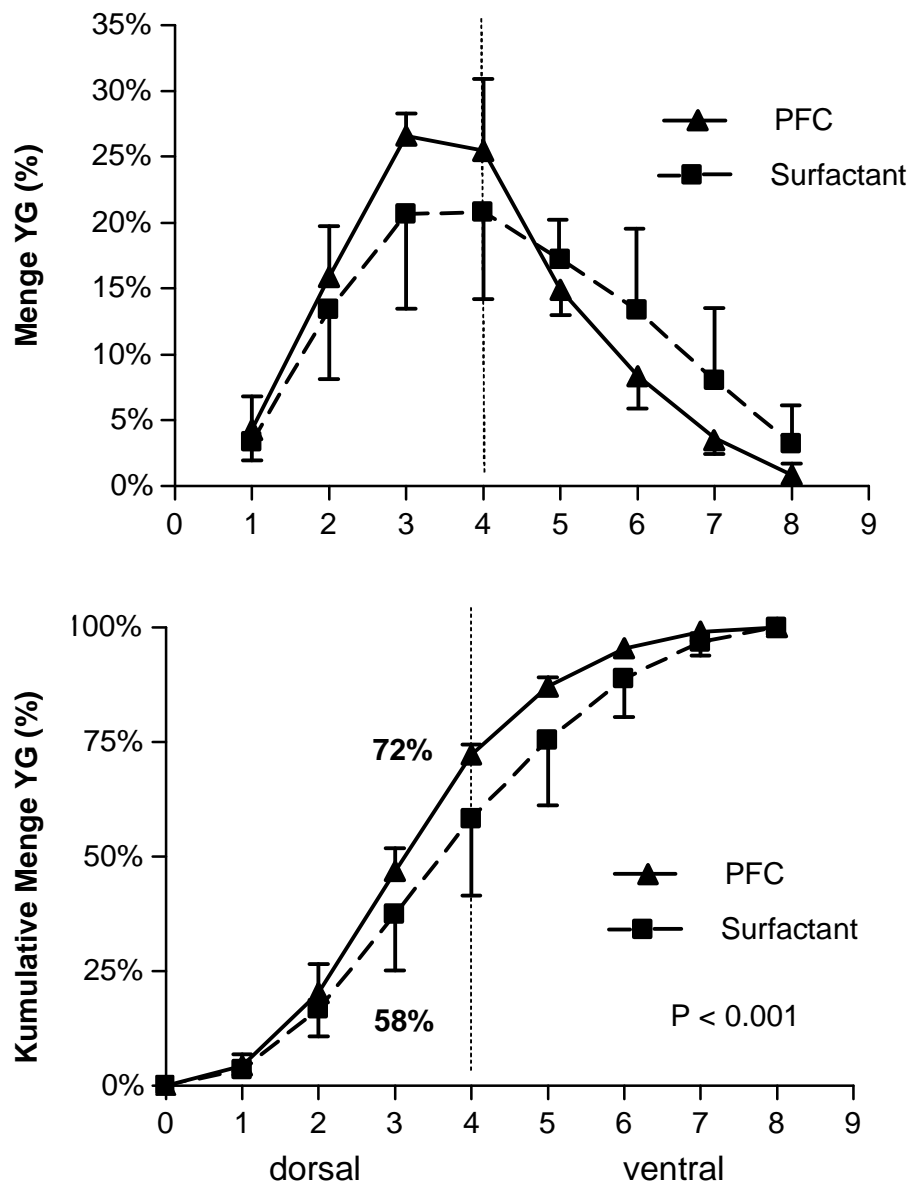


Abb. 13: Graphische Darstellung der regionalen Verteilung des FF Yellowgreen von ventral nach dorsal (X-Achse, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall) nach Normierung der Lungen auf 8 Schichten. In der oberen Abbildung ist auf der Y-Achse die Gesamtmenge an FF (in %) innerhalb der jeweiligen Therapiegruppe dargestellt. Hier sieht man eine Mehranreicherung des FF in den dorsalen Lungenschichten in der PFC Gruppe gegenüber der S-Gruppe, mit anteilig mehr FF in den ventralen Lungenschichten.

Die Y-Achse der unteren Abbildung zeigte die kumulative Menge an FF (in %) der jeweiligen Gruppe, mit einer sig. höheren Menge an FF in den dorsalen Lungenschichten (PFC-Gruppe), gegenüber der S-Gruppe (72% vs. 58%).

### 3.2.1.3 Regionale Verteilung (apikal-basal):

Es wurde die regionale Verteilung von S und PFC in der Ausbreitungsrichtung von apikal nach basal untersucht. Auf der Y-Achse ist die prozentuale Abweichung vom Mittelwert Q (Nulllinie) innerhalb der jeweiligen Gruppe (S, PFC) und Lungenregion abgebildet (Mittelwert, 95%-Konfidenzintervall). Die X-Achse zeigt die entsprechenden Lungenregionen von apikal über zentral nach basal (siehe 2.2.9). In beiden Gruppen fanden sich die höchsten Werte für Q in der Lungenregion basal mit entsprechend positiver Abweichung von der Nulllinie, sowie eine Abnahme von Q in Richtung apikal gelegene Lungenschichten. Hierbei zeigte die PFC-Gruppe sowohl in zentral als auch apikal eine höhere prozentuale Abweichung von der Nulllinie gegenüber der S-Gruppe. Dies entsprach innerhalb der PFC-Gruppe geringeren Messwerten von Q in den Regionen zentral und apikal gegenüber der Region basal. Innerhalb beider Gruppen kam es zwischen den Regionen basal-zentral und basal-apikal zu sig. Unterschieden, lediglich die PFC-Gruppe zeigte ebenfalls einen sig. Unterschied zwischen den Regionen zentral und apikal. Zwischen den Gruppen erbrachte die statistische Analyse der prozentualen Änderung von Q als Abweichung vom Mittelwert (Nulllinie) keine signifikanten Unterschiede siehe Abb. 14).

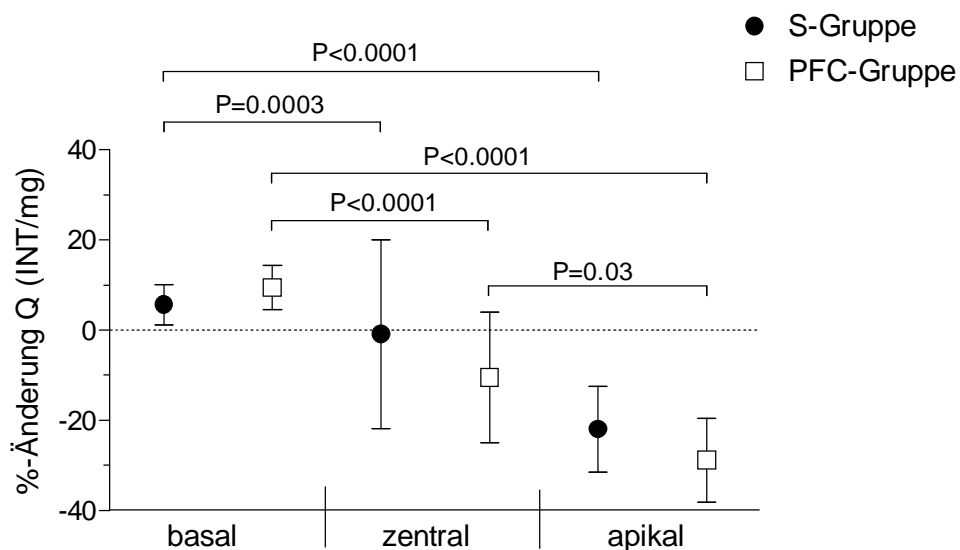


Abb. 14: Regionale Verteilung des FF Yellowgreen von ventral nach dorsal (X-Achse, Mittelwert, 95%-Konfidenzintervall) als prozentuale Änderung von Q (INT/mg) in der jeweiligen Gruppe (Y-Achse). In beiden Gruppen fanden sich die höchsten Intensitäten pro Würfelgewicht in der Region basal. In der Ausbreitungsrichtung von basal nach apikal zeigten beide Gruppen geringere Messwerte (%-Änderung Q) mit entsprechender negativer Abweichung von der Nulllinie.

### **3.2.2 Totales Lungenvolumen:**

#### **3.2.2.1 Totales Lungenvolumen und Ratio:**

Die Berechnung des totalen Lungenvolumens der gefriergetrockneten Lungen unter Einbeziehung der Randstücke (siehe 2.2.11.1) ergab signifikant höhere Werte in der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe (siehe Tab. 3). Der Vergleich der Gewichte der gefriergetrockneten Lungen zwischen beiden Gruppen erbrachte keinen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Tab. 3). Hierbei fiel jedoch auf, dass die Lungen nach PFC-Therapie optisch größer wirkten. Nach Präparation der Lungen in Würfel (LC) und statistischer Auswertung konnte der bereits optische Eindruck bestätigt werden. Die Lungen der PFC-Gruppe hatten tendenziell eine höhere Anzahl an Gewebewürfeln (nLC), dies war jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant. Berechnete man nun das Verhältnis („Ratio“) von Lungengewicht pro Anzahl der gefriergetrockneten Würfel (nLC), so kam es zu sig. niedrigeren Werten in der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe (siehe Tab. 3).

Diese Ergebnisse zeigten, dass nach 240 min Therapie die Lungen Gruppe gegenüber der S-Gruppe eine höhere Anzahl an Lungenwürfeln bezogen auf das Gewicht der gefriergetrockneten Lungen besaßen, zu sehen sowohl am unterschiedlichen Lungenvolumen als auch in der Berechnung der Ratio.

#### **3.2.2.2 Lungendichte**

Die anschließende Berechnung der Lungendichte (Gewicht der gefriergetrockneten Lungen pro Lungenvolumen) erbrachte einen hochsignifikanten Gruppenunterschied, zugunsten einer verminderten Lungendichte in der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe ( $P < 0.001$ , siehe Tab. 3).

#### **3.2.2.3 Pulmonary Expansion Factor (PEF)**

Auf der Basis der Ratio (Lungengewicht pro Anzahl der gefriergetrockneten Würfel) wurde ein Faktor berechnet (PEF, Pulmonary Expansion Faktor), der eine Aussage über die Änderung der Größenzunahme der Lungen nach 240 min Therapiedauer ermöglichte.

Im Vergleich zur S-Gruppe ergab sich für die PFC-Gruppe der Faktor 1.38 (PEF), als mathematisches Korrelat für eine Zunahme der Lungenexpansion von 38% nach 240 Minuten Therapie mit PFC.

Tab. 3: Tabellarische Übersicht (MW  $\pm$  SD) von Lungengewicht (in mg), Anzahl der Lungengewebewürfel (nLC), dem Verhältnis aus Lungengewicht pro nLC (Ratio), dem berechneten Lungenvolumen (ml) und der Lungendichte (mg/ml) beider Therapiegruppen (PFC vs. S).

Das Gewicht der gefriergetrockneten Lungen zeigte keinen sig. Unterschied. Die Betrachtung der Würfelanzahl ergab lediglich einen Trend in Richtung einer höheren Anzahl Würfeln in der PFC-Gruppe. Bei der Berechnung der Ratio (Lungengewicht pro nLC) zeigte sich jedoch der bereits vorher erkennbare Unterschied zwischen den Gruppen ( $P < 0.001$ ).

Die gefriergetrockneten Lungen der S-Gruppe fielen sowohl durch ein sig. geringeres Lungenvolumen als auch durch eine höhere Lungendichte gegenüber der PFC-Gruppe auf.

Mittelwert $\pm$ SD	S-Gruppe	PFC-Gruppe	p-Wert
Lungengewicht [mg]	1790 $\pm$ 483	1643 $\pm$ 292	= 0.463
nLC	133 $\pm$ 37	167 $\pm$ 25	= 0.072
Ratio	13,59 $\pm$ 1,16	9,84 $\pm$ 0,81	< 0.001
Volumen [ml]	26,07 $\pm$ 7,95	34,28 $\pm$ 6,13	< 0.05
Dichte [mg/ml]	69,39 $\pm$ 5,42	48,07 $\pm$ 5,02	< 0.001

### **3.2.3 Gasaustausch:**

Die untersuchten Versuchstiere waren alle < 12 Stunden alt und hatten ein Gewicht von  $678 \pm 156$ g. Bezüglich des Gewichts der Tiere ergab sich nach Randomisierung in beide Therapiegruppen kein signifikanter Gruppenunterschied (S-Gruppe  $679 \pm 169$ , n=7; PFC-Gruppe  $676 \pm 156$ , n=8).

Im Folgenden wurde der Einfluss beider Therapieformen (PFC vs. S) nach induzierter Lungenschädigung auf den Gasaustausch untersucht. Die statistische Analyse der Messergebnisse für den Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ,  $\text{PaCO}_2$ ) zeigte einen Unterschied zwischen beiden Gruppen zugunsten sig. höheren  $\text{PaCO}_2$ -Werten zum Messzeitpunkt 2 (LI) in der S-Gruppe (siehe Tab. 4). Zu diesem Zeitpunkt hatten alle Tiere Anzeichen einer schweren respiratorischen Insuffizienz mit ausgeprägter respiratorischer Azidose und Hypoxie, wobei nach standardisierter Induktion der Lungenschädigung der Gruppenunterschied nicht zu erklären war.

#### **3.2.3.1 Ventilatory Efficacy Index (VEI):**

Die Berechnung des VEI vor („Baseline“) und nach induzierter Lungenschädigung („LI“), sowie nach 240min Therapie („240min“), erbrachte keinen sig. Unterschied zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 14, Tabelle 4). Innerhalb beider Gruppen kam es erwartungsgemäß zu einem sig. Abfall des VEI zum Messzeitpunkt 2 (LI) und nach Therapie für 240 Minuten (Messzeitpunkt 3) zu einem sig. Anstieg mit Annäherung des VEI an die Ausgangswerte, wobei die S-Gruppe noch signifikant niedrigere Werte ( $p=0.03$ ) gegenüber dem Messzeitpunkt „Baseline“ aufwies (Abb. 15).

