

6. Methoden

6.1. Gewinnung der Minilavage (BAL)

Die Minilavagen wurden vom trachetomierten Schweinen vor, 5 Minuten und 180 Minuten nach der Extrakorporalen Zirkulation blind gewonnen. Diese, durch mehrere Autoren etablierte Methode, ist mit der Lavage unter bronchoskopischer Sicht gleichrangig. Beide Verfahren kommen in der Pneumoniediagnostik zum Einsatz (PALMER et al. 1995, PAPA ZIAN et al. 1995, PUGIN et al. 1991, ROUBY et al. 1989). Zur Lavagegewinnung wurde 20 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung (37°C) in den Bereich der Bronchi dexter oder trachealis instilliert und sofort wieder aspiriert. Zur Weiterverarbeitung wurde die Bronchialflüssigkeit auf ein Endvolumen von 50 ml verdünnt und mittels Rüttler homogenisiert. Die anschließende Filtration durch vierlagige Gaze diente der Entfernung der mukösen Bestandteile. Zur Reinigung der Zellsuspension wurde nach 10 minütiger Zentrifugation bei 400 Umdrehung pro Minute und 4°C der BALF abgesaugt, das Zellpellet aufgeschüttelt und mit PBS erneut auf 50 ml verdünnt. Nach wiederholtem Zentrifugieren und Einstellen des Überstands auf genau 2 ml wurde die Lavage für die Weiterverarbeitung bei minus 70°C eingefroren.

6.2. Leukozytenzählung der BAL

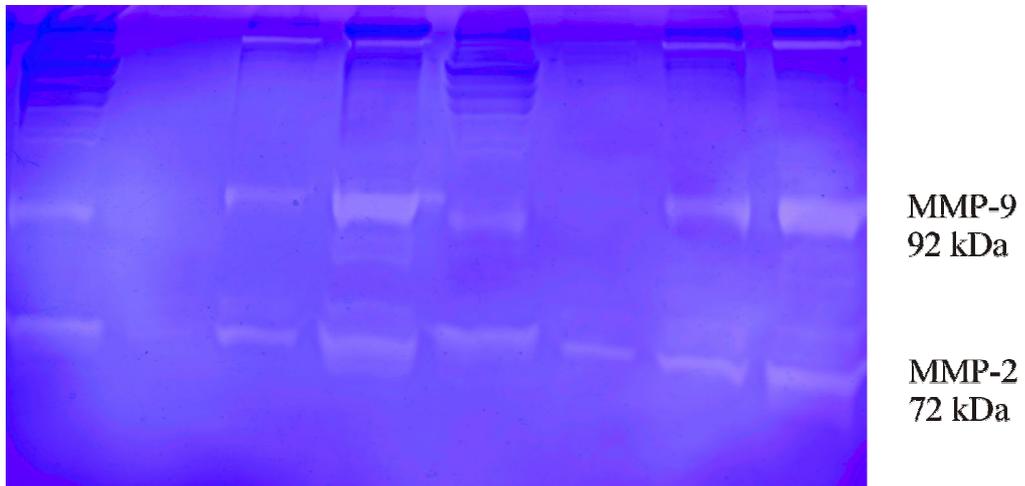
Jeweils 38 µl Probe wurden mit 190 µl Isoton II-Lösung in ein Plastikgefäß pipettiert und gut vermischt. Die Gesamtleukozytenzahl wurde mit Hilfe des Coulter Counter gezählt.

6.3. Zymographie

Die aufgetauten und auf einem Vortexrüttler gemischten Proben wurden 1:2 mit Geladungspuffer verdünnt. Jeweils 40 µl der Probengemische wurden in die Geltaschen des SDS-Polyacrylamid-Fertiggels mit Gelatine der Firma Biorad pipettiert. Zur besseren Vergleichbarkeit lief als Kontrolle ein humaner Pleuraerguß, der die Enzyme MMP-2 und MMP-9 enthielt, mit.

