

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Leiter: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

Einfluss der Pufferung einer hyperkapnischen Azidose auf die systemische  
Inflamationsreaktion und den Grad der Lungenschädigung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

von

Anja Katrin Merinsky

aus Backnang

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. K.-M. Debatin

1.Berichterstatter: PD Dr. med. H. Hummler

2.Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Radermacher

Tag der Promotion: 19.10.2006

Meiner Familie

---

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>8</b>
2.1 Tiere .....	8
2.2 Beatmungsgerät.....	8
2.3 Vorbereitung der Tiere .....	9
2.4 Narkose und Anästhesie .....	10
2.5 kardiale Überwachung.....	10
2.6 Messung des Herzzeitvolumens und Berechnung des Sauerstofftransports .....	11
2.7 Erhaltungsinfusion .....	12
2.8 Datenaufzeichnung.....	12
2.9 Protokoll .....	12
2.10 weitere Blutproben .....	19
2.11 Blutgasanalysen .....	20
2.12 BAL.....	20
2.13 Untersuchung der Lungen.....	21
2.13.1 Gewebe.....	21
2.13.2 Feucht-/Trockengewicht.....	21
2.13.3 Makroskopische Beurteilung.....	21
2.13.4 Lungenhistologie .....	22
2.14 Statistik.....	23
2.14.1 Zielkriterien .....	23
2.14.2 Fallzahlberechnung.....	23
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
3.1 Gewicht, Zahl der Lavagen, Baselinewerte und benötigte Puffermengen.....	24
3.2 Feucht-/Trockengewicht.....	26
3.3 Proteinbestimmung .....	26
3.4 Interleukin-8-Bestimmung.....	29
3.4.1 im Plasma .....	29
3.4.2 in der BAL.....	29
3.4.3 im Homogenat .....	31
3.5 Lungengewebe .....	33
3.5.1 makroskopische Auswertung.....	33
3.5.2 histologische Beurteilung.....	35
3.6 Volumenzufuhr .....	37
3.7 Blutproben .....	38
3.7.1 Leukozytenkonzentrationen .....	38

---

3.7.2	neutrophile Granulozyten.....	39
3.7.3	Thrombozyten.....	40
3.7.4	Hämatokrit.....	40
3.8	Blutgasanalysen .....	41
3.8.1	PaCO <sub>2</sub> .....	41
3.8.2	PaO <sub>2</sub> .....	42
3.8.3	SaO <sub>2</sub> .....	43
3.8.4	Herzzeitvolumenindex und Sauerstofftransport .....	44
3.9	metabolische Parameter.....	46
3.9.1	pH-Wert: .....	46
3.9.2	Laktat .....	47
3.9.3	Basenüberschuss .....	48
3.9.4	Glukose .....	48
3.10	Elektrolyte .....	49
3.10.1	Natriumkonzentration .....	49
3.10.2	Kaliumkonzentration.....	50
3.10.3	ionisiertes Kalzium .....	51
3.11	Broncho-alveoläre Lavage.....	52
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
4.1	Gründe für die Anwendung des vorliegenden Tiermodells .....	55
4.2	Verwendeter Puffer .....	56
4.3	Diskussion der Messwerte.....	57
4.3.1	Direkte Hinweise auf die Lungenschädigung.....	57
4.3.2	Blutproben.....	62
4.3.3	Blutgasanalysen .....	63
4.3.4	metabolische Parameter .....	65
4.3.5	Elektrolyte .....	67
4.3.6	Broncho-alveoläre Lavage .....	68
4.4	Schlussfolgerung.....	69
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>75</b>

**Verwendete Abkürzungen**

$\Delta$	delta; Differenz
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A.	Arteria
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	broncho-alveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
CO	Cardiac Output
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C-PAP	kontinuierlich positiver Atemwegsdruck
CtO <sub>2</sub>	Sauerstoffkonzentration (vol%)
F	French
FiO <sub>2</sub>	Sauerstoffanteil im Atemgas
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
HMD	hyaline membrane disease
HZV	Herzeitvolumen
HZVI	Herzeitvolumenindex
IE	Internationale Einheiten
IL-8	Interleukin 8
IRDS	idiopathic respiratory distress syndrome
KG	Körpergewicht
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumbicarbonat
PACO <sub>2</sub>	alveolärer Kohlenstoffdioxid Partialdruck
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlenstoffdioxid Partialdruck
PaO <sub>2</sub>	arterieller O <sub>2</sub> Partialdruck
PAO <sub>2</sub>	alveolärer Sauerstoffpartialdruck
Paw	plateau airway pressure
Pe	ösophagealer Druck
PEEP	positive end-expiratory pressure
PIP	peak inspiratory pressure
RDS	respiratory distress syndrome
SaO <sub>2</sub>	arterielle Sauerstoffsättigung
SD	Standardabweichung
VILI	Ventilator induzierte Lungenschädigung
V <sub>t</sub>	Tidalvolumen
ZVD	zentralvenöser Druck

# 1. Einleitung

Das Atemnotsyndrom des Neugeborenen [45] stellt eine schwerwiegende Komplikation bei der Versorgung von Frühgeborenen dar. Aufgrund des noch unzureichend ausgebildeten Lungengewebes mit einer zu geringen Menge an Alveolen und der mangelhaften Bereitstellung von Surfactant durch die Pneumozyten Typ 2 kann sich das Neugeborene nicht ausreichend an die extrauterinen Bedingungen adaptieren.

In den USA treten pro Jahr 40 000 RDS Fälle bei Neugeborenen auf, wobei es sich bei etwa 14% aller Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht entwickelt [45]. Die Inzidenz bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter von 29 Wochen beträgt 60 Prozent und stellt somit die häufigste Form der Atemstörung des Frühgeborenen dar [45]. Je unreifer das Neugeborene bei seiner Geburt ist, desto höher ist die Inzidenz eines RDS [45]. Auffallend ist, dass das Atemnotsyndrom des Neugeborenen häufiger bei männlichen als bei weiblichen Neugeborenen auftritt und die Inzidenz bei einer Entbindung mittels Kaiserschnitt höher liegt als bei einer vaginalen Entbindung [45].