Die Untersuchung möglicher „Kurzzeiteffekte“ zeigte zwischen beiden Therapieformen (PFC, S) einen signifikanten Unterschied. In der S-Gruppe kam es gegenüber der PFC-Gruppe nach 30 Minuten ( $p<0.01$ ) und 60 Minuten ( $p<0.05$ ) zu einer signifikant höheren prozentualen Änderungen des VEI. Die PFC-Gruppe zeigte gegenüber der S-Gruppe innerhalb der ersten 60 Minuten Therapie tendenziell niedrigere Werte, mit einem nicht so raschen Anstieg in der Änderung des VEI (Abb. 16).

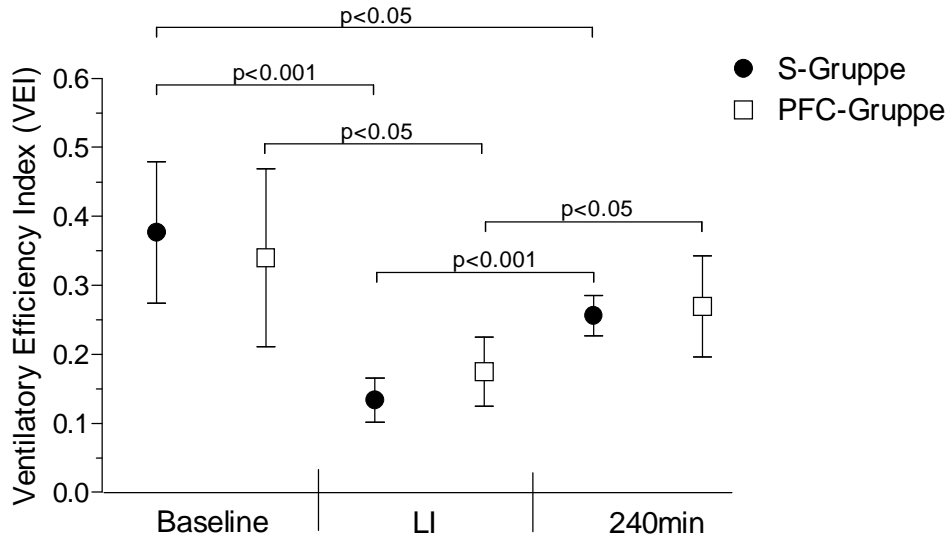


Abb. 15: Graphische Darstellung des Ventilatory Efficacy Index (Y-Achse) zu den Messzeitpunkten Baseline, LI und 240min (X-Achse). Die Werte sind als MW±SD angegeben. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen bestanden zwischen den Messzeitpunkten Baseline vs. LI sowie LI vs. 240min und in der S-Gruppe bei Baseline vs. 240min.

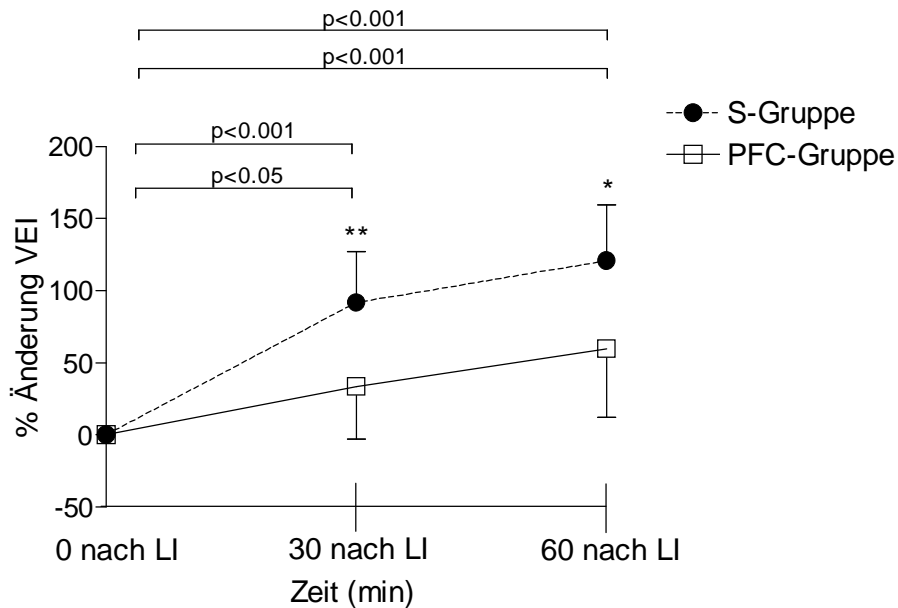


Abb. 16: Darstellung der kurzzeitigen Therapieeffekte anhand des VEI als prozentuelle Änderung (% Änderung VEI), ausgehend vom Messzeitpunkt „LI“ (Nullwert). Die X-Achse zeigt den zeitlichen Verlauf nach Induktion der Lungenschädigung („LI“) an. Die Y-Achse stellt die Höhe (% Änderung VEI) 0, 30 und 60 Minuten nach LI dar. Zwischen den Gruppen kam es zu sig. Unterschieden nach 30 und 60 min (\*\* p<0.01, \* p<0.05). Innerhalb der Gruppen lagen ebenfalls sig. Unterschiede vor, jedoch mit tendenziell geringeren Werten und geringerer Anstiegssteilheit der % Änderung VEI in der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe.

### 3.2.3.2 Oxygenation Index (OI):

Nach experimenteller Induktion der Lungenschädigung („LI“) kam es erwartungsgemäß zu einem Anstieg des OI, mit einem sig. Unterschied ( $p < 0.001$ ) innerhalb der Gruppen zwischen den Messzeitpunkten Baseline vs. LI (Abb. 17). Sowohl die Applikation von PFC als auch von Surfactant führten in beiden Gruppen nach 240 Minuten Therapie-dauer zu einem statistisch sig. Abfall des OI ( $p < 0.001$ ) zwischen den Messzeitpunkten LI vs. 240min. Im Vergleich zur Ausgangsmessung (Baseline) kam es innerhalb beider Gruppen zu einer sig. Verbesserung des OI nach 240 Minuten (240min), mit einer höheren Signifikanz in der S-Gruppe ( $p < 0.001$ ) gegenüber der PFC-Gruppe ( $p < 0.01$ ), wobei sowohl die Ausgangswerte als auch die Werte zum Messzeitpunkt 240min in der S-Gruppe homogener waren als in der PFC-Gruppe.

Der statistische Vergleich zwischen beiden Gruppen zeigte keinen sig. Unterschied.

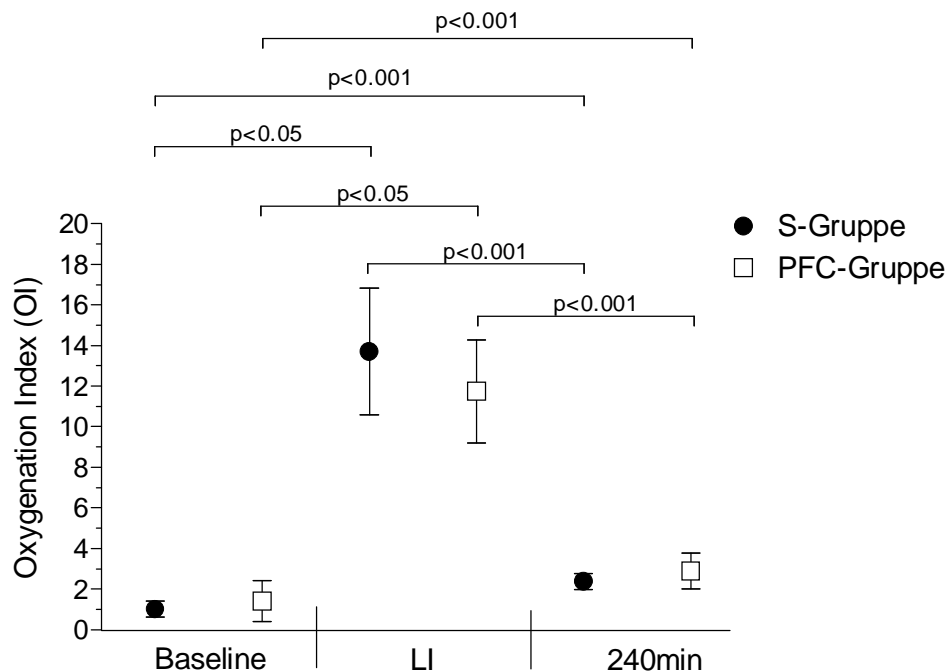


Abb. 17: Graphische Darstellung des Oxygenation Index ( $MW \pm SD$ ) beider Therapiegruppen (PFC, S) zu den 3 Messzeitpunkten „Baseline“, „LI“ und „240min“. Auf der X-Achse sind die 3 Messzeitpunkte abgebildet, die Y-Achse stellt die Höhe des berechneten OI dar.

In der Untersuchung möglicher Kurzzeiteffekte auf den OI (S, PFC), wurde hier ebenfalls die prozentuelle Änderung (% Änderung OI) nach induzierter Lungen-



schädigung (LI) untersucht (Abb. 18). Hier zeigte sich innerhalb des Behandlungszeitraums von 60 min bezogen auf die prozentuale Änderung des OI kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

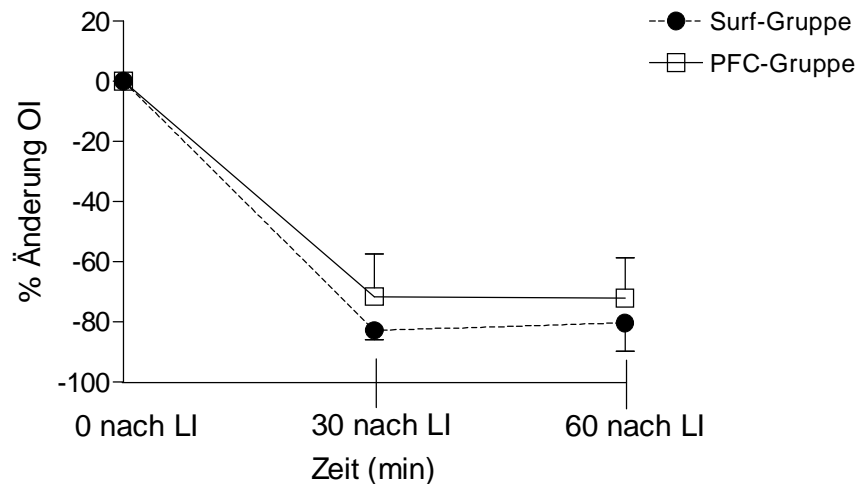


Abb. 18: Darstellung des kurzzeitigen Therapieeffekts (S, PLV) als prozentuale Änderung des Oxygenation Index (% Änderung OI) nach induzierter Lungenschädigung (LI). 30 und 60 Minuten nach LI bestand kein sig. Unterschied zwischen den Gruppen. Darstellung der Werte als  $MW \pm SD$ .

### 3.2.3.3 Arterio-endexpiratorische $CO_2$ -Differenz ( $P(a-et)CO_2$ ):

Nach Induktion der akuten Lungenschädigung, kam es bei allen Versuchstieren zu einem Anstieg des  $PaCO_2$  (Tab. 4). Korrelierend zur arteriellen  $PaCO_2$ -Bestimmung zeigte die Bestimmung des endexpiratorischen Kohlendioxidgehaltes ( $etCO_2$ ) ebenfalls einen Anstieg zum Messzeitpunkt 2 (LI). In der S-Gruppe von  $30,55 \pm 7$  mmHg auf  $38,79 \pm 10$  mmHg, in der PFC-Gruppe von  $32,91 \pm 9$  mmHg auf  $33,76 \pm 9$  mmHg (Tab. 4). Innerhalb beider Gruppen fiel die  $etCO_2$  nach 240 Minuten (Messzeitpunkt 3) auf Werte unterhalb der Ausgangswerte ab, was in der PFC-Gruppe statistisch sig. war ( $p < 0.05$ ). Ein Vergleich der Werte zwischen beiden Gruppen zeigte zu keinem Messzeitpunkt ein statistisch sig. Unterschied. Aufgrund eines Gerätefehlers, waren zum Messzeitpunkt Baseline von jeweils einem Versuchstier beider Gruppen keine  $etCO_2$ -Messwerte vorhanden. Der Vergleich zwischen dem arteriellen ( $PaCO_2$ ) und dem endexpiratorischen  $CO_2$ -Gehalt ( $etCO_2$ ) als Maß für den alveolären Totraum wurde unter Verwendung der arterio-endexpiratorischen  $CO_2$ -Partialdruckdifferenz ( $P(a-et)CO_2$ ) untersucht (Abb. 19, Tabelle 4).

Trotz standardisierter Prämedikation und Randomisierung der Tiere kam es zwischen den Gruppen in der Ausgangsmessung (Baseline) zu sig. niedrigeren Werten in der PFC-Gruppe. Nach Induktion der Lungenschädigung (LI) und iatrogenen Verlängerung der Diffusionsstrecke für das Kohlendioxid, kam es erwartungsgemäß zu einem Anstieg des PaCO<sub>2</sub> innerhalb beider Gruppen. Dies war in der PFC-Gruppe aufgrund des vorausgegangenen geringeren Ausgangsniveaus wiederum signifikant. Ebenfalls zeigte die PFC-Gruppe über alle 3 Messzeitpunkte einen kontinuierlichen Anstieg der arterio-endexpiratorischen CO<sub>2</sub>-Differenz, wogegen es in der S-Gruppe nach 240 Minuten Therapie zu einem signifikanten Abfall der Messwerte in Richtung Ausgangswerte kam (Abb. 19, Tabelle 4).