Für eine optimale Auftrennung des Proteingemisches nach Größe und elektrischer Ladung erfolgte die Einsetzung des Gels in eine Elektrophoresekammer der Firma Biorad. Mit einer Stromstärke von 40 mA bei 220 Volt wanderten die Proteine 180 Minuten zur positiven Elektrode. Um ein besseres Trennresultat zu erzielen, liefen die Gele auf Eis. Ein blauer Farbmaler, der im Probenpuffer enthalten war, zeigte den Stand der Elektrophorese an. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde zur Herstellung der katalytisch wirksamen Tertiärstruktur der Proteasen durch einstündiges Waschen in Triton X-100 (Octoxynol-9) das denaturierte SDS entfernt. Anschließend inkubierten die renaturierten Gele bei einer Temperatur von 37°C für 19 h im Enzymaktivierungspuffer im Brutschrank und wurden nach erfolgtem Gelatineverdau mit Coomassie-Blue-Lösung (Biorad) komplett gefärbt. Zur Darstellung der Banden der gelantiolytischen Enzymaktivität wurde das Gel mit einer Entfärberlösung so lange behandelt, bis sich weiße Balken mit einem deutlich blauen Hintergrund darstellten. Zur Konservierung wurden die Gele in 1 %iger Glycerollösung fixiert und luftdicht zwischen zwei Zellulosefolien eingeschweißt.

Abb. 2: Zymographiegel mit MMP-2 und MMP-9



6.4. ELISA (Enzyme linked Immunoassay)

Das Prinzip der ELISA beruht auf Sandwich Antigen-Antikörperreaktionen. Am Boden der Mikrotiterplatte ist ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen das jeweilige spezifische Phasenprotein befestigt, welches sich an die in den Proben befindlichen nachzuweisenden Akutphasenproteine bindet. Andere Substanzen müssen in den sich nun anschließenden Waschschrift entfernt werden. Darauf bindet sich ein, mit Biotin markierter, monoklonaler Antikörper gegen eine andere Determinante des Akutphasenproteins. Zur Auswertung des Testes wird Streptavidin Peroxidase als blauer Farbindikator hinzugefügt. Um den Test zu standardisieren, wurde die Farbreaktion nach einer vorgegebenen Zeit mit Schwefelsäure gestoppt.

Für die genaue Messung der Cytokine mussten die Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut und dann mittels Rüttler gut durchmischt werden. Die weitere Durchführung der jeweiligen ELISA's für die verschiedenen Interleukine, TNF- α , IL-1 β , und IL-8, erfolgte nach genauer Herstelleranweisung. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Proben wurden mit Standard Verdünnungspuffer 1:2 vorverdünnt und mittels Rüttler gut vermischt. Jeweils 100 μ l Probengemisch wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem zum Kit gehörigen Waschpuffer und Blotten der Mikrotiterplatte wurden 100 μ l Biotin hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur stengelassen. Nach einem weiteren dreimaligen Waschvorgang erfolgte die Zugabe von Streptavidin Peroxidase. Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 100 μ l des Farbstoffes Tetramethylbenzidine in jede Vertiefung pipettiert und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Raum stengelassen. Darauf erfolgte die Unterbrechung der Farbreaktion mit 100 μ l Stopplösung. Die Extinktionen wurden mit einer Wellenlänge von 440 nm im letzten Arbeitsschritt mittels dem Plattenlesegerät Dynatech MR 5000 der Firma Guernsey, Channel Island Groß Britannien ermittelt. Der Schwellenwert zur Bestimmung bei den gemessenen Parametern liegt für TNF- α bei 6 pg/ml, für IL-1 β bei 15 pg/ml und für IL-8 bei 10 pg/ml.

6.5. Proteinbestimmung in der BAL

Der Proteinnachweis beruhte auf dem Bradford Protein-Assay. Als Standard wurde Albumin verwendet. 20 ml Coomassie-Blue R-250 wurde in 80 ml Salzlösung gelöst. Von dieser Verdünnung wurden 5 ml mit entweder 100 µl Standard oder mit 100 µl Probe versetzt. Die optische Dichte des Gemisches wurde bei einer Wellenlänge von 575 nm mittels Spektrophotometer gemessen.

6.6. Leukozytenbestimmung im Blut

Das arterielle Blut wurde durch die Punktion des linken Atriums und das venöse Blut via eines Zentralen Venenkatheters mittels Einstufenkatheter der Firma Josta gewonnen und in Blutröhrchen gesammelt. Die Quantifizierung der Leukozyten erfolgte maschinell mittels eines Coulter Counters. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf dem elektrischen Widerstand, der von den Zellen ausgelöst wird.