Neben einer generellen Unreife des Frühgeborenen stellen ein Gestationsdiabetes oder ein insulinabhängiger Diabetes der Mutter Risikofaktoren dar [45].

Unreife Neugeborene können zwar gewisse Mengen Surfactant produzieren und in den Alveolarraum ausschütten, jedoch wird die Funktion des Surfactants durch sich im Alveolarraum befindenden Plasmaproteine, welche durch Überdehnung und Epithelschädigungen in den Alveolarraum austreten, gehemmt. Durch die Reduktion des oberflächenaktiven Surfactants und die zunehmende Zahl atelektatischer Bereiche werden die Compliance und die funktionelle Residualkapazität der Lunge reduziert.

Durch intrapulmonale Shunts infolge von Atelektasen und durch extrapulmonale Shunts infolge noch geöffneter Verbindungen des großen und kleinen Kreislaufs passiert ein großer Anteil des Blutes die Lunge ohne am Gasaustausch teilzunehmen und gelangt ohne Sauerstoffanreicherung in den großen Kreislauf [45].

Eine Aktivierung der Gerinnung mit Schädigung des Kapillarendothels und proteinhaltige hyaline Membranen in den Alveolen können die Gasdiffusion durch Verlängerung des Diffusionsweges noch zusätzlich einschränken. Diese pathologisch-anatomischen

Verbindungen führen zu Ventilations-Perfusions-Verteilungsstörungen, die häufig zu Hypoxämie und Hyperkapnie führen.

Klinische Zeichen sind sichtbare Einziehungen, Tachypnoe, expiratorisches Stöhnen, Zyanose und Nasenflügeln. Unbehandelt kann die Erkrankung zum Tod durch Ateminsuffizienz führen.

Die Behandlung des Atemnotsyndromes des Neugeborenen beinhaltet vor allem die Behandlung mit Sauerstoff, mechanische Atemhilfe, sowie die Verabreichung von Surfactant um vor allem die Hypoxämie zu vermeiden.

Die Lunge kann jedoch durch konventionelle maschinelle Beatmung mit einem hohen Tidalvolumen (10-15 ml/kg) und hohem PIP (peak inspiratory pressure) stark geschädigt oder vorbestehende Lungenschäden verstärkt werden [16]. Klinische Folgen sind eine höhere Inzidenz von extraalveolärer Luft [10, 14], Ödembildung, eine Inflammationsreaktion und mittelfristig die Proliferation von Fibroblasten und Typ 2 Pneumozyten [47]. Beobachtete beatmungsinduzierte histologische Veränderungen sind Nekrosen des Bronchialepithels und die Ausbildung von hyalinen Membranen [5].

Beim RDS ist meist ein Großteil des Lungengewebes kollabiert, so dass das gesamte  $V_t$  in den geringen noch belüfteten Teil der Lunge gelangt. Als Ursache für die beatmungsinduzierte Schädigung wurden Überdehnung dieser belüfteten Lungenareale und Scherkräfte durch wiederholtes Kollabieren und Wiedereröffnen der Alveolen, sowie die Schädigung der Lungenkapillaren identifiziert [8].

Darüber hinaus bewirkt mechanische Belastung eine Ausschüttung von Zytokinen sowohl in die Alveolen als auch in den gesamten Körperkreislauf im Sinne einer Entzündungsreaktion, die letztendlich durch Multiorganversagen zum Tod führen kann [15]. Um diese ventilator-induzierte Lungenschädigung (ventilator induced lung injury; VILI) zu minimieren, wurde, basierend auf ein erstmals Anfang der 80er Jahre bei Asthma-Patienten angewandtes Konzept [32], folgende Strategie von Hickling et al. [14] auf die RDS-Behandlung übertragen:

- Verminderung des Atemwegsspitzendruckes  $P_{aw}$  auf Werte zwischen 30 und 35 cmH<sub>2</sub>O und somit auch des Tidalvolumens um einen Dehnungsschaden zu vermeiden
- Beatmung mit ausreichend hohem PEEP, um möglichst viele Alveolen offen zu halten und um zyklische Atelektasenbildung und ungünstige Scherkräfte zu vermeiden

Durch Anwendung dieser volumenreduzierten-drucklimitierten Beatmung ließ sich in mehreren Studien eine Verringerung der Mortalität [2, 18, 34] und eine Verkürzung der notwendigen Beatmungszeit [2] erwachsener ARDS Patienten erzielen. Mariani et al. konnten in einer randomisierten Studie bei Frühgeborenen eine signifikant kürzere Beatmungszeit bei Frühgeborenen, die mit permissiver Hyperkapnie beatmet wurden, im Vergleich zu normokapnisch beatmeten Kindern feststellen [30].

Die Limitierung des Tidalvolumens bzw. des Beatmungsdruckes führt aufgrund des verringerten Atemzeitvolumens zwangsläufig zu einer Erhöhung des CO<sub>2</sub> Partialdruckes (PaCO<sub>2</sub>) im Blut und damit zur respiratorischen Azidose. Die Tolerierung dieser CO<sub>2</sub>-Erhöhung bei dieser lungen-protektiven Beatmungsstrategie führte zu dem von Hickling et al. [14] eingeführten Begriff „**Permissive** Hyperkapnie“.

Hyperkapnie galt lange Zeit als eigentlich nicht gewünschte Nebenwirkung der lungen-protektiven Beatmung. In den letzten Jahren mehren sich jedoch Kenntnisse für organ-protektiven Effekte einer hyperkapnischen Azidose.

Die durch Ischämie geschädigte Herzmuskulatur zeigt bei der Reperfusion mit azidotischem Blut eine deutliche Verbesserung der kardialen Funktion im Vergleich zu der Reperfusion mit alkalischem Blut. Als Erklärung für diese Unterschiede wird eine hyperkapnie-induzierte koronare Vasodilatation herangezogen [35].