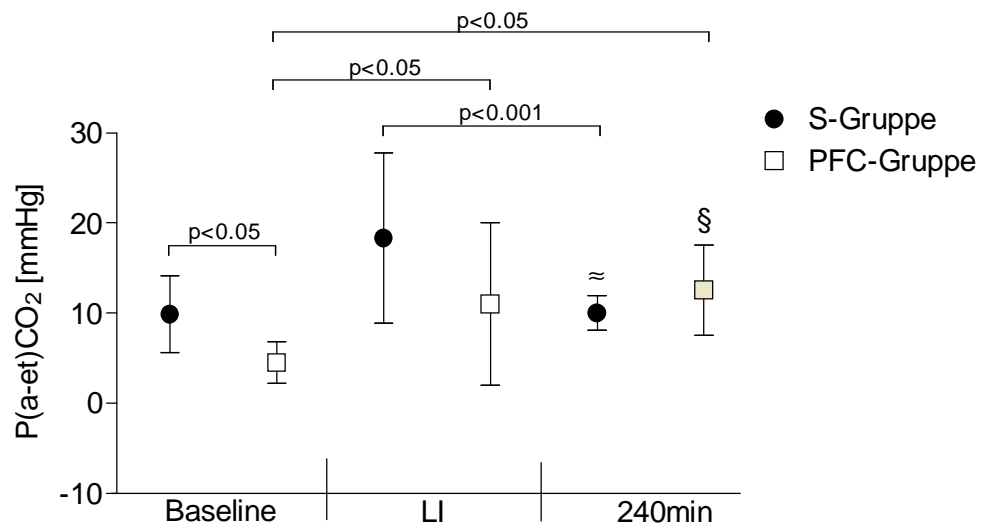


Abb. 19: Graphische Darstellung der arterio-endexpiratorischen CO<sub>2</sub>-Differenz (P(a-et)CO<sub>2</sub>) zu den 3 Messzeitpunkten Baseline, LI und 240min. Innerhalb der Gruppen zeigte sich ein statistisch sig. Unterschied zwischen Baseline vs. LI und Baseline vs. 240min in der PFC-Gruppe sowie bei LI vs. 240min in der S-Gruppe. Im Gegensatz zur PFC-Gruppe mit einem kontinuierlichen Anstieg der P(a-et)CO<sub>2</sub> über den Versuchszeitraum, zeigten die Ergebnisse der S-Gruppe nach 240 min Therapie einen sig. Abfall der P(a-et)CO<sub>2</sub> in Richtung Ausgangswerte.

### **3.2.4 Hämodynamik:**

Die Herzfrequenz (HF) und der mittlere arterielle Blutdruck (MBP) zeigten während der gesamten Therapiedauer in beiden Gruppen einen stabilen Verlauf. Zu Beginn der Studie (Baseline) wurden bei allen Tieren die höchsten Blutdruckwerte registriert (S-Gruppe  $50\pm 11$  mmHg, PFC-Gruppe  $44\pm 9$  mmHg). Während der Studiendauer fielen die Werte zunächst leicht ab, bevor sie sich im weiteren Therapieverlauf stabilisierten (siehe Tab. 5).

#### **3.2.4.1 Herzfrequenz (HF):**

Die Messung der HF zeigte keinen signifikanten Unterschied über den gesamten Versuchszeitraum (Baseline, LI und 240min), sowohl zwischen als auch innerhalb beider Therapiegruppen. In der S-Gruppe lag die HF über den gesamten Versuchszeitraum auf einem höheren Niveau im Vergleich zur PFC-Gruppe (siehe Tab. 5).

#### **3.2.4.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MBP):**

In der statistischen Analyse des mittleren arteriellen Blutdrucks (MBP) ergaben sich über die gesamte Studiendauer keine sig. Veränderungen, weder innerhalb einer Gruppe noch zwischen beiden Gruppen (Tabelle 5). Über den Therapiezeitraum von 240 Minuten kam es in beiden Gruppen jedoch in der Tendenz zu einem Abfall der Blutdruckwerte. Die Ausgangswerte lagen bei  $50\pm 11$  mmHg in der S-Gruppe und  $44\pm 9$  in der PFC-Gruppe. Nach 240 min Therapiedauer (240min) zeigten sich die niedrigsten Messwerte (S-Gruppe  $39\pm 4$  mmHg, PFC-Gruppe  $38\pm 5$  mmHg).

### **3.2.5 Sauerstoffsättigung (SaO<sub>2</sub>), pH-Wert, Basenabweichung (BE):**

Bei der statistischen Auswertung der Messwerte für arterielle Sauerstoffsättigung (SaO<sub>2</sub>), pH-Wert und aktueller Basenabweichung (BE), ergaben sich zu den untersuchten Messzeitpunkten (Baseline, LI, 240min) ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen S und PFC (Tabelle 5).

Die SaO<sub>2</sub> fiel nach Lungenschädigung (LI) in beiden Gruppen  $<90\%$  ab (MW  $89\pm 5\%$

S-Gruppe, 89±10% PFC-Gruppe), und zeigte im Verlauf der gesamten Therapiedauer bei einer fraktionellen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO<sub>2</sub>) von 1.0 einen stabilen Verlauf.

Innerhalb der Gruppen kam es erwartungsgemäß nach induzierter Lungenschädigung (LI) zu sig. Veränderungen des pH-Wertes, in der S-Gruppe von 7,46±0,04 auf 7,28±0,10 (p<0.01), in der PFC-Gruppe von 7,47±0,08 auf 7,36±0,10 (p<0.05). Beim Vergleich des pH-Wertes zwischen der Ausgangsmessung (Baseline) und 240 min Therapie (240min) fiel zudem auf, dass sich innerhalb beider Gruppen die Messdaten wieder an die Ausgangswerte annähernten, in der S-Gruppe von auf 7,46±0,02 und in der PFC-Gruppe auf 7,45±0,09.

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der respiratorischen Parameter beider Therapiegruppen (PFC, S). Die Ein statistisch signifikanter Unterschied lag immer bei  $p < 0.05$ .

Sig. Unterschiede zwischen der S- und PFC-Gruppe wurde gekennzeichnet durch (\*).

Der Vergleich innerhalb der Gruppen erfolgte zu den Messzeitpunkten „Baseline vs. LI“ (<sup>a</sup>), „Baseline vs. 240min“ (<sup>b</sup>) und „LI vs. 240min“ (<sup>c</sup>).

	Baseline		LI		240min	
	S	PFC	S	PFC	S	PFC
PaO <sub>2</sub> [mmHg]	73,40 ± 16,79	67,84 ± 11,66	62,69 ± 12,16	66,00 ± 12,72	327,6 ± 57,46 <sup>b,c</sup>	269,0 ± 68,32 <sup>b,c</sup>
PaCO <sub>2</sub> [mmHg]	40,19 ± 5,06	37,49 ± 8,04	57,13 ± 10,43 <sup>a</sup>	44,79 ± 11,01 <sup>*</sup>	35,74 ± 3,61 <sup>c</sup>	36,06 ± 9,96
etCO <sub>2</sub> [mmHg]	30,55 ± 6,56	32,91 ± 9,20	38,79 ± 10,28	33,76 ± 8,76	25,72 ± 2,88 <sup>c</sup>	23,49 ± 5,40 <sup>b,c</sup>
P(a-et) CO <sub>2</sub> [mmHg]	9,88 ± 4,28	4,53 ± 2,28 <sup>*</sup>	18,34 ± 9,43	11,02 ± 9,01 <sup>a</sup>	10,03 ± 1,91 <sup>c</sup>	12,57 ± 5,02 <sup>b</sup>
OI	1,02 ± 0,39	1,41 ± 1,00	13,70 ± 3,12 <sup>a</sup>	11,74 ± 2,55 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,38 <sup>b,c</sup>	2,90 ± 0,87 <sup>b,c</sup>
VEI	0,38 ± 0,10	0,34 ± 0,13	0,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>b,c</sup>	0,27 ± 0,07 <sup>c</sup>

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse für Hämodynamik (HF, mittlerer arterieller Blutdruck MBP) sowie für pH-Wert und BE beider Gruppen. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag immer bei  $p < 0.05$ .

Sig. Unterschiede zwischen der S- und PFC-Gruppe wurde gekennzeichnet durch (\*).

Vergleiche innerhalb der Gruppen erfolgten zu den Messzeitpunkten „Baseline vs. LI“ (<sup>a</sup>), „Baseline vs. 240min“ (<sup>b</sup>) und „LI vs. 240min“ (<sup>c</sup>).

	Baseline		LI		240min	
	S	PFC	S	PFC	S	PFC
SaO <sub>2</sub> [%]	97 ± 3	96 ± 3	89 ± 5 <sup>a</sup>	89 ± 10	100 ± 1 <sup>c</sup>	99 ± 2 <sup>b,c</sup>
HF [min <sup>-1</sup> ]	119 ± 16	114 ± 18	125 ± 26	122 ± 18	132 ± 27	124 ± 23
MBP [mmHg]	50 ± 11	44 ± 9	44 ± 5	41 ± 6	39 ± 4	38 ± 5
pH	7,46 ± 0,04	7,47 ± 0,08	7,28 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,36 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,46 ± 0,02 <sup>c</sup>	7,45 ± 0,09
BE [mmHg]	4 ± 2	3 ± 2	-1 ± 6	-1 ± 3 <sup>a</sup>	2 ± 1	1 ± 2

#### **4. Diskussion:**

Die vorliegende Studie untersuchte die intrapulmonale Verteilung von Perfluorkarbonen (PFC) im Vergleich zu exogenem Surfactant (S), nach experimentell induzierter Lungenschädigung bei neugeborenen Ferkeln. Zudem wurde der Einfluss beider Therapieformen (PFC, S) auf das Lungenvolumen und die Lungengewebsdichte sowie auf respiratorische und hämodynamische Parameter untersucht und miteinander verglichen.

Die Induktion der Lungenschädigung erfolgte hierbei durch eine Surfactantdepletion. Hervorgerufen durch repetitive bronchoalveoläre Lavage mit physiologischer Kochsalzlösung (<sup>3;81</sup>), konnte hierdurch bei allen Tieren experimentell ein ARDS erzeugt werden. Die untersuchten Tiere waren alle reifgeborene Ferkel mit einem Lebensalter von weniger als 12 Lebensstunden. Die Ferkel sind dem Neugeborenen aufgrund einer vergleichbaren pulmonalen Anatomie für diese Studienreihe geeignet (<sup>87;88</sup>). Das hier verwendete Modell entsprach somit einem Neugeborenen-Schädigungsmodell, wobei die Gewichte der Ferkel (MW 678g, 435g - 960g) verglichen mit anderen Studien sehr niedrig lagen (MW 1,51kg, 915g - 2415g) (<sup>28;30;73;80;85</sup>).

Die Darstellung der intrapulmonalen Verteilung erfolgte in unserer Studie durch direkte Fluoreszenzmarkierung beider Substanzen (PFC, S). Durch die 3-dimensionale Rekonstruktion der Lungen im Würfelmodell, wurde zudem eine Visualisierung mit ausreichend hoher Auflösung der intrapulmonalen regionalen Verteilung von PFC und S erzielt. Die Möglichkeit einer regionalen Verteilungsdarstellung beider Substanzen gelang in bisherigen Studien zumeist durch histologische oder bildgebende Verfahren (<sup>17;20-30;89-91</sup>). Bislang fehlte jedoch ein geeignetes Verfahren, das einen Vergleich zwischen der intrapulmonalen Verteilung beider Substanzen ermöglichte. Als Aerosol applizierte fluoreszierende Microsphären und intravenös verabreichte fluoreszenzmarkierte und radioaktivmarkierte Microsphären konnten in verschiedenen Studien als Marker für Ventilations- und Perfusionsuntersuchungen gute Ergebnisse liefern (<sup>37;77;92</sup>). Der Versuch Microsphären direkt im PFC zu lösen, gelang aufgrund inhomogener Lösungseigenschaften in der bei uns durchgeführten Versuchsreihe (siehe 2.1.1) nicht und fand entsprechend keine Verwendung zur Fluoreszenzmarkierung des PFC.

### Fluoreszenzmarkierung:

Um eine Aussage über die intrapulmonale Verteilung des PFC und Surfactant zu treffen, wurden beide Substanzen vor ihrer intratrachealen Applikation mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FF) markiert (siehe 2.1.2). Bisher gab es keine Studien oder Literaturangaben bezüglich der Fluoreszenzmarkierung von PFC und Surfactant durch Zugabe eines FF in seiner „Reinform“. Der FF Yellowgreen wurde in PFC und S gelöst und die durch manuelles Mischen und Vortexen entstandene Lösung auf ihre Homogenität hin überprüft (siehe 2.2.1).

Am Ende unserer Hauptversuchsreihe erfolgte nach Fixierung der Lungen die Extraktion des FF aus jedem Lungenwürfel mit anschließender spektrometrischer Messung der Fluoreszenzintensitäten (INT). Dabei dienten sowohl das PFC als auch das S als Carrier für den gelösten FF, so dass der FF-Nachweis einem indirekten Nachweis der entsprechenden Carrier-Substanzen entsprach. Hierdurch gelang eine indirekte Nachweismethode, um die intrapulmonale Verteilung von PFC und S darzustellen und miteinander vergleichen zu können. Diese Methode wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Studienergebnisse aus Verteilungsdarstellungen mit fluoreszenzmarkiertem Surfactant durch Microsphären konnten unter anderem zeigen, dass als Bolus appliziertes Surfactant gegenüber einer langsamen trachealen Instillation zu einer homogeneren Durchmischung führte<sup>(93;94)</sup>, weswegen auch bei uns eine Bolusapplikation verwendet wurde. Untersuchungen zur Darstellung der regionalen intrapulmonalen Verteilung von Surfactant erfolgten bisher durch radioaktive Markierung<sup>(90;93)</sup>, Fluoreszenzmarkierung von Surfactant-Bestandteilen<sup>(89)</sup> und Zugabe von farbmarkierten Microsphären<sup>(91;93)</sup>. Jedoch bezogen sich diese Ergebnisse vornehmlich auf lichtmikroskopische Darstellungen der Surfactantverteilung auf alveolärer Ebene ohne Darstellung innerhalb der gesamten Lunge, was durch die von uns verwendete Methode ermöglicht wurde.

### Intrapulmonale Verteilung:

In unserer Studie am Lungenschädigungsmodell neugeborener Ferkel sollte weiterhin überprüft werden, inwiefern nach trachealer Applikation von PFC und S regionale Verteilungsunterschiede zwischen beiden Substanzen bestanden.