Zur Differenzierung der Leukozyten wurden Blutausstriche hergestellt und nach Pappenheim gefärbt. Ein kleiner Blutstropfen wurde in 1 - 2 cm Entfernung vom Rand der Schmalseite auf einen sauberen und fettfreien Objektträger gebracht. Ein zweiter Objektträger wurde mit seiner Schmalkante so in einem Winkel von 45° an den Tropfen heranbebracht, dass sich dieser auf der Unterseite des schräggestellten Glases entlang der Kante ausbreitete. Nun wurde der schräggestehende Objektträger über den horizontalen Objektträger geschoben und damit der Blutstropfen nachgezogen. Die Ausstriche wurden luftgetrocknet und beschriftet. Nun wurden die Objektträger auf eine Färbekbank gelegt und mit konzentrierter May-Grünwald-Lösung bedeckt. Die Einwirkdauer betrug 5 Minuten. Im folgenden wurde die gleiche Menge Aqua Dest auf den Objektträger pipettiert und wirkte für 1 - 2 Minuten ein. Im weiteren Schritt wurde der Objektträger mit Aqua Dest abgespült. Nun wurde verdünnte Giemsa-Lösung (1:20 verdünnt) für 20 Minuten auf den Objektträger verbracht. Nach scharfem Abspülen mit Aqua Dest und Entfernen von Farbniederschlägen trocknete der Objektträger auf der Kante stehend an der Luft. Die Zelldifferenzierung erfolgte mittels Mikroskop.

6.7. Trocken- Feuchtgewicht der Lunge

Repräsentative Gewebeproben wurden aus beiden Lungenflügeln gewonnen und von fremdem Gewebe, das nicht zum Lungenparenchym gehört gesäubert und das Gewicht des feuchten Lungengewebes mit einer Haushaltswaage gemessen.

Um das Trockengewicht der Gewebestücke zu erhalten mussten die Proben gefriergetrocknet werden. Nach dem Trockenvorgang wurde das Gewebe wieder gewogen. Der Prozentsatz des Gewebewassers der Lunge wurde nach folgender Formel kalkuliert:

$$\text{Wassergehalt[\%]} = \frac{\text{Feuchtgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Feuchtgewicht}} \times 100$$

6.8. Pulmonale Funktionsparameter

Während bestimmter Meßzeitpunkte wurden folgende Beatmungsparameter aufgezeichnet: Beatmungsspitzenruck, Beatmungsplateaudruck, Beatmungsmitteldruck, Tidalvolumen, Atemfrequenz, statische Compliance der Lunge, Atemzeitvolumen, PEEP, die arterielle Sauerstoffsättigung, der arterielle Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und der arterielle Kohlendioxiddruck (pCO_2).

6.9. Oxygenierungsindices

Unterschiedliche Oxygenierungsindices wurden bestimmt, um funktionelle Veränderungen des pulmonalen Gasaustausches verifizieren zu können. Vor Ermittlung dieser Parameter wurde die kontrollierte Beatmung mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 100 % ($FIO_2 = 1,0$) über einen Zeitraum von 15 Minuten durchgeführt. Zur Bestimmung der unterschiedlichen Indices wurden arterielles Blut aus dem Aortenkatheter und gemischtvenöses Blut aus dem Pulmonalkatheter gewonnen.

Errechnung der Indices:

Die Alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz (AaDO₂):

Die Alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz ist die Differenz zwischen Sauerstoffpartialdruck in der Alveolarluft und im arteriellen Blut und ergibt sich aus folgender Formel:

$$AaDO_2 = P_AO_2 - P_aO_2.$$

Der alveolare Sauerstoffpartialdruck (P_AO₂) berechnet sich durch die Alveolargleichung:

$$P_AO_2 = P_I O_2 - \frac{P_A CO_2}{RQ} + \left(P_A CO_2 \times FIO_2 - \left(\frac{1 - RQ}{RQ} \right) \right)$$

Die Gleichung sagt aus, dass der alveolare Sauerstoffpartialdruck die Differenz aus inspiratorischem Sauerstoffpartialdruck (P_IO₂) und alveolärem Kohlendioxidpartialdruck (P_ACO₂) ist.

Die Anwendung dieser Gleichung zur Berechnung des alveolaren Sauerstoffpartialdruck setzt voraus, dass kein Kohlendioxid der Inspirationsluft beigefügt ist. Folglich muss die inspiratorische Sauerstoffkonzentration 100 % betragen. Eine anschließende Auswaschzeit für N₂ von mindestens 15 Minuten muss ebenfalls gewährleistet sein.