Auch am Gehirn unreifer Ratten lassen sich nach stattgehabter Ischämie positive Effekte einer Hyperkapnie im Sinne eines selteneren Auftretens und eines vermindertes Ausmaßes einer ischämisch-hypoxischen Hirnschädigung beobachten [48], wobei eine Verbesserung des zerebralen Blutflusses, eine Erleichterung des Sauerstofftransports ins Gewebe und eine verbesserte Glucoseverwertung als pathophysiologische Faktoren vermutet werden [48].

Nur wenige randomisierte Studien haben bisher am in vivo Modell die pulmonalen und systemischen Wirkungen der permissiven Hyperkapnie bei akuter Lungenschädigung untersucht [25].

Neuere Untersuchungen an verschiedenen in vivo Tier-Modellen nach Ischämie-Reperfusionsschaden [25, 43] und an isolierten Kaninchenlungen [24] konnten nachweisen, dass bei gleichem Baro- bzw. Volutrauma unter hyperkapnischen Bedingungen im Vergleich zu normokapnischen Bedingungen der Grad der Lungenschädigung, gemessen an der Verhinderung einer Kapillarpermeabilitätssteigerung

[42], gemindert werden kann. Des weiteren wurde in diesem Modell eine Verbesserung der Lungenmechanik sowie eine Abschwächung der pulmonalen Entzündungsreaktion und der durch freie Sauerstoffradikale entstehenden Schäden nachgewiesen [25].

Diese Ergebnisse machten jedoch weitere Experimente nötig um die Frage zu klären, ob der lungenprotektive Effekt auf den erhöhten CO<sub>2</sub> Partialdruck oder auf die entstehende Azidose zurückzuführen ist und des weiteren, inwieweit eine metabolische Azidose ähnliche Effekte erzeugt.

In einer weiteren Untersuchung konnten Laffey et al. [24] zeigen, dass in isolierten, perfundierten Kaninchenlungen sowohl eine respiratorische als auch eine metabolische Azidose vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden schützen kann, und dass dieser protektive Effekt einer hyperkapnischen Azidose durch Pufferung reduziert wird. Laffey et al. schlossen daraus auf einen protektiven Effekt der Azidose per se.

Eine hyperkapnische Azidose kann jedoch die Kontraktilität des Herzens und damit die Hämodynamik negativ beeinflussen [50]. Daher wird in der Klinik eine durch Anwendung einer permissiven Hyperkapnie induzierte respiratorische Azidose meist gepuffert [34]. Untersuchungen, inwieweit der protektive Effekt der Hyperkapnie auf die Lunge und deren Auswirkung auf andere Organe durch Pufferung des Blut pH-Wertes mit Na<sup>+</sup>-Bicarbonat abgeschwächt wird, wurden jedoch nur an isolierten Lungen und bisher nicht *in vivo* durchgeführt.

Mit der vorliegenden Studie sollte der Einfluss einer Pufferung auf den Grad der Lungenschädigung unter hyperkapnischen Bedingungen *in vivo* in einem RDS Tiermodell untersucht werden. Sie knüpft an Untersuchungen von Hummler et al. [22] an, die an diesem Tiermodell nicht nur eine Verbesserung der Oxygenierung durch Hyperkapnie sondern auch eine Verminderung der Lungenschädigung und der systemischen Entzündungsreaktion durch Hyperkapnie in Kombination mit einem verringerten Tidalvolumen nachweisen konnten.

Die vorliegende Studie untersuchte die Hypothese, dass der Grad der Lungenschädigung, gemessen am Feucht-/Trockengewicht der Lunge unter gepuffert hyperkapnischer Azidose (physiologischer pH-Wert) um mindestens 25% höher ist als unter nicht korrigierter hyperkapnischer Azidose.

## 2. Material und Methoden

Dieser Tierversuch wurde von der Tierschutzkommission des Landes Baden-Württemberg genehmigt. Es handelt sich um eine randomisierte, kontrollierte Studie an 28 Kaninchen in zwei verschiedenen Behandlungsgruppen, die im Tierforschungszentrum Oberberghof durchgeführt wurde.

### 2.1 *Tiere*

Als Versuchstiere dienten 28 weibliche Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ mit einem Gewicht von  $3076 \text{ g} \pm 105$  (Tabelle 1).

Tabelle 1 :

Körpergewicht in Gramm(g) der Kaninchen der gepufferten und der ungepufferten Gruppe als Mittelwert +/- SD

	<b>Einheit</b>	<b>gepufferte Gruppe</b>	<b>nicht gepufferte Gruppe</b>
Körpergewicht	g	$3102 \pm 76$	$3050 \pm 125$

### 2.2 *Beatmungsgerät*

Ein Stephanie Kinder-Beatmungsgerät (Stephan Medizintechnik GmbH, Gackebach, Deutschland) wurde bei der Studie verwendet. Es handelt sich um ein wahlweise volumen- oder druckkontrolliertes zeitgesteuertes Beatmungssystem. Mittels eines Pneumotachographen, der zwischen dem Beatmungskreisteil und dem Endotrachealtubus angebracht ist, kann der Atemgasfluss gemessen werden. Des Weiteren kann bei diesem Beatmungsgerät zwischen kontrollierter mechanischer Beatmung, intermittierender mandatorischer Beatmung, Hochfrequenz-oszillations-Beatmung und C-PAP (kontinuierlich positiver Atemwegsdruck) gewählt werden.

### 2.3 *Vorbereitung der Tiere*

Die Kaninchen wurden nach Anlage eines peripher-venösen Zuganges an einer Vene des rechten Ohres in thermoneutraler Umgebung (handelsübliche, offene servo-kontrollierte Neugeborenenpflegeeinheit, Babytherm 8000, Dräger, Lübeck, Germany) nach Gabe von 0,2 mg/kg Atropin zur Vermeidung vagaler Reflexe mit Ketamin/Xylazin (Ketamin 15-40 mg/kg KG, Xylazin 1,5-4 mg/kg KG) i.v. narkotisiert und mit einem Tubus der Größe 3,5 mm (Innendurchmesser) mit Manschette intubiert. Die Tiere wurden in Rückenlage positioniert.