Hier konnte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen in einer Mehrzahl bisheriger Studienergebnisse gezeigt werden, dass es durch partieller Flüssigkeitsbeatmung (PLV) zu einer eher homogenen Verteilung von PFC mit bevorzugter Anreicherung in den abhängigen (dorsobasalen) Bereichen der Lunge kam (<sup>31;32;45;95;96</sup>), vermutlich aufgrund des relativ hohen spezifischen Gewichts (<sup>24;32;59;96</sup>). Kelly et al. führte Computertomographie (CT)-Messungen zur Untersuchung der intrapulmonalen PFC-Verteilung (als Aerosol vs. tracheale Instillation) nach induzierter Lungenschädigung an Kaninchen durch (<sup>97</sup>). Nach Fixierung der Lungen in flüssigem NO (PEEP 4cmH<sub>2</sub>O) erfolgte eine regionale Aufteilung der Lungen anhand CT-Schichtungen in jeweils 3 Lungenregionen, ähnlich der bei uns durchgeführten Auswertungsmethode. Anschließende Dichtemessungen zeigten verglichen mit unseren Daten hier jedoch nicht, dass sich PFC in Abhängigkeit von der Applikationstechnik (PLV mit PFC, PFC als Aerosol, Kontrollgruppe) in verschiedenen Bereichen der Lungen regional unterschiedlich verteilte, weder in der Richtung von ventral nach dorsal, noch von apikal nach basal. Trotz einer ähnlichen Methode zur Induktion der Lungenschädigung und Fixiertechnik in flüssigem Stickstoff spekulierten wir, dass dies mit der Verwendung von reinem PF5080 als PFC, einer geringeren Menge an appliziertem PFC in der PFC-Gruppe (20ml/kg) oder einem unterschiedlichen PEEP während der Fixierung (4cmH<sub>2</sub>O vs. 10 cmH<sub>2</sub>O) zusammenhängen könnte.

Nach Auswertung unserer Ergebnisse stellte sowohl die Methode der Normierung der Lungen in eine gleiche Anzahl an Lungenschichten als auch die Methode mit Aufteilung der Lungen in drei Lungenregionen ein geeignetes Verfahren zur Darstellung regionaler Verteilungsunterschiede innerhalb der Lunge dar.

Unsere Ergebnisse basierten auf eine Therapie mit PFC und S von 240 Minuten Dauer. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Tiere während der gesamten Therapie in Rückenlage befanden, und auch während der Extraktion und Fixierung der Lungen keine Lageänderung mehr vollzogen wurde. Dadurch wurde eine nachträgliche Änderung der intrapulmonalen Verteilung der Substanzen, hervorgerufen durch eine Lageänderung der Tiere / Lungen von außen, verhindert. In diesem Zusammenhang konnte von Bull et al. demonstriert werden, dass es bei gesunden Kaninchen in Rückenlage, im Vergleich zu aufrechter Position, zu einer homogenen Verteilung von PFC kam (<sup>20</sup>). Unsere Studienergebnisse zeigten beim PFC ein bevorzugtes Verteilungsmuster in die dorsobasalen (abhängigen) Schichten der Lungen, indirekt gekennzeichnet durch eine Zunahme von Q (INT/mg) innerhalb dieser Regionen.



Hierbei waren die Ergebnisse innerhalb der PFC-Gruppe zwischen den Schichten ventral vs. dorsal und zentral vs. dorsal sowie zwischen allen 3 Schichten in basoapikaler Ausbreitungsrichtung jeweils statistisch signifikant. Dies entsprach damit zum einen unserer Hypothese (siehe 1.7), zum anderen auch den in der Literatur aufgeführten Ergebnissen (<sup>32;67;96</sup>). Quintel et al. demonstrierte beispielsweise in einer Studie an Schafen durch CT-Aufnahmen (Tiere in Rückenlage), dass PLV mit PFC (Perflubron) zu einer PFC-Verteilung in die abhängigen Bereiche der Lunge führte, wenn vorher eine Lungenschädigung induziert wurde (<sup>32</sup>). Dies konnten unsere Daten in vergleichbarer Form nachweisen und sowohl statistisch belegen als auch im 3D-Modell der Lunge visualisieren.

Bei der intrapulmonalen Verteilung von S zeigten unsere Ergebnisse ein anderes Verteilungsmuster gegenüber der PFC-Verteilung. Die statistische Auswertung in den Ausbreitungsrichtungen ventrodorsal und basoapikal zeigte für S die höchsten Intensitäten pro Würfelgewicht (Q) in den Regionen ventral und basal (ventral vs. zentral  $p=0.08$ ; basal vs. apikal  $p<0.0001$ ). Die hier verwendete Methode der Surfactant-Substitution als Bolusinstillation, gilt als gut erprobte Applikationstechnik in der Therapie des neonatalen Atemnotsyndroms. In der Annahme, dass die Lunge mit Surfactantmangel eine inhomogene Belüftungssituation mit überblähten bis atelektatischen Alveolarbereichen aufweist, kommt es nach Surfactantgabe zu einer Änderung des pulmonalen Belüftungszustandes. Als Kurzeiteffekt wird davon ausgegangen, dass bereits belüftete Alveolarbereich sich überblähen und schlecht belüftete Alveolen sich stabilisieren, wogegen atelektatische und durch die Lungenschädigung mit Plasmaproteinaustritt verlegten Alveolen zunächst nicht von der Surfactant-Substitution profitieren (<sup>98</sup>). In unserem Lungenschädigungsmodell wäre eine bevorzugte regionale S-Verteilung in ventrale, gut belüftete Lungenbereiche zu erwarten, gegenüber eine geringe S-Verteilung in die durch die Lungenschädigung atelektatischen, abhängigen (dorsalen) Lungenregionen. Dies spiegelte sich in unseren Ergebnissen zumindest in der Ausbreitungsrichtung ventrodorsal wieder, mit den höchsten Werten (Q) in der Region ventral gegenüber basal und zentral in basoapikaler Ausbreitungsrichtung. Durch die Studiendauer von 4 Stunden mit maschineller Beatmung gingen wir davon aus, dass atelektatische Lungenbereiche (in Rückenlage bevorzugt dorsal) teilweise wieder eröffnet wurden. Dadurch würden diese Bereiche wieder an der Ventilation teilnehmen, mit entsprechender Verbesserung in der

Homogenität der Lungen-belüftung. Dies lies sich in der exemplarischen 3D-Darstellung (siehe 3.2.1) erkennen, wo nach 4 Stunden Therapie eine S-Verteilung ebenfalls in dorsale und basale Lungenbereiche zu beobachten war, vorausgesetzt S würde sich nach einmaliger Substitution innerhalb der 4 Stunden Therapie weiter innerhalb der Lungen verteilen und als Carrier entsprechend FF mitnehmen.

In diesem Würfelmodell war ebenfalls gut zu erkennen, dass innerhalb der gesamten Lunge Bereiche mit höheren neben Bereichen mit niedrigeren INT befanden.

Insbesondere mit einem Bereich (rechts-apikal), wo besonders viel FF anzutreffen war (siehe Abb. 11a), was möglicherweise einen überblähten Lungenbereich mit entsprechend großer Akkumulation von FF darstellte. In diesem Zusammenhang war ebenfalls zu diskutieren, dass als Besonderheit bei Schweinen in diesem Bereich ein zusätzlicher Bronchus direkt aus der Trachea entspringt (<sup>89</sup>), in dem sich womöglich besonders viel Surfactant abgelagert haben könnte.

Diese Ergebnisse mit einem eher inhomogenen Bild der intrapulmonalen Verteilung von Surfactant entsprach Ergebnissen, die Oetomo et al. und Diemel et al. in unabhängigen Studien voneinander zeigen konnten (<sup>89;100</sup>). Diemel et al. führte in vitro- und in vivo-Untersuchungen über die intrapulmonale Verteilung von Surfactant bei Ratten durch. 24 Stunden nach Lipopolysaccharid-induzierter Lungenschädigung (CT-Kontrolle), wurde nach maximal 60 min Therapie die intrapulmonale Verteilung von fluoreszenzmarkierten Surfactantprotein (SP)-B auf alveolärer Ebene untersucht. In der histologischen Darstellung zeigte sich eine bevorzugte Verteilung in offene Lungenbereichen, wobei atelektatische Regionen nicht von einer Surfactant-Therapie profitieren konnten. Dies war unabhängig von der dort untersuchten Ausbreitungsrichtung (ventrodorsal) (<sup>89</sup>).

Unsere Ergebnisse zeigten in der regionalen Ausbreitung von ventral nach dorsal ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Tendenz zu höheren Werten von ventral nach zentral,  $p=0.08$ ), was in dieser Ausbreitungsrichtung eher einer homogenen Surfactant-Verteilung entsprach, gegenüber einer eher inhomogenen Verteilung in der Ausbreitungsrichtung basoapikal. Anhand der Darstellung der intrapulmonalen S-Verteilung im 3D-Modell zeigte sich insgesamt für S ein optisch eher homogeneres Verteilungsmuster, gegenüber der Verteilung von PFC.

Entsprechend konnten durch unsere Ergebnisse der Verteilungsdarstellungen von PFC und S durch den FF unsere ersten beiden Hypothesen ebenfalls belegt werden.

Andere Studienergebnisse zeigten ebenfalls eine eher homogenere Verteilung von Surfactant innerhalb der Lunge. Segerer et al. (<sup>93;94</sup>) untersuchte anhand radioaktiver Markierung und Fluoreszenzmarkierung mit Mikrosphären den Einfluss verschiedener Instillationstechniken auf die intrapulmonale Verteilung von Surfactant (Curosurf). Bei Kaninchen (MW 2,5kg) erfolgte nach Surfactantdepletion u.a. die Bolus-Instillation von Surfactant und Therapie für 70 Minuten. Im Anschluss wurden die Lungen fixiert, in 60-70 Lungenwürfel zerschnitten (MW Gewicht 436mg, 49-1070mg) und jeweils die Anzahl der Mikrosphären spektrometrisch gemessen. Hier zeigte sich eine relativ homogene Surfactantverteilung (Histogramm Normalverteilung) innerhalb der Lungen. Im Vergleich zu unserer Studie war hierbei anzumerken, dass zum einen Anzahl und Gewichte der Lungenwürfel deutlich unterschiedlich waren, zum anderen mit der von Segerer et al. vorgestellten Methode keine Aussage über die regionale Verteilung im Sinne einer Ausbreitungsrichtung von ventrodorsal bzw. basoapikal möglich war.

Wir spekulierten, dass sich in unserer Studie FF und Carrier gleichmäßig innerhalb der Atemwege verteilten. Ob es dabei zu einer Aufnahme der Substanzen aus den Atemwegen ins Lungengewebe kam, wissen wir nicht. Wir gingen jedoch davon aus, dass die Therapiedauer von 4 h womöglich eine zu kurze Dauer für einen Übergang der Substanzen ins Gewebe darstellte. Andererseits würde eine Aufnahme von FF ins Gewebe durch die anschließende Extraktion mit Nachweis des Fluoreszenzfarbstoffs aus dem Lungengewebe ebenfalls zu einer regionalen Verteilungsdarstellung führen. Ebenfalls stellte sich die Frage, was passieren würde, wenn sich Fluoreszenzfarbstoff und Carrier nach intrapulmonaler Applikation voneinander trennen würden. Hier wäre nach unserer Vorstellung einerseits zu erwarten, dass sich der FF nach zentraler Applikation (Trachea) auch bevorzugt zentral in den großen Atemwegen anfinden bzw. sich nicht weiter verteilen würde. Andererseits würde sich der FF aufgrund der hohen Dichte von PFC ventral auf dem PFC schwimmend vorwiegend ventral anfinden. Da diese FF-Verteilungen in unseren Ergebnissen nicht eingetroffen waren, hielten wir diese Möglichkeiten für unwahrscheinlich. Entsprechend gingen wir von einer homogenen Verteilung des im Carrier PFC und S gelösten FF als Grundlage für unserer Studienergebnisse aus.

Unterschiede in der Höhe der gemessenen INT mit niedrigeren INT in der S-Gruppe gegenüber der PFC-Gruppe (geringere Werte im Farbspektrum, siehe 3.2.1) waren womöglich durch die geringere FF-Menge pro ml Carriersubstanz bei der Fluoreszenz-

markierung des S bedingt. Durch die Bildung des Mittelwertes von Q (INT/mg) in beiden Gruppen (PFC, S) und Berechnung der prozentualen Abweichung von Q jedes Lungenwürfels von diesem Mittelwert (relative Intensität), wurde der Vergleich zwischen beiden Gruppen ermöglicht.

Durch die 3-dimensionale Rekonstruktion der Lungen mit einer hohen Anzahl an Lungenwürfeln in jedem Modell, gelang zudem eine hochauflösende Darstellung intrapulmonalen Verteilung von PFC und S (siehe 1.7, Hypothesen). Die hier verwendete Software ermöglichte zudem die beliebige Rotation der Lungenmodelle in ihrer X-, Y- und Z-Achse, was die Darstellung der räumlichen Verteilung beider Substanzen zusätzlich verbesserte. Die Erstellung des Würfelmodells erfolgte in Anlehnung an Altemeier und Glenny et al (<sup>37</sup>), die in ihrer Arbeit eine geeignete Methode zur hochauflösenden Darstellung von Perfusions- und Ventilationsänderungen innerhalb der Lunge demonstrieren konnten. Im Vergleich zu den Würfelgrößen (1,5-2,0 cm<sup>3</sup>) der dort verwendeten Schweine (18,5-25kg) (<sup>37</sup>), lagen in unserem Neugeborenen-Schädigungsmodell die Würfelgrößen entsprechend kleiner (0,343 cm<sup>3</sup>). Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Fluoreszenzmarkierung von PFC und S mit dem hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoff „Yellowgreen“ durchführbar, und zur Darstellung der intrapulmonalen Verteilung beider Substanzen geeignet war. Somit konnte die erste Hypothese belegt werden (siehe 1.7).

Die Vorversuchsreihe an zuvor verstorbenen Ratten mit Durchführung einer partiellen Flüssigkeitsbeatmung (PLV) und anschließender Präparation der Lungen sollte lediglich als Nachweismethode des zuvor intratracheal applizierten FF (Yellowgreen) dienen. Bei der zusätzlich durchgeführten Analyse auf regionale Verteilungsunterschiede innerhalb der Lunge sollte lediglich überprüft werden, ob es hier zu einer schwerkraftabhängigen Verteilung des Carriers PFC (+FF) innerhalb des kurzen Untersuchungszeitraums gekommen war. Wahrscheinlich wegen der kurzen PLV-Dauer (10min) und einer Beatmung toter Ratten war kein Unterschied nachweisbar (siehe 3.1.3).