Unter der Voraussetzung, dass der veno-arterielle Shunt als < 20 % angenommen wird, darf P_ACO₂ = P_aCO₂ gesetzt werden. Der respiratorische Quotient wurde unter den Bedingungen einer ausgeglichenen Eiweiß/Kohlenhydrat/Fett-Diät mit 0,8 angenommen.

Der inspiratorische Sauerstoffpartialdruck ist eine Größe, die sich aus inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (FiO₂), atmosphärischen Druck (P_{Atmosphäre}) und dem Partialdruck von Wasserdampf (P_{H₂O}) durch folgende Formel errechnet:

$$P_{I\text{O}_2} = F_{I\text{O}_2} \times (P_{\text{Atmosphäre}} - P_{\text{H}_2\text{O}}).$$

Der atmosphärische Druck wird unter Standardbedingungen mit 760 mmHg, und der Partialdruck von Wasserdampf bei einer Körpertemperatur von 37°C mit 47 mmHg angenommen.

Unter diesen Bedingungen ergibt sich zur Berechnung der alveolo-arteriellen Sauerstoffpartialdruckdifferenz folgende Gleichung:

$$AaDO_2 = \left(714 - \frac{P_a\text{CO}_2}{0,8} + (P_a\text{CO}_2 - 0,25) \right) - P_a\text{O}_2$$

6.10. Veno-arterielle Shunt (Q_s/Q_T)

Zur Berechnung des veno-arteriellen Shunts wurden folgende Parameter bestimmt: der Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes (CaO_2), der endpulmonalkapilläre Sauerstoffgehalt (CcO_2), der gemischtvenöse Sauerstoffgehalt des Blutes (CvO_2) sowie die Alveolo-arterielle Sauerstoffpartialdruckdifferenz ($AaDO_2$).

Der Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes (CaO_2) spiegelt das Verhältnis von arteriellem Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2), arterieller Sauerstoffsättigung (S_aO_2) und Hämoglobinkonzentration (Hb) wieder und errechnet sich aus der Gleichung:

$$CaO_2 = P_aO_2 \times 0,0031 + (Hb \times 1,39 \times S_aO_2).$$

Der gemischtvenöse Sauerstoffgehalt des Blutes (CvO_2) ist eine Funktion aus gemischtvenösem Sauerstoffpartialdruck (P_vO_2), gemischtvenöser Sauerstoffsättigung (S_vO_2) sowie Hämoglobinkonzentration (Hb) und wurde mit folgender Standardformel errechnet:

$$CvO_2 = P_vO_2 \times 0,0031 + (Hb \times 1,39 \times S_vO_2).$$

Der endpulmonalkapilläre Sauerstoffgehalt (CcO_2) als Funktion des alveolären Sauerstoffpartialdrucks (P_AO_2) und der Hämoglobinkonzentration (Hb) wurde mittels folgender Gleichung ermittelt:

$$CcO_2 = P_AO_2 \times 0,0031 + (Hb \times 1,39).$$

In Abhängigkeit vom P_aO_2 wurden zwei unterschiedliche Formeln zur Berechnung des veno-arteriellen Shunts herangezogen:

bei einem $P_aO_2 > 150$ mmHg wurde folgende Formel zugrunde gelegt:

$$Q_S/Q_T = \frac{AaDO_2 \times 0,0031}{AaDO_2 \times 0,0031 + (CaO_2 - CvO_2)}$$

bei einem $P_aO_2 < 150$ mmHg wurde folgende Gleichung genutzt:

$$Q_S/Q_T = \frac{CcO_2 - CaO_2}{CcO_2 - CvO_2}$$

6.11. Bestimmung der Leukozytensequestration

Die Gesamtleukozytenzahlen der Blutproben aus dem linken und dem rechten Herzvorhöfen wurden mit einem Coulter Counter bestimmt. Anschließend wurde die Gesamtleukozytenzahl des linken Vorhofs von der Gesamtleukozytenzahl des rechten Vorhofes subtrahiert. Die Differenz weist auf den Verlust der Leukozyten im peripheren Blut hin und stellt so eine Größe für die Lungensequestration dar.

6.12. Statistische Auswertung

Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben, soweit nicht anders erwähnt. Die Signifikanzprüfung für gepaarte, nicht parametrische Stichproben wurde mittels Friedmantest bestimmt. Die Prüfung auf Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Die Korrelationen wurden mit der Rangkorrelation nach Spearman errechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 5\%$ ($p < 0,05$) wurde statistisch als signifikant angesehen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 8 der Firma SPSS, Chicago Illinois, USA.