Anschließend wurden die Tiere synchronisiert, volumenkontrolliert und zeitgesteuert mit einem  $FiO_2$ : 0,4,  $V_t$ : 8 ml/kg, PEEP: 4mmHg, Inspirationszeit: 0,5 s, Beatmungsfrequenz 40/min und einer Temperatur des befeuchteten Atemgases von 37 °C beatmet. Die Beatmungsfrequenz wurde während der Instrumentierung gegebenenfalls angepasst, um den  $PaCO_2$  im Zielbereich (35-45 mmHg) zu halten. Der Atemgasflow wurde von der Datenschnittstelle des Beatmungsgeräts abgeleitet, der Atemwegsdruck am Konnektor des endotrachealen Tubus gemessen. Das Tidalvolumen wurde aus dem Integral des Flows berechnet.

In den distalen Ösophagus wurde eine mit sterilem Wasser gefüllte Magensonde der Größe 5 F eingebracht, um eine kontinuierliche Messung des Ösophagusdruckes zu ermöglichen. Die korrekte Lage dieser Sonde wurde durch kurze endexpiratorische Okklusion und Thoraxkompressionen überprüft wurde, wobei ein Verhältnis  $\Delta P_e/\Delta P_{aw}$  von  $1,00 \pm 0,05$  als korrekte Lage akzeptiert wurde. Andernfalls wurde die Lage des Ösophaguskatheters verändert, bis das gewünschte Verhältnis gemessen wurde. Um Blasenbildung innerhalb der Ösophagussonde zu vermeiden wurde diese mit 3 ml/h 0,9%iger NaCl Lösung kontinuierlich gespült.

Die Körpertemperatur wurde über eine rektale Temperatursonde (Siemens Sirecust 302, Erlangen, Germany) kontinuierlich gemessen und mittels einer heizbaren Unterlage und eines Deckenstrahlers eine Zielkörpertemperatur von 38,5-39,5 °C erreicht.



Abbildung 1:  
Neugeborenen-Intensivbehandlungsplatz

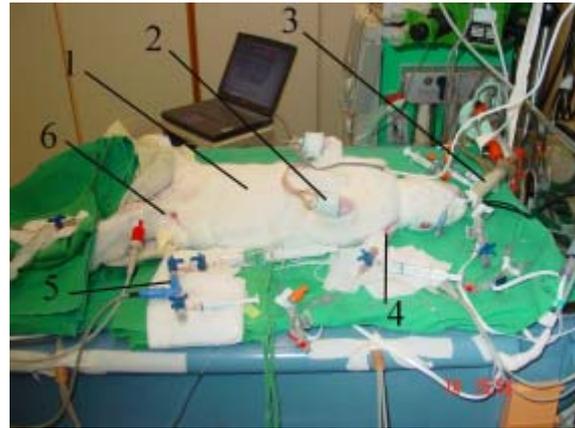


Abbildung 2:  
Versuchstier nach Instrumentierung, mit 1. Versuchstier; 2. Sensor des Pulsoximeters; 3. Flusssensor des Beatmungsgerätes; 4. peripherenvenöser Zugang; 5. Zentraler Venenkatheter mit Sensoren zur Herzzeitvolumen-Bestimmung; 6. arterieller und zentralvenöser Zugang

## 2.4 *Narkose und Anästhesie*

Die Narkose und Anästhesie wurde mit einer kontinuierlichen, individuell an den Bedarf des Versuchstieres angepassten Infusion von mit Ketamin und Xylazin (30-100mg/kg/h bzw. 0,3-1mg/kg/h) aufrechterhalten. Ziel war es, die Narkose tief genug zu halten, um Spontanbewegungen der Versuchstiere zu vermeiden.

## 2.5 *kardiale Überwachung*

Die Herzaktionen wurden mittels EKG überwacht, dessen Elektroden auf den rasierten Thorax des Kaninchens aufgeklebt wurden.

Die Sauerstoffsättigung des Blutes und die Herzfrequenz wurden mit einem Pulsoxymeter (Radical, Masimo Corporation, 2852 Kelvin Avenue, Irvine, California 92814), das an einer rasierten Vorderpfote der Tiere befestigt war, transkutan überwacht.

In die linke A. femoralis des Kaninchens wurde nach vorheriger Rasur unter aseptischen Bedingungen ein arterieller Thermodilutionskatheter (3,5F) zur kontinuierlichen Herzzeitvolumenmessung mit Hilfe des PICCO plus (Pulsion Medical Systems, Stahlgrubenring 28, 81829 München), zur Bestimmung der arteriellen Blutgase, zur Blutentnahme und für die kontinuierliche Blutdruckmessung gelegt. In die Vena femoralis wurde ein 3,5F Katheter zur Messung des ZVDs, zur Blutabnahme und zur Injektion

eiskalter NaCl-0,9%-Lösung für die Messung des Herzzeitvolumens (HZV) eingebracht. Beide Katheter wurden kontinuierlich (3 ml/h) mit mit Heparin (1 IE/ml) versetzter 0,9%iger NaCl Lösung gespült.