In unserer Studie wurde ein Gemisch aus zwei PFC verwendet, bestehend aus Perfluoroctan (C<sub>8</sub>F<sub>18</sub>, PF5080, 3M Neuss Germany) und Perfluorocetyl bromid (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>Br, PFOB, Fa. ABCR Germany) im Verhältnis 10:1. PF5080 wurde schon zuvor in vivo erfolgreich in tierexperimentellen Studien angewendet (<sup>1;97;101</sup>). Es konnte u.a. gezeigt werden, dass PFC mit einem hohen Dampfdruck höhere Dosierungen zur

Aufrechterhaltung der PFC-Menge benötigten und eine hohe Viskosität die Oxygenierung beeinträchtigte (<sup>102</sup>). PF5080 besitzt sowohl einen hohen Dampfdruck als auch Viskosität (Tab. 1) und die Zugabe von PFOB zu PF5080 sollte daher die intrapulmonale Anwendung günstig beeinflussen. Die meisten Studienergebnisse basierten auf der Anwendung von Perflubron (LiquiVent<sup>®</sup>). Obwohl sich die physikochemischen Eigenschaften unseres PFC-Gemischs unterschieden, zeigten unsere Ergebnisse eine vergleichbare regionale intrapulmonale PFC-Verteilung zu vorausgegangenen Studienergebnissen.

#### Lungenexpansion:

Die Lungenextraktion en bloc erfolgte in beiden Versuchsgruppen standardisiert nach 240 Minuten Therapie (siehe 2.2.8). Die Präparation der Lungen mit Gefriertrocknung und Zerschneiden in Lungenwürfel lieferte Kenntnis über Würfelgewicht, Würfelgröße sowie Würfelanzahl. Mit diesen Kenngrößen war es möglich, den Einfluss beider Therapieformen auf Änderungen des Lungenvolumens und der Lungendichte zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Die Messung von Lungenvolumen und -dichte nach Therapie einer induzierten Lungenschädigung unter Einbeziehung der hier verwendeten Kenngrößen war ebenfalls noch nicht zuvor in der Literatur beschrieben worden. Unsere Ergebnisse zeigten damit erstmals, dass das Lungenvolumen in der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe größer war. Auch die Berechnung des PEF (Pulmonary Expansion Faktor, siehe 3.2.2.3) zeigte eine Größenzunahme um den Faktor 1.38 nach PLV gegenüber der S-Substitution. Damit konnte unsere dritte Hypothese ebenfalls belegt werden.

In unserer Studie lag die intratracheal applizierte PFC-Menge entsprechend der angenommenen funktionellen Residualkapazität bei 30 ml/kg (<sup>70;103</sup>), wobei jüngere Studienergebnisse annehmen lassen, dass die funktionelle Residualkapazität bei Ferkeln etwas niedriger liegt (ca. 20,9 ml/kg) (<sup>104</sup>). Einen negativen Einfluss auf den Gasaustausch bei Verwendung der „hohen“ PFC-Füllungs menge von 30ml/kg zeigte sich gegenüber der S-Gruppe jedoch nicht.

Sowohl die jeweils unterschiedliche Menge an applizierter Flüssigkeit (PFC 30 ml/kg; S 1,5 ml/kg) als auch die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften beider Carriersubstanzen ließen einen unterschiedlichen Einfluss auf das Lungenvolumen vermuten. Hervorzuheben war hierbei sicherlich die hohe Dichte des PFC (siehe 1.4).

Nach PFC-Applikation kam es erwartungsgemäß zu einer überwiegenden Verteilung in die abhängigen (dorsalen) Lungenregionen (<sup>32;78;105</sup>), im Vergleich zu S. Eine Möglichkeit wäre, dass die Anreicherung einer schwer komprimierbaren Flüssigkeit (PFC) mit geringer Oberflächenspannung in den Alveolen abhängiger Lungenregionen einen weiteren Kollaps der Alveolen verhindern und somit das größere Lungenvolumen gegenüber der S-Substitution erklären könnte.

Eine weitere Spekulation für die unterschiedliche intrapulmonale Verteilung von PFC und S wäre zudem, dass die Wirkung von S an die Tatsache gebunden ist, die Alveole zu erreichen und entsprechend seine Wirkung zu entfalten. Nach induzierter Lungenschädigung durch Kochsalzlavage entstanden jedoch neben Atelektasen auch Ödem und Hämorrhagien (<sup>3</sup>), so dass Proteine, die im Zuge der Lungenschädigung nach intraalveolär gelangten Surfactant inaktivieren könnten. Dieses Phänomen wäre mit unseren Ergebnissen zu vereinbaren, mit einer vorwiegenden Anreicherung von Surfactant in ventralen Regionen, gegenüber PFC in dorsalen Bereichen der Lunge. Im Vergleich dazu unterscheidet sich das bisher einzigartige Potenzial der PFC, zuvor atelektatische Bereiche innerhalb der Lunge zu eröffnen und dadurch dem Gasaustausch wieder zugänglich zu machen („alveolar recruitment“), völlig von der Wirkungsweise von exogenem Surfactant. PFC ist hierbei in der Lage, die Oberflächenspannung auch bei Vorhandensein von Proteinen senken, die im Zuge der Lungenschädigung nach intraalveolär gelangen und dabei endogenes Surfactant inaktivieren (<sup>106;107</sup>), und kann sogar zu einer zusätzlichen Steigerung der endogenen Surfactant-Produktion (<sup>108</sup>) führen. Exogen zugeführtes Surfactant dagegen, könnte bei dem vorliegenden Schädigungsmodell sogar im Laufe der Zeit (partiell) inaktiviert und damit in seiner Wirkung beeinträchtigt werden.

Morris et al. konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie an gesunden Ferkeln (16-22,6 kg) durch CT-Darstellungen einen zusätzlichen Einfluss auf die PFC-Verteilung in Abhängigkeit der applizierten Beatmungsdrücke zeigen. Spitzendrücke (PIP) von 20 cmH<sub>2</sub>O zeigen einen deutlichen Gradienten in der PFC-Verteilung von nicht-abhängige in abhängige Lungenregionen (von ventral nach dorsal) gegenüber einem eher heterogenem Verteilungsmuster bei Drücken kleiner bzw. größer 20 cmH<sub>2</sub>O (<sup>109</sup>). Ergebnisse unserer Studie bei Ferkeln nach induzierter Lungenschädigung zeigten in der PFC-Gruppe vergleichbare Ergebnisse. Hier lagen zum Zeitpunkt der Lungenfixierung (nach 240min) der Spitzendruck in beiden Gruppen ebenfalls bei 20 cmH<sub>2</sub>O (S-Gruppe 19,46cmH<sub>2</sub>O±1,33; PFC-Gruppe 18,96cmH<sub>2</sub>O±1,63; p=0,40).

Luecke und Gauger et al. konnten jeweils unabhängig voneinander den Einfluss von PLV (30 ml/kg PFC) auf das durch Body-Plethysmographie gemessene endexpiratorische Lungenvolumen (EELV), nach Lungenschädigung (Ölsäure) an Schafen zeigen. Hier war jeweils eine sig. Zunahme des endexpiratorischen Lungenvolumens in der PFC-Gruppe gegenüber konventioneller mechanischer Ventilation (<sup>105;110</sup>) erkennbar. Obwohl in unserer Studie u.a. andere Tiere verwendet wurden (Schafe vs. Schweine) und die Messmethode für die Lungenvolumina unterschiedlich waren (Body Plethysmographie vs. gefriergetrocknete Lungen) zeigten unsere Ergebnisse in der Tendenz vergleichbare Resultate. Bei Gauger et al. lagen die Lungenvolumina nach 90 Minuten Therapie einer induzierten Lungenschädigung bei  $41.8 \pm 1.4$  ml/kg, bei Luecke et al. nach 120 Minuten bei  $89.2 \pm 12$  ml/kg, in unserer Studie nach 240 Minuten Therapie mit PFC bei  $34,28 \pm 6,13$  ml (=50,71 ml/kg). In der bei uns verwendeten Methode erfolgte die Lungenextraktion unter kontinuierlicher Applikation eines PEEP. Dadurch wurden die Lungen in „geblähtem“ Zustand fixiert, wobei nach der Gefrietrocknung keine flüssigen Bestandteile innerhalb der Lungen mehr verblieben waren. Unsere Ergebnisse entsprachen bei der Messung des totalen Lungenvolumens somit der Darstellung eines endexpiratorischen Belüftungszustands der Lungen, jedoch mit der Einschränkung eines relativ hohen PEEP von 10 cmH<sub>2</sub>O zum Zeitpunkt der Fixierung. Ob ein geringerer Blähdruk von beispielsweise 5 cmH<sub>2</sub>O andere Ergebnisse erbracht hätte, bleibt spekulativ.

In der Betrachtung für Parameter des Gasaustauschs zeigten unsere Daten keinen Gruppenunterschied (siehe 3.2.3). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass sowohl ein größeres Lungenvolumen als auch eine geringere Dichte (gemessen an den gefriergetrockneten Lungen) in der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe keinen Einfluss auf Parameter für den Gasaustausch zu haben schien.

Die in unserer Arbeit durchgeführte Verteilungsdarstellung von PFC und S zeigten sowohl bei der Normierung der Lungen in eine gleiche Anzahl an Lungenschichten als auch bei der Ausrichtung der Lungen in ventrodorsaler Richtung anhand der Carina vergleichbare Ergebnisse. Entsprechend stellten damit beide Verfahren eine geeignete Methode zur Darstellung regionaler, intrapulmonaler Verteilungsunterschiede von PFC und S dar.

Die Berechnung der Lungenvolumina und ~dichte ermöglichte das standardisierte Schneiden in Würfel von  $0,7\text{cm}^3$  Größe. Dadurch dass die Randwürfel alle unterschiedliche Maße aufwiesen, wurden sie standardisiert mit 50% des ursprünglichen Würfelvolumens berechnet. Insgesamt zeigten die Lungen der PFC-Gruppe bereits eine höhere Anzahl an Lungenwürfeln (nLC). Entsprechend musste auch das kalkulierte Volumen von PFC-gefüllten Lungen größer der S-gefüllten Lungen liegen. Bei der Berechnung der Ratio (Lungengewicht pro nLC) ergab sich im Vergleich zur Anzahl der Lungenwürfel ein statistisch signifikanter Unterschied, der letztlich der Dichte des Gewebes in beiden Gruppen entsprach und den geblähten Zustand der PFC-Lungen (gegenüber S) verdeutlichte.

#### Gasaustausch und Hämodynamik:

In einer Vielzahl an experimentell und klinisch durchgeführten Studien wurde der Einfluss der partiellen Flüssigkeitsbeatmung (PLV) mit PFC sowie die Applikation von exogenem Surfactant (S) auf Gasaustausch und Lungenmechanik bei akuter Lungenschädigung untersucht (<sup>12-14;17;18;23;27</sup>).

Unsere Studienergebnisse für den Gasaustausch zeigten, dass zwischen beiden Gruppen (PFC, S), mit Ausnahme höherer  $\text{PaCO}_2$ -Werte in der S-Gruppe zum Messzeitpunkt 2 (siehe 3.2.3, Tabelle 4), kein signifikanter Unterschied zu den untersuchten Messzeitpunkten bestand. Da die Randomisierung der Tiere erst nach Durchführung der Lavage (Messzeitpunkt 2) erfolgte, sollte dieser Unterschied ( $\text{PaCO}_2$ ) als zufällig bewertet werden.

In der Therapie der induzierten Lungenschädigung zeigte die Berechnung des Oxygenation Index (OI) und Ventilatory Efficacy Index (VEI) in der PFC-Gruppe eine deutliche Verbesserung beider Parameter. Dies konnte sowohl in einer Studie von Merz et al. an neugeborenen Ferkeln (MW 1900g) (<sup>85</sup>) als auch in weiteren Studien demonstriert werden (<sup>80;111</sup>). Bei der Untersuchung des VEI und OI zeigte sich in der S-Gruppe ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Parameter nach 240 Minuten Therapie. Der deutliche Abfall des VEI in der S-Gruppe im Vergleich zur PFC-Gruppe zum Messzeitpunkt 2 („LI“), ließ sich durch die entsprechend höheren Messwerte für den  $\text{PaCO}_2$  zu diesem Zeitpunkt erklären.

In der PFC-Gruppe kam es nach 240 Minuten zu einer tendenziellen Annäherung des VEI an die Ausgangswerte (Baseline vs. 240min), wogegen die S-Gruppe einen sig. niedrigeren VEI aufwies. Dagegen zeigte sich in der S-Gruppe als möglicher



„Kurzeffekt“ ein signifikant höherer Anstieg in der „prozentuellen Änderung des VEI“ nach 30 und 60 Minuten Therapie (Abb. 16), gegenüber der PFC-Gruppe mit einem niedrigeren jedoch stetigeren Anstieg. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass PFC eine geringe Diffusionsbarriere für das CO<sub>2</sub> darstellen, wogegen S im Vergleich dazu schneller wirken kann. Ob diese Kurzeffekte sowie die Ergebnisse nach 240 Minuten einen unterschiedlichen Einfluss auf eine längere Behandlungsdauer haben würden, bleibt aufgrund fehlender Ergebnisse aus ähnlichen Studien zunächst ungeklärt. Diese Ergebnisse zeigen jedoch, welches Potential beide Substanzen als Therapiemöglichkeit der Lungenschädigung besitzen.

In der Untersuchung des OI korrelierten unsere Ergebnisse mit denen vorliegender Studien. Die sig. Verbesserung des OI wurde bereits sowohl unter der Therapie mit PFC (<sup>8;9;16;112</sup>) als auch nach Applikation von exogenem Surfactant (<sup>6;113-115</sup>) nach induzierter Lungenschädigung am Modell nachgewiesen.

Bei unseren Berechnungen des OI bestand zwischen Beiden Gruppen (PFC, S) kein sig. Unterschied, obwohl bei Betrachtung der Kurzeffekte wiederum die S-Gruppe eine raschere Stabilisierung der Indices aufwies. Da diese Ergebnisse zwischen der PFC- und der S-Gruppe keinen sig. Unterschied besitzt und in der Literatur bei Betrachtung der hier verwendeten Ferkelgewichte (MW 678g ± 156) bisher keine ausreichende Vergleichsmöglichkeit besteht, bleibt eine Aussage bezüglich einer schnelleren S-Wirkung gegenüber PFC vorrangig spekulativ.