Abbildung 3:  
1. arterieller Zugang mit Temperatursensor für die Herzzeitvolumen-Bestimmung; 2. Drucksensor für die Bestimmung des arteriellen Blutdruckes

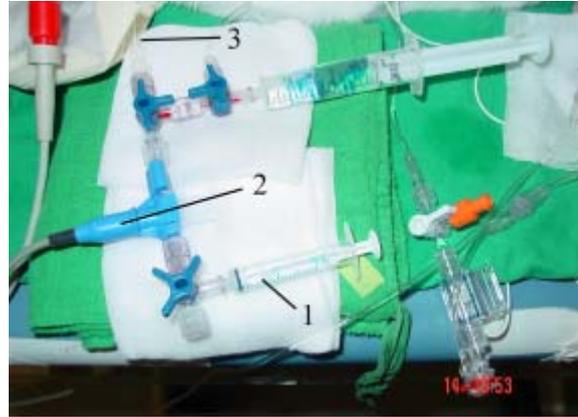


Abbildung 4:  
1. eiskalte NaCl-Lösung; 3. zentral-venöser Zugang mit 2. venösem Temperatursensor für die Messung des Herzzeitvolumens

## 2.6 Messung des Herzzeitvolumens und Berechnung des Sauerstofftransports

Das HZV wurde mittels transpulmonaler Thermodilution mit Hilfe des PiCCO gemessen. Bei den stündlichen Bestimmungen wurden jeweils 3 direkt aufeinander folgende Messungen mit jeweils 2 ml kalter NaCl-Lösung durchgeführt und aus diesen 3 Ergebnissen der Mittelwert errechnet und dieser wiederum auf das Körpergewicht des Tieres bezogen.

$$\text{HZVI} = \frac{\text{HZV [l/min]}}{\text{Körpergewicht [kg]}}$$

**Berechnung des Herzzeitvolumenindex (HZVI); HZV=Herzzeitvolumen**

Durch Multiplikation der mittels arterieller Blutgasanalyse bestimmten arteriellen Sauerstoffkonzentration ( $\text{CtO}_2$ ) mit dem HZVI lässt sich der Sauerstofftransport ( $\text{mlO}_2/\text{kg}/\text{min}$ ) berechnen.

Zur Verhinderung von Koageln im PiCCO-Messkatheter wurde der NaCl-Lösung 1 IE/ml Heparin zugefügt.

## 2.7 *Erhaltungsinfusion*

Eine peripherenöse Erhaltungsinfusion aus einem Gemisch (1:1) aus Pädiafusin II<sup>®</sup> und isotoner NaCl-Lösung wurde hergestellt. Zusätzlich wurden 1 IE/ml Heparin beigelegt und dieses Gemisch mit 5 ml/kg KG/h zugeführt, wobei ab einem Blutglukosegehalt über 250 mg/dl diese Lösung durch eine 0,9%ige NaCl-Infusion mit einer Dosierung von ebenfalls 5 ml/kg KG/h ausgetauscht wurde, bis der Blutglukosegehalt wieder unter 150 mg/dl gefallen war.

## 2.8 *Datenaufzeichnung*

Alle Drucksignale werden mit Hilfe von Sorenson Transpac 4 Transducer (Abbott Critical Care Systems, North Chicago, IL) gemessen, welche mit Hilfe eines Quecksilbermanometers kalibriert wurden.

Alle Signale wurden mit 100 Hertz digitalisiert und simultan durch ein Datenaufnahmesystem (DATAQ Instruments, Inc. Akron, OH) aufgezeichnet.

## 2.9 *Protokoll*

Nach der Instrumentierung wurden mit Hilfe des Beatmungsgeräts drei, jeweils ca. 6s dauernde Blähmanöver mit einem  $V_t$  von 8 ml/kg durchgeführt, um während der Instrumentierung möglicherweise entstandene atelektatische Lungenareale zu rekrutieren. Nun wurden dem Tier 0,15 mg/kg Norcuron<sup>®</sup> (Vecuronium) i.v. injiziert um durch die Muskelparalyse ein Mitatmen und etwaige Hustenreflexe des Tieres zu verhindern.

Danach wurden die Daten des Pulsoximeters, Atemgasflow, Ösophagusdruck ( $P_e$ ), Atemwegsdruck ( $P_{aw}$ ), Atemwegsvolumen, Blutdruck (RR), ZVD und EKG mittels eines Datenaufzeichnungssystems (Windaq Programm, DATAQ Instruments Incorporated) als „Baseline vor der Lavage“ Daten 5 Minuten auf einem PC aufgezeichnet. Anschließend erfolgten arterielle Blutgasanalysen, die Entnahme arteriellen Blutes und die Messung des Herzzeitvolumens mittels Thermodilution.

Danach wurde mit der broncho-alveolären Lavage begonnen. Mit Hilfe der Lavagen sollte ein Surfactantmangel, ähnlich dem eines Frühgeborenen, erzeugt werden.

Die Tiere wurden wiederholt mit 0,15 ml/kg KG Vecuronium i.v. relaxiert und mit 15 ml/kg KG auf ca. 37 °C erwärmter 0,9%iger NaCl-Lösung, die über den endotrachealen Tubus eingebracht wurde, lavagiert.

10 Minuten nach der 1. BAL erhielten die Tiere eine 2. BAL, deren Flüssigkeitsmenge mit der der 1. BAL übereinstimmte.

In Abhängigkeit des in der Kontrollblutgasanalyse nach 5 Minuten gemessenen PaO<sub>2</sub> wurde gegebenenfalls noch eine 3. und 4. BAL, jeweils mit 15 ml 0,9%iger NaCl-Lösung pro kg Körpergewicht unter Anwendung des folgenden Protokolls durchgeführt.

Fiel der PaO<sub>2</sub> 5 Minuten nach der 2. BAL auf < 200 mmHg, wurde nicht weiter lavagiert. Bei einem PaO<sub>2</sub> > 200 mmHg wurde 5 Minuten später eine weitere BGA abgenommen und falls der PaO<sub>2</sub> zu diesem Zeitpunkt > 300mmHg gemessen wurde, wurde eine 3. BAL durchgeführt. Lag der PaO<sub>2</sub> Wert zwischen 200 und 300 mmHg, folgten im fünfminütigen Abstand weitere Blutgasanalysen. Lag 10 Minuten nach der 2. Lavage der PaO<sub>2</sub> immer noch in einem Bereich zwischen 200 und 300 mmHg mit einer erkennbaren steigenden Tendenz, so erhielt das Tier eine 3. BAL. War jedoch eine fallende Tendenz zu erkennen, so wurde abgewartet und dann bei weiter fallender Tendenz keine weitere Lavage mehr durchgeführt. Ziel dieses Verfahrens war eine möglichst uniform ausgeprägte Lungenerkrankung aller Tiere. Nach den gleichen Kriterien wurde gegebenenfalls eine 4. Lavage verabreicht.