Mrozek et al. (<sup>28</sup>) untersuchte u.a. die Therapieeffekte von PFC und S nach induzierter Lungenschädigung durch repetitive Kochsalzlavage bei neugeborenen Ferkeln (1,51±0.38 kg) für 2 Stunden Dauer. Hier zeigte sich in der Analyse der prozentuellen Änderung des OI eine Verschlechterung in der S-Gruppe gegenüber der PFC-Gruppe über diese Zeitspanne, wobei nach 2 Stunden tendenziell der größte Unterschied auftrat. Zu diskutieren ist, dass dieser Effekt ist möglicherweise als Funktionsverlust der Surfactantwirkung über die Zeit gewertet werden könnte. In der S-Gruppe lagen innerhalb der ersten 60 Minuten ebenfalls tendenziell niedrigere Werte vor, was unsere Ergebnisse jedoch nicht zeigten (siehe 3.2.3.2). Ursächlich dafür könnte die Verwendung unterschiedlicher Surfactantpräparate sein (Mrozek et al.: 100mg/kg Perflubron, Survanta<sup>®</sup>, hier: Curosurf 120mg/kg).

In der Literatur gab es ebenfalls nur wenige Studien zu finden, in denen das PFC PF5080 und mit der Applikation von Curosurf<sup>®</sup> als Surfactantpräparat verglichen wurde. Kelly et al. (<sup>83</sup>) untersuchte in einer Studie bei Kaninchen unter anderem den Einfluss

beider Therapieformen auf den Gasaustausch ( $\text{PaO}_2$ ) nach induzierter Lungenschädigung, unter Verwendung von PF5080 und Curosurf<sup>®</sup>. Die Ergebnisse korrelierten mit unseren Messdaten (siehe 3.3) und zeigten ebenfalls eine Verbesserung des Gasaustauschs, ohne sig. Unterschied zwischen den Gruppen. Die statistische Auswertung unserer Messdaten für die endexpiratorische Kohlendioxidkonzentration ( $\text{etCO}_2$ ) legte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Therapiegruppen dar. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Bestimmung der  $\text{etCO}_2$  unter der Therapie mit PFC durch das Vorliegen von sowohl Wasserdampf als auch durch Evaporation verdunstetem PFC in der Gasphase bei Expiration bisher nicht gut validiert ist. Mates et al. konnte zuletzt jedoch die Durchführbarkeit der Capnographiemessung auch unter PFC-Applikation zeigen (<sup>61</sup>).

Unsere Daten ergaben, dass zum Zeitpunkt der Lungenschädigung in beiden Gruppen eine respiratorische Azidose bestand (siehe 3.3). Bei der Betrachtung des Therapiezeitraums von 240 Minuten blieb eine statistische Signifikanz bei Untersuchung beider Parameter zwischen den Gruppen aus. Dies konnte auch Jeng et al. in einer 2003 publizierten Studie zeigen (<sup>27</sup>). Er benutzte ein Lungenschädigungsmodell durch Rauchinhalation bei neugeborenen Ferkeln ( $1800\text{g} \pm 60$ ), um die therapeutischen Effekte der PFC- gegenüber der Surfactant-Applikation für ebenfalls 240 Minuten Behandlungsdauer zu untersuchen. Abweichend war hier jedoch ein Abfall der Herzfrequenz in der PFC-Gruppe nach 240 Minuten. Obwohl die gleiche PFC-Menge ( $30\text{ml/kg}$ ) verwendet wurde, unterschieden sich sowohl PFC-Typ (FC-77 (Fluorinert)) und PFC-Applikationstechnik (keine kontinuierliche Applikation) als auch das Schädigungsmodell und auch die Ferkelgewichte differierten.

Die Untersuchung der hämodynamischen Parameter (HF, MBP) ohne nachweislich sig. Gruppenunterschiede konnte ebenfalls in Studien von Houmes et al. (<sup>116</sup>) und Mrozek et al. (<sup>28</sup>), jedoch unter Verwendung von Perflubron, unabhängig voneinander demonstriert werden. Hier bleibt jedoch anzumerken, dass bei Mrozek et al. der Untersuchungszeitraum nur 120 Minuten betrug und PFC-Verluste durch Evaporation (PFOB mit geringerer Evaporation) in diesem Zeitraum nicht ersetzt wurden (<sup>28</sup>). Wir verwendeten ein System der kontinuierlichen PFC-Applikation unter PLV, um Verlusten durch Evaporation entgegenzuwirken. Merz et al. demonstrierte hierzu, dass eine kontinuierliche PFC-Applikation unter PLV gegenüber einzelner PFC-Gaben zu einer verbesserten Oxygenierung in der Therapie der Surfactant-depletierten Lunge

neugeborener Ferkel (MW 1940 g) führte (<sup>117</sup>). Diese Studienergebnisse zeigten zudem, dass die Art der PFC-Applikation (kontinuierlich vs. einmalig) zumindest keinen negativen Einfluss auf die Hämodynamik besaß.

Beide Therapieformen scheinen somit in der Therapie der experimentell induzierten Lungenschädigung bei neugeborenen Ferkeln auch in der hier untersuchten niedrigen Gewichtsklasse (676g ± 156) geeignet zu sein, obgleich einer unterschiedlichen Wirkungsweise beider Substanzen. Sowohl PLV mit PFC als auch die Substitution von exogenem S führte zu einer signifikanten Verbesserung von Oxygenierung und Gasaustausch, ohne sich negativ auf die Hämodynamik auszuwirken.

Ausgehend von den positiven Studienergebnissen der letzten 20 Jahre zum Zeitpunkt unserer Studiendurchführung, schien es für viele nur eine Frage der Zeit zu sein, bis sich die PLV mit PFC als alternative Therapiemethode im Bereich der Neonatologie etablieren würde (<sup>23;53;118</sup>). Jedoch liegen bis heute keine Daten aus randomisierten und kontrollierten Studien vor, die einen Vorteil der PLV mit PFC gegenüber anderen etablierten Behandlungsstrategien demonstrieren (<sup>17;17;119</sup>). Davies et al. (<sup>120</sup>) veröffentlichte 2004 eine Arbeit, in der der Einfluss von PLV bei ALI und RDS auf die Morbidität und Mortalität bei Kindern (28 Lebenstage bis 18 Jahre) untersucht wurde. Hierfür wurde in Datenbanken (MEDLINE, Cochrane, CINAHL) und Literatur im Zeitraum der letzten ca. 40 Jahre nach durchgeführten randomisierten und kontrollierten Studien gesucht, in denen bei Kindern mit ALI / RDS die partielle Flüssigkeitsbeatmung mit anderen Beatmungsformen verglichen wurde. Doch auch hier wurde lediglich von einer Studie von Fuhrmann et al. berichtet, die ebenfalls vorzeitig abgebrochen wurde, und bis dahin lediglich zeigte, dass es bezüglich des relativen Risikos der 28-Tage-Mortalität in der PLV-Gruppe keinen signifikanten Gruppenunterschied gab. Diese Daten zeigten, dass es keinen Hinweis aus randomisierten, kontrollierten Studien bei Frühgeborenen und Kindern mit akuter Lungenschädigung gab, die PLV mit PFC als Therapiemaßnahme abzulehnen oder als alternative Therapiestrategie in Erwägung zu ziehen, zumal S-Substitution bereits als Behandlungsmethode etabliert ist. 2006 präsentierte Kaczmarek et al. Studienergebnisse seiner Arbeitsgruppe (gefördert von Alliance Pharmaceutical Corp.), wo PLV mit PFC gegenüber konventioneller maschineller Beatmung (CMV) bei Erwachsenen mit ARDS verglichen wurde (<sup>121</sup>).

Bezogen auf 28-Tage-Mortalität und beatmungsfreie Tage führt PLV gegenüber CMV zu keiner statistisch sig. Verbesserung. Zusätzlich kam es in der PLV-Gruppe zu vermehrten Auftreten von Pneumo-(liquido)thoraces, Hypoxien und Hypotension. Zu bemerken ist jedoch, dass in dieser Studie sowohl eine geringere Menge an PFC (10ml/kg und 20ml/kg) gegenüber unserer Studie (30ml/kg) verwendet wurde als auch die PLV-Dauer mindestens 48h betrug und wir somit keine vergleichbaren Daten bezüglich der Nebenwirkungen (u.a. Pneumo-(liquido)thorax) haben.

Zusammenfassend zeigten unsere Ergebnisse, dass die direkte Fluoreszenzmarkierung von PFC und S durch den FF Yellowgreen in seiner Reinform eine geeignete Methode war, beide Substanzen innerhalb der Lunge nachzuweisen und deren Verteilung räumlich darzustellen. Durch die 3-dimensionale Rekonstruktion der Lungen (Würfelmodell) wurde eine hochauflösende Abbildung der regionalen, intrapulmonalen Verteilung von PFC und S ermöglicht.

Ebenfalls ermöglichte die hier angewandte Methode Änderungen des Lungenvolumens und der Lungendichte nach induzierter Lungenschädigung nach 240 Minuten Therapie zu erkennen. Trotz signifikant unterschiedlichem Lungenvolumen zeigte sich in unserer Studie kein unterschiedlicher Einfluss auf Gasaustausch und Hämodynamik zwischen beiden Therapieformen. Inwieweit sich diese Studienergebnisse bei sehr kleinen neugeborenen Ferkeln auf den Menschen übertragen lassen und ob PLV mit PFC möglicherweise noch als eine alternative Behandlungsmethode, beispielsweise bei Surfactant-Nonrespondern, in der Therapie der akuten Lungenschädigung Neugeborener Verwendung finden wird, müssen weitere Studienergebnisse zeigen.

## **5. Literaturverzeichnis:**

1. Burkhardt W, Proquitte H, Krause S et al. Cerebral oxygenation is affected by filling mode and perfluorochemical volume in partial liquid ventilation of healthy piglets. *Biol Neonate*. 2002;82:250-256.
2. Shaffer TH, Wolfson MR, Clark LC, Jr. Liquid ventilation. *Pediatr Pulmonol*. 1992;14:102-109.
3. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1980;24:231-236.
4. Obladen M. History of surfactant up to 1980. *Biol Neonate*. 2005;87:308-316.
5. Halliday HL. History of surfactant from 1980. *Biol Neonate*. 2005;87:317-322.
6. Fujiwara T, Maeta H, Chida S et al. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet*. 1980;1:55-59.
7. Been JV, Zimmermann LJ. What's new in surfactant? : A clinical view on recent developments in neonatology and paediatrics. *Eur J Pediatr*. 2007.
8. Leach CL, Fuhrman BP, Morin FC, III et al. Perfluorocarbon-associated gas exchange (partial liquid ventilation) in respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, controlled study. *Crit Care Med*. 1993;21:1270-1278.
9. Curtis SE, Peek JT, Kelly DR. Partial liquid breathing with perflubron improves arterial oxygenation in acute canine lung injury. *J Appl Physiol*. 1993;75:2696-2702.
10. Tutuncu AS, Faithfull NS, Lachmann B. Comparison of ventilatory support with intratracheal perfluorocarbon administration and conventional mechanical ventilation in animals with acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:785-792.
11. Hernan LJ, Fuhrman BP, Kaiser RE et al. Perfluorocarbon-associated gas exchange in normal and acid-injured large sheep. *Crit Care Med*. 1996;24:475-481.
12. Hirschl RB, Tooley R, Parent AC et al. Improvement of gas exchange, pulmonary function, and lung injury with partial liquid ventilation. A study model in a setting of severe respiratory failure. *Chest*. 1995;108:500-508.
13. Papo MC, Paczan PR, Fuhrman BP et al. Perfluorocarbon-associated gas exchange improves oxygenation, lung mechanics, and survival in a model of adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1996;24:466-474.
14. Leach CL, Holm B, Morin FC, III et al. Partial liquid ventilation in premature lambs with respiratory distress syndrome: efficacy and compatibility with exogenous surfactant. *J Pediatr*. 1995;126:412-420.
15. Degraeuwe PL, Vos GD, Blanco CE. Perfluorochemical liquid ventilation: from the animal laboratory to the intensive care unit. *Int J Artif Organs*. 1995;18:674-683.
16. Tutuncu AS, Faithfull NS, Lachmann B. Intratracheal perfluorocarbon administration combined with mechanical ventilation in experimental respiratory distress syndrome: dose-dependent improvement of gas exchange. *Crit Care Med*. 1993;21:962-969.
17. Leach CL, Greenspan JS, Rubenstein SD et al. Partial liquid ventilation with perflubron in premature infants with severe respiratory distress syndrome. The LiquiVent Study Group. *N Engl J Med*. 1996;335:761-767.

18. Gauger PG, Pranikoff T, Schreiner RJ et al. Initial experience with partial liquid ventilation in pediatric patients with the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996;24:16-22.
19. Hirschl RB, Pranikoff T, Wise C et al. Initial experience with partial liquid ventilation in adult patients with the acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 1996;275:383-389.
20. Bull JL, Tredici S, Komori E et al. Distribution dynamics of perfluorocarbon delivery to the lungs: an intact rabbit model. *J Appl Physiol.* 2004;96:1633-1642.
21. Gross GW, Greenspan JS, Fox WW et al. Use of liquid ventilation with perflubron during extracorporeal membrane oxygenation: chest radiographic appearances. *Radiology.* 1995;194:717-720.
22. Greenspan JS, Fox WW, Rubenstein SD et al. Partial liquid ventilation in critically ill infants receiving extracorporeal life support. Philadelphia Liquid Ventilation Consortium. *Pediatrics.* 1997;99:E2.
23. Hirschl RB, Pranikoff T, Gauger P et al. Liquid ventilation in adults, children, and full-term neonates. *Lancet.* 1995;346:1201-1202.
24. Kazerooni EA, Pranikoff T, Cascade PN et al. Partial liquid ventilation with perflubron during extracorporeal life support in adults: radiographic appearance. *Radiology.* 1996;198:137-142.
25. van Eeden SF, Klut ME, Leal MA et al. Partial liquid ventilation with perfluorocarbon in acute lung injury: light and transmission electron microscopy studies. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22:441-450.
26. Hirschl RB, Tooley R, Parent A et al. Evaluation of gas exchange, pulmonary compliance, and lung injury during total and partial liquid ventilation in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1996;24:1001-1008.
27. Jeng MJ, Kou YR, Sheu CC et al. Effects of exogenous surfactant supplementation and partial liquid ventilation on acute lung injury induced by wood smoke inhalation in newborn piglets. *Crit Care Med.* 2003;31:1166-1174.
28. Mrozek JD, Smith KM, Bing DR et al. Exogenous surfactant and partial liquid ventilation: physiologic and pathologic effects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1058-1065.
29. Wolfson MR, Greenspan JS, Deoras KS et al. Comparison of gas and liquid ventilation: clinical, physiological, and histological correlates. *J Appl Physiol.* 1992;72:1024-1031.
30. Krause MF, Jakel C, Haberstroh J et al. Alveolar recruitment promotes homogeneous surfactant distribution in a piglet model of lung injury. *Pediatr Res.* 2001;50:34-43.
31. Hirschl RB, Overbeck MC, Parent A et al. Liquid ventilation provides uniform distribution of perfluorocarbon in the setting of respiratory failure. *Surgery.* 1994;116:159-167.
32. Quintel M, Hirschl RB, Roth H et al. Computer tomographic assessment of perfluorocarbon and gas distribution during partial liquid ventilation for acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:249-255.
33. Steinhorn DM, Papo MC, Rotta AT et al. Liquid ventilation attenuates pulmonary oxidative damage. *J Crit Care.* 1999;14:20-28.
34. Wolfson MR, Shaffer TH. Liquid ventilation during early development: theory, physiologic processes and application. *J Dev Physiol.* 1990;13:1-12.
35. Quintel M, Heine M, Hirschl RB et al. Effects of partial liquid ventilation on lung injury in a model of acute respiratory failure: a histologic and morphometric analysis. *Crit Care Med.* 1998;26:833-843.

36. Hirschl RB, Parent A, Tooley R et al. Liquid ventilation improves pulmonary function, gas exchange, and lung injury in a model of respiratory failure. *Ann Surg.* 1995;221:79-88.
37. Altmeier WA, McKinney S, Glenn RW. Fractal nature of regional ventilation distribution. *J Appl Physiol.* 2000;88:1551-1557.
38. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:818-824.
39. Anderson MR. Update on pediatric acute respiratory distress syndrome. *Respir Care.* 2003;48:261-276.
40. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL et al. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967;2:319-323.
41. Rotta AT, Kunrath CL, Wiryawan B. [Management of the acute respiratory distress syndrome]. *J Pediatr (Rio J).* 2003;79 Suppl 2:S149-S160.
42. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149:818-824.
43. Pelosi P, Crotti S, Brazzi L et al. Computed tomography in adult respiratory distress syndrome: what has it taught us? *Eur Respir J.* 1996;9:1055-1062.
44. Lim CM, Koh Y, Jung BO et al. An optimal dose of perfluorocarbon for respiratory mechanics in partial liquid ventilation for dependent lung-dominant acute lung injury. *Chest.* 2000;117:199-204.
45. Kaisers U, Kuhlen R, Keske U et al. Superimposing positive end-expiratory pressure during partial liquid ventilation in experimental lung injury. *Eur Respir J.* 1998;11:1035-1042.
46. Ragaller M, Bleyl JU, Koch T et al. [From isoflurane to perfluorohexane? Perfluorocarbons--therapeutic strategies in acute lung failure]. *Anaesthesist.* 2000;49:291-301.
47. KYLSTRA JA, TISSING MO, van der MAEN. Of mice as fish. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1962;8:378-383.
48. Clark LC, Jr., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science.* 1966;152:1755-1756.
49. Modell JH, Gollan F, Giammona ST et al. Effect of fluorocarbon liquid on surface tension properties of pulmonary surfactant. *Chest.* 1970;57:263-265.
50. Ruefer R. Surfactant and alveolar surface forces after breathing of an inert fluorinated liquid. *Fed Proc.* 1970;29:1813-1815.
51. Greenspan JS. Liquid ventilation: a developing technology. *Neonatal Netw.* 1993;12:23-32.
52. Greenspan JS, Wolfson MR, Rubenstein SD et al. Liquid ventilation of preterm baby. *Lancet.* 1989;2:1095.
53. Greenspan JS, Wolfson MR, Rubenstein SD et al. Liquid ventilation of human preterm neonates. *J Pediatr.* 1990;117:106-111.
54. Shaffer TH, Wolfson MR, Greenspan JS et al. Perfluorochemical liquid as a respiratory medium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:315-326.
55. Costantino ML. The use of liquid perfluorocarbons for neonatal lung ventilation. *Int J Artif Organs.* 1996;19:284-290.

56. Shaffer TH, Rubenstein D, Moskowitz D et al. Gaseous exchange and acid-base balance in premature lambs during liquid ventilation since birth. *Pediatr Res.* 1976;10:227-231.
57. Calderwood HW, Ruiz BC, Tham MK et al. Residual levels and biochemical changes after ventilation with perfluorinated liquid. *J Appl Physiol.* 1975;39:603-607.
58. Lowe CA, Shaffer TH. Pulmonary vascular resistance in the fluorocarbon-filled lung. *J Appl Physiol.* 1986;60:154-159.
59. Garver KA, Kazerooni EA, Hirschl RB et al. Neonates with congenital diaphragmatic hernia: radiographic findings during partial liquid ventilation. *Radiology.* 1996;200:219-223.
60. Tutuncu AS, Houmes RJ, Bos JA et al. Evaluation of lung function after intratracheal perfluorocarbon administration in healthy animals. *Crit Care Med.* 1996;24:274-279.
61. Mates EA, Hildebrandt J, Jackson JC et al. Shunt and ventilation-perfusion distribution during partial liquid ventilation in healthy piglets. *J Appl Physiol.* 1997;82:933-942.
62. AVERY ME, MEAD J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child.* 1959;97:517-523.
63. Stevens TP, Sinkin RA. Surfactant replacement therapy. *Chest.* 2007;131:1577-1582.
64. Quintel M, Meinhardt J, Waschke KF. [Partial liquid ventilation]. *Anaesthesist.* 1998;47:479-489.
65. Quintel M, Waschke KF, Meinhardt J. [Liquid ventilation with perfluorocarbons]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1996;31:461-469.
66. Day SE, Gedeit RG. Liquid ventilation. *Clin Perinatol.* 1998;25:711-722.
67. Reickert C, Pranikoff T, Overbeck M et al. The pulmonary and systemic distribution and elimination of perflubron from adult patients treated with partial liquid ventilation. *Chest.* 2001;119:515-522.
68. Rotta AT, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury. *Crit Care Med.* 1998;26:1707-1715.
69. Rotta AT, Gunnarsson B, Fuhrman BP et al. Perfluorooctyl bromide (perflubron) attenuates oxidative injury to biological and nonbiological systems. *Pediatr Crit Care Med.* 2003;4:233-238.
70. Fuhrman BP, Paczan PR, DeFrancis M. Perfluorocarbon-associated gas exchange. *Crit Care Med.* 1991;19:712-722.
71. Fitzpatrick JC, Jordan BS, Salman N et al. The use of perfluorocarbon-associated gas exchange to improve ventilation and decrease mortality after inhalation injury in a neonatal swine model. *J Pediatr Surg.* 1997;32:192-196.
72. Weiswasser J, Lueders M, Stolar CJ. Pressure- versus volume-cycled ventilation in liquid-ventilated neonatal piglet lungs. *J Pediatr Surg.* 1998;33:1158-1162.
73. Bateman ST, Doctor A, Price B et al. Optimizing intrapulmonary perfluorocarbon distribution: fluoroscopic comparison of mode of ventilation and body position. *Crit Care Med.* 2001;29:601-608.
74. Sukumar M, Bommaraju M, Fisher JE et al. High-frequency partial liquid ventilation in respiratory distress syndrome: hemodynamics and gas exchange. *J Appl Physiol.* 1998;84:327-334.
75. Quintel M. Partial liquid ventilation (PLV). *Intensivmed.* 1999;36: Suppl 1:1/65-1/69.



76. Salman NH, Fuhrman BP, Steinhorn DM et al. Prolonged studies of perfluorocarbon associated gas exchange and of the resumption of conventional mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 1995;23:919-924.
77. Robertson HT, Glenny RW, Stanford D et al. High-resolution maps of regional ventilation utilizing inhaled fluorescent microspheres. *J Appl Physiol*. 1997;82:943-953.
78. FMRC. Manual for Using Fluorescent Microspheres to Measure Regional Organ Perfusion. Fluorescent Microsphere Resource Center. 1999; Ref Type: Report
79. Gregor T, Schmalisch G, Burkhardt W et al. Aerosolization of perfluorocarbons during mechanical ventilation: an in vitro study. *Intensive Care Med*. 2003;29:1354-1360.
80. Kandler MA, von der HK, Schoof E et al. Persistent improvement of gas exchange and lung mechanics by aerosolized perfluorocarbon. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:31-35.
81. Proquitte H, Krause S, Rudiger M et al. Current limitations of volumetric capnography in surfactant-depleted small lungs. *Pediatr Crit Care Med*. 2004;5:75-80.
82. Proquitte H, Rudiger M, Wauer RR et al. Breathing gas perfluorocarbon measurements using an absorber filled with zeolites. *Br J Anaesth*. 2003;91:736-738.
83. Kelly KP, Stenson BJ, Drummond GB. Randomised comparison of partial liquid ventilation, nebulised perfluorocarbon, porcine surfactant, artificial surfactant, and combined treatments on oxygenation, lung mechanics, and survival in rabbits after saline lung lavage. *Intensive Care Med*. 2000;26:1523-1530.
84. Lewis JF, Brackenbury A. Role of exogenous surfactant in acute lung injury. *Crit Care Med*. 2003;31:S324-S328.
85. Merz U, Kellinghaus M, Hausler M et al. Partial liquid ventilation with surfactant: effects on gas exchange and lung pathology in surfactant-depleted piglets. *Intensive Care Med*. 2000;26:109-116.
86. Wada K, Jobe AH, Ikegami M. Tidal volume effects on surfactant treatment responses with the initiation of ventilation in preterm lambs. *J Appl Physiol*. 1997;83:1054-1061.
87. Glauser EM. Advantages of piglets as experimental animals in pediatric research. *Exp Med Surg*. 1966;24:181-190.
88. Cooper JE. The use of the pig as an animal model to study problems associated with low birthweight. *Lab Anim*. 1975;9:329-336.
89. Diemel RV, Walch M, Haagsman HP et al. In vitro and in vivo intrapulmonary distribution of fluorescently labeled surfactant. *Crit Care Med*. 2002;30:1083-1090.
90. van der BJ, Plotz FB, van Overbeek FM et al. Distribution of exogenous surfactant in rabbits with severe respiratory failure: the effect of volume. *Pediatr Res*. 1993;34:154-158.
91. Krause MF, Orlowska-Volk M, Hendrik ER et al. A new simple method of staining exogenous surfactant in experimental research. *Eur Respir J*. 2000;15:949-954.
92. Bernard SL, Ewen JR, Barlow CH et al. High spatial resolution measurements of organ blood flow in small laboratory animals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H2043-H2052.
93. Segerer H, van Gelder W, Angenent FW et al. Pulmonary distribution and efficacy of exogenous surfactant in lung-lavaged rabbits are influenced by the instillation technique. *Pediatr Res*. 1993;34:490-494.

94. Segerer H, Scheid A, Wagner MH et al. Rapid tracheal infusion of surfactant versus bolus instillation in rabbits: effects on oxygenation, blood pressure and surfactant distribution. *Biol Neonate*. 1996;69:119-127.
95. Miller TF, Milestone B, Stern R et al. Effect of single versus multiple dosing on perfluorochemical distribution and elimination during partial liquid ventilation. *Pediatr Pulmonol*. 1999;27:410-418.
96. Meaney JF, Kazerooni EA, Garver KA et al. Acute respiratory distress syndrome: CT findings during partial liquid ventilation. *Radiology*. 1997;202:570-573.
97. Kelly KP, Stenson BJ, Drummond GB. Effect of partial liquid ventilation and nebulized perfluorocarbon on CT lung density distribution: randomized controlled study of experimental lung injury. *Br J Anaesth*. 2005;94:671-674.
98. Wauer RR. *Surfactanttherapie, Grundlagen, Diagnostik, Therapie*; Thieme Verlag, 3. Auflage. 2004.
99. Nakakuki S. Bronchial tree, lobular division and blood vessels of the pig lung. *J Vet Med Sci*. 1994;56:685-689.
100. Oetomo SB, de Ley L, Curstedt T et al. Distribution of endotracheally instilled surfactant protein SP-C in lung-lavaged rabbits. *Pediatr Res*. 1991;29:178-181.
101. Gregor T, Schmalisch G, Burkhardt W et al. Aerosolization of perfluorocarbons during mechanical ventilation: an in vitro study. *Intensive Care Med*. 2003;29:1354-1360.
102. Jeng MJ, Yang SS, Wolfson MR et al. Perfluorochemical (PFC) combinations for acute lung injury: an in vitro and in vivo study in juvenile rabbits. *Pediatr Res*. 2003;53:81-88.
103. Lim CM, Yang SH, Kang JL et al. Effect of ventilation mode on gas exchange during partial liquid ventilation at different perfluorocarbon doses in surfactant-depleted lung. *Lung*. 2001;179:245-255.
104. Proquitte H, Kusztrich A, Auwarter V et al. Functional residual capacity measurement by heptafluoropropane in ventilated newborn lungs: in vitro and in vivo validation. *Crit Care Med*. 2006;34:1789-1795.
105. Luecke T, Meinhardt JP, Herrmann P et al. End-expiratory lung volumes and density distribution patterns during partial liquid ventilation in healthy and oleic acid-injured sheep: a computed tomography study. *Crit Care Med*. 2003;31:2190-2197.
106. Kobayashi T, Nitta K, Ganzuka M et al. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr Res*. 1991;29:353-356.
107. Ikegami M, Jacobs H, Jobe A. Surfactant function in respiratory distress syndrome. *J Pediatr*. 1983;102:443-447.
108. Steinhorn DM, Leach CL, Fuhrman BP et al. Partial liquid ventilation enhances surfactant phospholipid production. *Crit Care Med*. 1996;24:1252-1256.
109. Morris K, Cox P, Frndova H et al. Effect of a sustained inflation on regional distribution of gas and perfluorocarbon during partial liquid ventilation. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42:204-209.
110. Gauger PG, Overbeck MC, Chambers SD et al. Partial liquid ventilation improves gas exchange and increases EELV in acute lung injury. *J Appl Physiol*. 1998;84:1566-1572.
111. Al Rahmani A, Awad K, Miller TF et al. Effects of partial liquid ventilation with perfluorodecalin in the juvenile rabbit lung after saline injury. *Crit Care Med*. 2000;28:1459-1464.