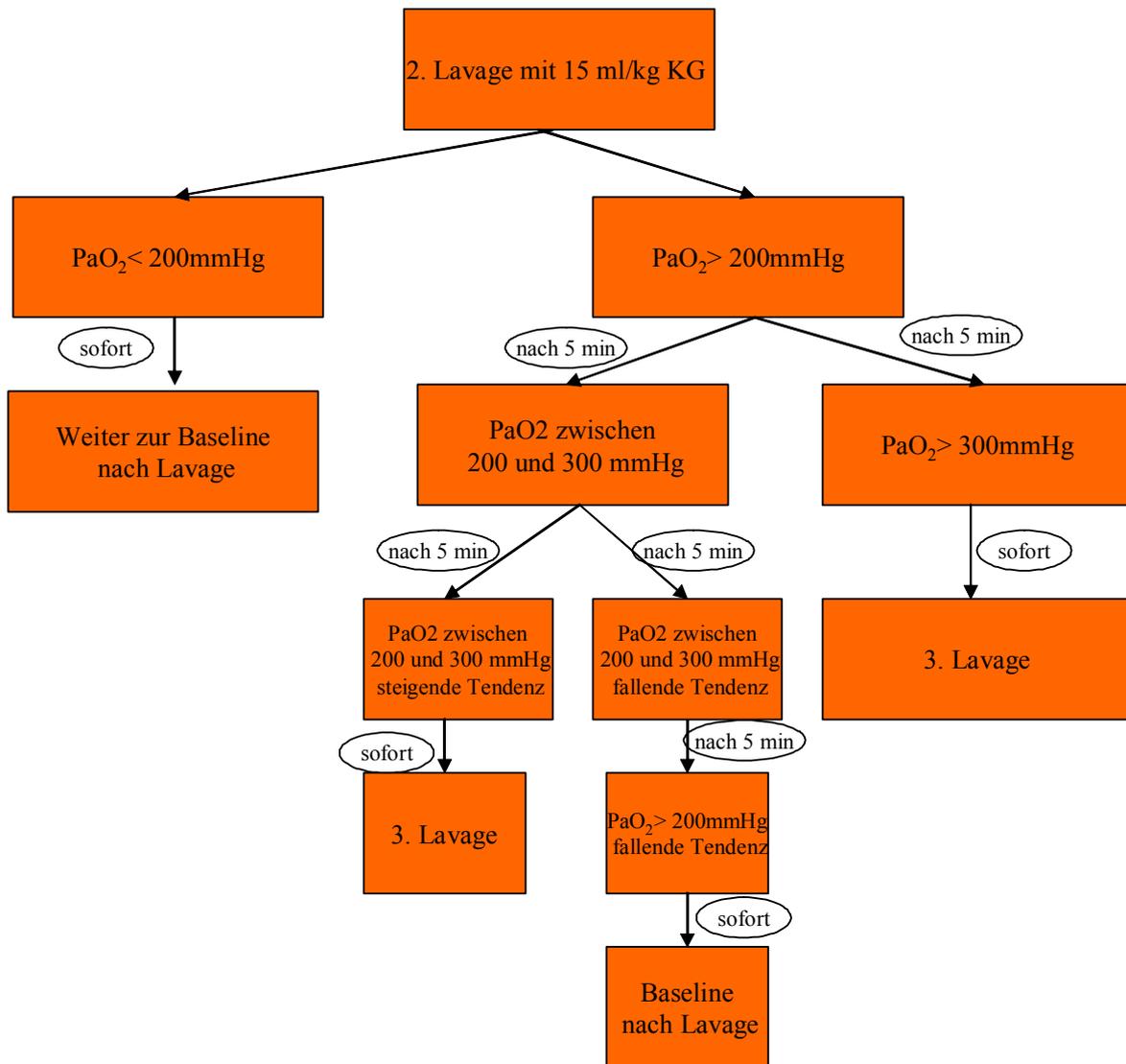


Abbildung 3:  
 Schema zur Festlegung der Zahl der Lavagen, PaO<sub>2</sub> (arterieller Sauerstoffpartialdruck), mmHg (Millimeter Quecksilbersäule), KG (Körpergewicht)

Es wurden maximal 4 Lavagen durchgeführt, die Lavageflüssigkeiten der Lavagen 1-4 gepoolt und 4x 14ml Lavageflüssigkeit abgefüllt.

Nach Beendigung der Lavage wurden nochmals, nach vorheriger i.v. Gabe von Vecuronium, 5 Minuten lang Daten aufgezeichnet, welche nachher als *Baseline* für die weiteren Messwerte verwendet wurden und gleichzeitig eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt, das Herzzeitvolumen mittels transpulmonaler Thermodilution gemessen und eine arterielle Blutprobe entnommen.

Im Anschluss an die Baselinemessungen nach der Lavage wurde ein bis dahin verschlossener Randomisierungsumschlag geöffnet und dadurch festgelegt, ob der Blut-pH-Wert des Tieres während des nun folgenden 6-stündigen Beobachtungszeitraumes durch eine Pufferlösung in den physiologischen Normbereich gebracht wurde, oder ob die respiratorische Azidose bis zu einer gewissen Grenze weitgehend unbehandelt blieb. Somit wurden folgende Gruppen mit jeweils 14 Tieren gebildet:

*Gruppe1: Hypoventilation-Hyperkapnie mit Pufferung:*

PaCO<sub>2</sub> von 75- 85mmHg, V<sub>T</sub> 4-5ml/kg, pH-Wert 7,35-7,45

*Gruppe2: Hypoventilation-Hyperkapnie und ohne Pufferung:*

PaCO<sub>2</sub>: 75-85 mmHg, V<sub>T</sub>: 4-5 ml/kg, pH-Wert > 7,0. BE < -10 mmol/l.

Anschließend wurden die Beatmungsparameter im Sinne einer Hypoventilation wie folgt verändert: FiO<sub>2</sub>: 1,0, Atemfrequenz initial: 25/min, wobei die Atemfrequenz im Laufe des Versuches PCO<sub>2</sub> abhängig verändert wurde, bis der Ziel-PaCO<sub>2</sub> erreicht wurde.

Wurde in der nicht gepufferten Gruppe die Grenzen für pH-Wert oder Basenüberschuss unterschritten, so wurde zum Ausgleich der metabolischen Komponente Azidose Na<sup>+</sup>-Bicarbonat in folgender Menge zugeführt:

gemessener BE [mmol/l] – (-5mmol/l) x 0,3 x kg KG

In der Gruppe der hypoventilierten, hyperkapnischen und gepufferten Tiere wurde ebenso bei einem Tidalvolumen V<sub>t</sub> von 4-5 ml/kg KG ein PaCO<sub>2</sub> zwischen 75 und 85 mmHg angestrebt. Jedoch wurde der pH-Wert durch intermittierende Na<sup>+</sup>-Bicarbonat-Infusion in einen Zielbereich von 7,35-7,45 eingestellt.

In beiden Gruppen wurde nach der Lavage der PEEP von 4 cmH<sub>2</sub>O auf 6 cmH<sub>2</sub>O erhöht, um den Kollaps von Alveolen bei Surfactantmangel zu verhindern und das Tidalvolumen von 8 ml/kg KG auf 4 ml/kg KG erniedrigt. Durch entsprechende Veränderung der Beatmungsfrequenz des Beatmungsgerätes in Reaktion auf die im 30 minütigen Abstand durchgeführten arteriellen Blutgasanalysen wurde der PaCO<sub>2</sub> im Zielbereich von 75-85 mmHg gehalten.

Direkt nach der Veränderung dieser Parameter erhielt die gepufferte Gruppe zum ersten Mal unverdünnt 3 mmol/kg KG  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$  8,4% über den zentral-venösen Zugang über 15 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 40 ml/h. Später wurden die zur Einhaltung des Norm-pH-Bereichs notwendigen Puffergaben bedarfsangepasst dosiert.

In den auf die Baseline nach der Lavage folgenden 6 Stunden wurden nun halbstündlich arterielle Blutgasanalysen und Glukose- und Laktatbestimmungen durchgeführt. 15 und 45 Minuten nach jeder vollen Stunde wurden die Tiere mit 0,15 mg/kg KG Vecuronium relaxiert, um zu gewährleisten, dass zu jeder halben und vollen Stunde keine Spontanatmung die Messung lungenmechanischer Eigenschaften und der hämodynamischen Parameter beeinflusst.

Zu jeder vollen Stunde (Stunde 1-6) wurden arteriellen Blutgasanalysen angefertigt und das Herzzeitvolumen durch Thermodilution bestimmt. Vor und direkt nach der initialen Lavage sowie 2, 4 und 6h nach der Baseline nach Lavage wurden zusätzliche Blutproben entnommen.

Alle zur Blutgasanalyse verwendeten Spritzen wurden zum Schutz des Blutgasmessgerätes vor Koageln vor der Blutabnahme mit einer Heparinlösung (100 IE/ml) gespült. Jede abgenommene Blutmenge wurde durch NaCl in gleicher Menge als Bolus substituiert.

Zur Kreislaufunterstützung erhielten die Kaninchen bei einem systolischen Blutdruck < 60 mmHg 10 ml/kg KG isotoner NaCl-Lösung mit einer Geschwindigkeit von 200 ml/h, wobei die Volumengaben auf zweistündlich zwei Volumengaben limitiert waren. Waren Volumengaben für die Blutdruckstabilisierung nicht ausreichend, so bekamen die Tiere zusätzlich 5 µg/kg KG/min Dopamin, wobei die Dosis in 5 µg Schritten bis hin zu einer Maximaldosis von 30 µg/kg KG/min gesteigert werden konnte. Bei einem ZVD von  $\geq$  10mmHg wurden keine Volumengaben mehr verabreicht.

Nach Ende des Versuchszeitraumes (6h) wurden die überlebenden Tiere mit 50mg Trapanal<sup>®</sup> (Thiopental) i.v. getötet und obduziert.

Hierbei wurde der Thorax und anschließend das linke Herzohr eröffnet und nach Kanülierung der Pulmonalarterie die Lunge mit 100 ml einer mit 95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$  äquilibrierten Spüllösung bestehend aus Ringerlaktat mit 250 mg/l Procain, 2,2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  und 20 IE/ml Heparin und einem standardisierten Druck von 27 cmH<sub>2</sub>O (22 mmHg) perfundiert. Kurz nach Beginn der Lungenspülung wurde der Atemwegsdruck für 1 Minute auf 20 cmH<sub>2</sub>O erhöht, um etwaige bei der Präparation entstandene Atelektasen zu reduzieren, dann wurde der Atemwegsdruck auf 10 cmH<sub>2</sub>O gesenkt.

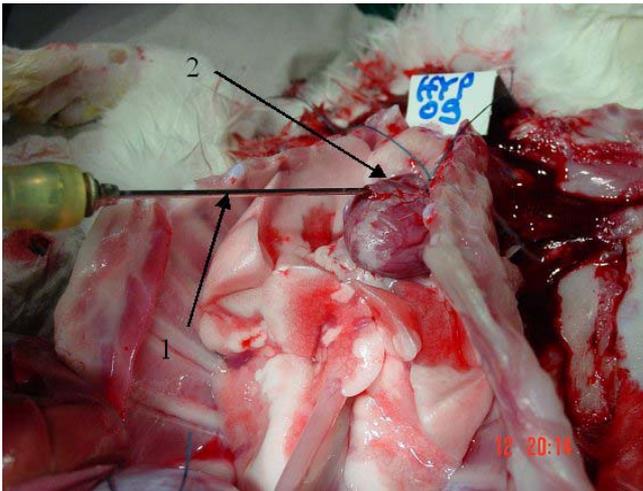


Abbildung 4:  
Kanülierung der Pulmonalarterie und  
Perfusion mit der Fixierlösung;  
1. Knopfkanüle; 2. Pulmonalarterie

Der Zustand der Lunge wurde photographisch mit Hilfe einer 3,5 Mega-Pixel auflösenden Digitalkamera dokumentiert, wobei Bilder in situ sowohl von sternokostal als auch von diaphragmal aufgenommen wurden. Nach Ligatur des Hauptbronchus der rechten Lunge wurde diese möglichst dicht an der Bifurkation abgesetzt und zur Bestimmung des Feucht-Gewichts unmittelbar nach dem Absetzen gewogen.