112. Overbeck MC, Pranikoff T, Yadao CM et al. Efficacy of perfluorocarbon partial liquid ventilation in a large animal model of acute respiratory failure. *Crit Care Med*. 1996;24:1208-1214.
113. Hallman M, Merritt TA, Jarvenpaa AL et al. Exogenous human surfactant for treatment of severe respiratory distress syndrome: a randomized prospective clinical trial. *J Pediatr*. 1985;106:963-969.
114. Dunn MS, Shennan AT, Possmayer F. Single- versus multiple-dose surfactant replacement therapy in neonates of 30 to 36 weeks' gestation with respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1990;86:564-571.
115. Long W, Corbet A, Cotton R et al. A controlled trial of synthetic surfactant in infants weighing 1250 g or more with respiratory distress syndrome. The American Exosurf Neonatal Study Group I, and the Canadian Exosurf Neonatal Study Group. *N Engl J Med*. 1991;325:1696-1703.
116. Houmes RJ, Verbrugge SJ, Hendrik ER et al. Hemodynamic effects of partial liquid ventilation with perfluorocarbon in acute lung injury. *Intensive Care Med*. 1995;21:966-972.
117. Merz U, Klosterhalfen B, Kellinghaus M et al. Effects of single and multiple doses of perfluorocarbon in comparison with continuous partial liquid ventilation on gas exchange and lung pathology in newborn surfactant-depleted pigs. *Crit Care Med*. 2001;29:645-651.
118. Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1997;25:1888-1897.
119. Hirschl RB, Croce M, Gore D et al. Prospective, randomized, controlled pilot study of partial liquid ventilation in adult acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:781-787.
120. Davies MW, Sargent PH. Partial liquid ventilation for the prevention of mortality and morbidity in paediatric acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;CD003845.
121. Kacmarek RM, Wiedemann HP, Lavin PT et al. Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:882-889.

## **6. Zusammenfassung:**

### Einleitung:

In der Behandlung der akuten Lungenschädigung konnte sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen gezeigt werden, dass partielle Flüssigkeitsbeatmung (PLV) mit Perfluorkarbonen (PFC) zu einer Verbesserung von Oxygenierung und Lungenmechanik führte<sup>(8-19)</sup>. Diese tierexperimentelle Studie an 15 neugeborenen Ferkeln (435g-960g) untersuchte einerseits die Einflüsse von PFC im Vergleich zu Surfactant (S) auf Lungenvolumen und Gasaustausch nach experimentell induzierter Lungenschädigung. Zum anderen wurde nach Fluoreszenzmarkierung von PFC und S deren intrapulmonale Verteilung auf regionale Verteilungsunterschiede hin untersucht und anhand eines 3-dimensionalen Würfelmodells der Lunge dargestellt.

### Methodik:

Nach Prämedikation und Präparation erfolgte die experimentell induzierte Lungenschädigung durch repetitive Kochsalzlavage (Surfactantdepletion) und anschließender Randomisierung. Die PFC-Gruppe (n=8) erhielt 30ml/kg PFC, die S-Gruppe (n=7) 120mg Curosurf. Sowohl das PFC als auch das S wurden vor ihrer intratrachealen Applikation mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FF) fluoreszenzmarkiert, wobei beide Substanzen als „Carrier“ für den gelösten FF dienten. Die spätere Messung der Fluoreszenzintensität (INT) gab damit indirekt die Menge an Carriersubstanz (PFC, S) an und ermöglichte dadurch den Vergleich in der räumlichen intrapulmonalen Verteilung. Zu den 3 Messzeitpunkten Studienbeginn („Baseline“), Lungenschädigung („LI“) und Studienende („240min“) erfolgte die Dokumentation der Parameter für Gasaustausch und Hämodynamik. Nach 240 Minuten Therapie wurden alle Lungen mit einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 10 cmH<sub>2</sub>O kontinuierlich gebläht, en bloc entnommen und in flüssigem Stickstoff fixiert, um eine nachträgliche Umverteilung des PFC und S innerhalb der Lungen zu verhindern. Die endgültige Fixierung erfolgte durch Gefriertrocknung der Lungen, die ein standardisiertes Zerschneiden der Lungen in Lungenwürfel definierter Größe (0,7cm<sup>3</sup>) ermöglichte. Anschließendes Wiegen und Zuordnung jedes Lungenwürfels innerhalb eines 3-dimensionalen Koordinatensystems zur späteren Rekonstruktion der Lungen. Die spektrometrische Messung der INT jedes Lungenwürfels sowie die Berechnung des Quotienten (Q) aus INT pro Würfelgewicht mit Darstellung der prozentualen

Abweichung von Q vom jeweiligen Mittelwert, ermöglichten den Vergleich zwischen den einzelnen Lungenwürfeln beider Therapiegruppen. Die Berechnung von Lungenvolumen und Lungendichte basierte auf der Kenntnis von Würfelanzahl, -größe und -gewicht. Die Verteilungsdarstellungen erfolgten sowohl nach Aufteilung der Lungen anhand der Carina des Tracheobronchialsystems in Lungenregionen als auch nach Normierung der unterschiedlich großen Lungen in eine gleiche Anzahl an Lungenschichten in der Ausbreitungsrichtung von apikal nach basal und von ventral nach dorsal. Zusätzlich graphische Verteilungsdarstellungen von PFC und S in einem 3-dimensional rekonstruierten Würfelmodell der Lungen. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Mann-Whitney U-Tests. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0.05$  festgelegt.

#### Ergebnisse:

Die Darstellung der intrapulmonalen Verteilung von PFC und S durch Fluoreszenzmarkierung mit einem FF ist mit der hier durchgeführten Methode möglich. Die graphische Darstellung der PFC-Verteilung zeigte ein eher inhomogenes Bild gegenüber S mit einer eher homogenen regionalen Verteilung innerhalb der Lunge. Durch Visualisierung des 3-dimensionalen Würfelmodells wurde zudem durch eine entsprechend hohe Anzahl an Lungenwürfeln und beliebige Rotation der Lungen im Koordinatensystem eine hochauflösende Darstellung am Computer ermöglicht. Bei statistischer Auswertung nach Lungenregionen lieferte die PFC-Gruppe ein bevorzugtes dorsobasales Verteilungsmuster (ventral vs. dorsal  $p < 0.0001$ , basal vs. apikal  $p < 0.0001$ ), gegenüber der S-Gruppe mit den höchsten Intensitäten (Q) ventral (ventral vs. dorsal  $p < 0.0001$ ). Dies zeigte sich ebenfalls in dem Auswertungsmodell nach Normierung der Lungen auf eine gleiche Anzahl an Lungenschichten, mit 72% Anreicherung von FF in den dorsalen Schichten gegenüber 58% in der S-Gruppe ( $p < 0.001$ ). Die statistische Auswertung der Regionen apikal nach basal erbrachte zwischen den Gruppen keinen sig. Unterschied mit den höchsten Intensitäten (Q) in der Region basal.

Die Gewichte der gefriergetrockneten Lungen sowie die Anzahl der Lungenwürfel zeigten keinen sig. Gruppenunterschied, obwohl die Lungen der PFC-Gruppe optisch größer wirkten und tendenziell mehr Würfel besaßen. Die Berechnung von Lungengewicht pro Anzahl der Lungenwürfel (Ratio) zeigte demgegenüber signifikant

niedrigere Werte in der PFC-Gruppe ( $p < 0.001$ ) gegenüber der S-Gruppe. Dies entsprach einem Unterschied in der Lungenexpansion von 38% (PFC). Sowohl die Berechnung des Lungenvolumens als auch der Lungendichte (Gewicht der gefriergetrockneten Lungen pro Lungenvolumen) erbrachte einen signifikanten Gruppenunterschied, mit höherem Lungenvolumen ( $p < 0.05$ ) und geringerer ~dichte ( $p < 0.001$ ) in der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe.

Die Analyse der respiratorischen und hämodynamischen Parameter nach 240 Minuten Studiendauer zeigte bis auf eine Ausnahme in der S-Gruppe (erhöhter  $\text{PaCO}_2$ , Lungenschädigung) zu den untersuchten Messzeitpunkten keinen sig. Unterschied zwischen den Gruppen. Lediglich bei Betrachtung möglicher Kurzzeiteffekte nach induzierter Lungenschädigung kam es nach 30 min ( $p < 0.01$ ) und 60 min ( $p < 0.05$ ) Therapiedauer zu einer niedrigeren prozentualen Änderung des Ventilatory Efficiency Index in Richtung Ausgangswerte bei Vergleich der PFC-Gruppe gegenüber der S-Gruppe, der signifikant war.

#### Schlussfolgerungen:

Die direkte Fluoreszenzmarkierung von PFC und S war eine geeignete Methode zur Darstellung der intrapulmonalen Verteilung beider Substanzen an dem verwendeten ARDS-Modell neugeborener Ferkel. Erst durch die direkte Fluoreszenzmarkierung wurde es zudem ermöglicht, PFC und S auf regionale Verteilungsunterschiede hin zu untersuchen. Hierbei zeigte sich eine unterschiedliche regionale Verteilung zwischen PFC und S, die anhand des 3-dimensional rekonstruierten Würfelmodells der Lunge visualisiert werden konnte.

Der Einfluss von PFC und S in der Therapie der experimentell induzierten Lungenschädigung auf Lungenvolumen und Lungendichte wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Die Berechnung von PEF (pulmonary expansion factor) zeigte hierbei eine Größenzunahme von PFC-behandelten Lungen, was Ergebnisse aus bisherigen Studien mit Röntgen-Aufnahmen bzw. histologischen Untersuchungen widerspiegelte.

Basierend auf den physikochemischen Eigenschaften der PFC würde man vermuten, dass durch die induzierte Lungenschädigung betroffene Lungenregionen von „alveolar recruitment“ profitieren würden, jedoch zeigten unsere Ergebnisse bei der Untersuchung von Messgrößen des Gasaustauschs keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Therapie mit S.

Ob die partielle Flüssigkeitsbeatmung mit PFC in der Therapie der akuten Lungenschädigung in Zukunft als alternative Therapiestrategie (z.B. bei Surfactant-Nonrespondern) zur Verfügung stehen wird, werden weitere Studienergebnisse zeigen müssen.

## 7. Abkürzungsverzeichnis:

art.	arteriell
Abb.	Abbildung
AF	Atemfrequenz
ALI	akute Lungenschädigung (acute lung injury)
ANS	Atemnotsyndrom
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	bronchoalveoläre Lavage
Ch.	Charrière
CMV	konventionelle maschinelle Beatmung
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
FiO <sub>2</sub>	fraktionelle, inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FF	Fluoreszenzfarbstoff
FRC	Funktionelle Residualkapazität
g	Gramm
GA	Gasaustausch
HF	Herzfrequenz
HMK	hyaline Membranenkrankheit
ID	Innendurchmesser
LI	lung injury (Lungenschädigung)
LV	liquid ventilation (Flüssigkeitsbeatmung)
MBP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAP	Mittlerer Atemwegsdruck
Max	Maximum
min	Minute
Min	Minimum
MW	Mittelwert
nLC	Anzahl der Gewebewürfel (number Lung Cubes)
OI	Oxygenation Index
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck



PIP	Spitzendruck (peak inspiratory pressure)
PEF	Pulmonary Expansion Factor (Lungenexpansionsfaktor)
PFC	Perfluorkarbon
PF5080	Perfluorooctan ( $C_8F_{18}$ )
PFOB	Perfluorooctylbromid ( $C_8F_{17}Br$ )
PLV	partielle Flüssigkeitsbeatmung (partial liquid ventilation)
RDS	Atemnotsyndrom (respiratory distress syndrome)
RR	Beatmungsfrequenz (respiratory rate)
S	Surfactant
SaO <sub>2</sub>	arterielle Sauerstoffsättigung
SD	Standardabweichung
sec.	Sekunden
sig.	signifikant
SMS	Surfactant-Mangel-Syndrom
TLV	totale Flüssigkeitsbeatmung (total liquid ventilation)
VEI	Ventilatory Efficacy Index
YG	Yellowgreen

## **8. Erklärung über Selbständigkeit:**

### **Erklärung**

Ich, Sebastian Hartenstein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Intrapulmonale Verteilung von Perfluorkarbon und Surfactant sowie deren Einfluss auf Lungenvolumen und Gasaustausch am ARDS-Modell neugeborener Ferkel“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

## **9. Lebenslauf:**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

## **10. Danksagung:**

Ich möchte mich in erster Linie bei meiner Frau Paulina und meinen beiden Söhnen Matthis und Lukas für die tatkräftige Unterstützung (und Abwechslung) danken, ohne die ich es nie geschafft hätte, meine Arbeit zu guter letzt auf Papier zu bringen. Beide inspirierten mich immer wieder, die Zeit die ich zum Schreiben dieser Arbeit hatte auch wirklich zu nutzen.

Natürlich gebührt auch dem Rest meiner Familie großen Dank, insbesondere dem Babysittern Oma Heidi und Opa Jürgen, die ebenfalls sehr viel Geduld und Verständnis aufbringen mussten sowie meinen beiden Eltern Oma Hanni und Opa Bernd.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer und Mentor Dr. Hans Proquitté. Er stand mir ausnahmslos und freundschaftlich zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

Zu guter letzt möchte ich meinem Doktorvater Prof. Roland Wauer für seine Ausdauer und kritischen Korrekturvorschläge danken, ohne die ich sicherlich noch immer an meiner Doktorarbeit sitzen würde. Ich wünsche ihm für seine weitere Zukunft nur das Allerbeste.