Anschließend wurde diese Lungenhälfte mit einem Tubus der Größe 2,5-3 mm intubiert über den diese dann dreimal mit 7,5 ml/kg KG 0,9%iger NaCl-Lösung unter Einbeziehung aller drei Lungenlappen lavagiert wurde und alle 3 Lavagen in einem gemeinsamen Gefäß gesammelt wurden. Von der Lavageflüssigkeit wurden 4x 14 ml abgefüllt. Vom dorsalen Teil des Unterlappens und vom anterioren Teil des Oberlappens wurde jeweils 0,4-0,6 g Gewebe entnommen und mit NaCl homogenisiert und weiterverarbeitet.

Der übrige Teil der rechten Lunge wurde im Wärmeschrank eine Woche getrocknet und zur Bestimmung des Trockengewichts täglich gewogen, bis ihr Gewicht 3 Tage in Folge konstant war. Aus Feucht- und Trockengewicht wurde das Feucht-/Trockengewicht berechnet.

Die linke Lunge wurde intrathorakal in einer Lösung mit 4,6% Formaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd für ca. 15 min perfusionsfixiert, dann aus dem Thorax entnommen und die laterale, mediale, inferiore und diaphragmale Seite photographiert, während sie, wie die rechte Lunge, in der ersten Minute mit 20 cmH<sub>2</sub>O gebläht wurde. Unter Beibehaltung eines Atemwegsdruckes von 10 mmH<sub>2</sub>O wurde sie mindestens weitere 8h immersionsfixiert.

Die Abbildungen 5 bis 8 zeigen die vier verschiedenen Lungenareale der Lunge eines gepufferten Tieres, die Abbildungen 9 bis 12 die Lunge eines nicht-gepufferten Tieres.

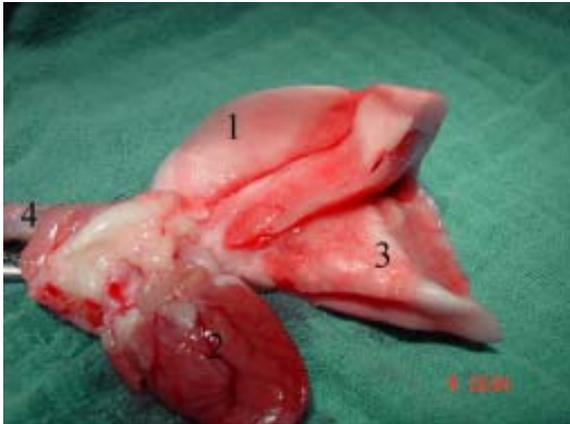


Abbildung 5:  
mediale Lungenflächen mit 2. Herz 1. Oberlappen;  
3. Unterlappen; 4. Trachea

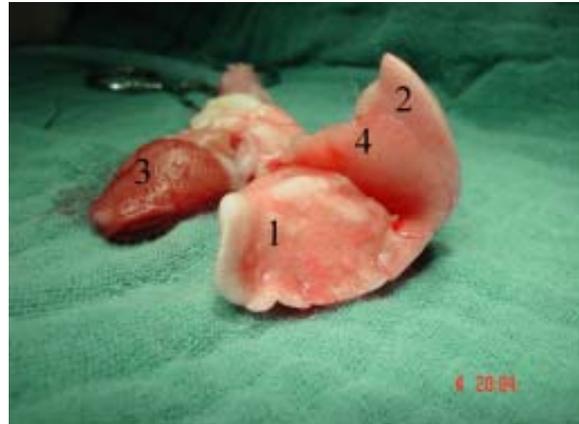


Abbildung 6:  
diaphragmale Lungenareale mit 1. Unterlappen; 2.  
Oberlappen; 3. Herz, 4. akzessorischer Lappen



Abbildung 7:  
laterale Lungenareale mit 1. Oberlappen; 2.  
Unterlappen 3. Einblutungen



Abbildung 8:  
inferiore Lungenareale mit 1. Oberlappen; 2.  
Unterlappen; 3. belüftete Areale; 4. ödematöse Areale,  
5. Einblutungen



Abbildung 9:  
mediale Lungenflächen mit 2. Oberlappen;  
1. Unterlappen



Abbildung 10:  
diaphragmale Lungenareale mit 1. Unterlappen; 2.  
Oberlappen



Abbildung 11:  
laterale Lungenareale mit 1. Oberlappen; 2.  
Unterlappen

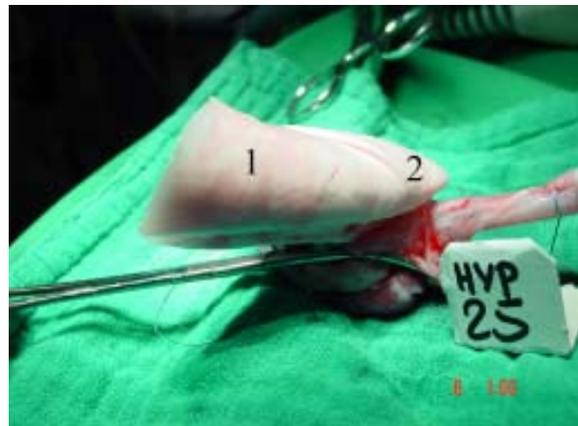


Abbildung 12:  
inferiore Lungenareale mit 1. Unterlappen; 2.  
Oberlappen

Vier Tiere mussten vor der Randomisierung aus der Studie ausgeschlossen werden. Ein Tier hatte einen angeborenen Herzfehler, drei Tiere verstarben vorzeitig bei der Instrumentierung.

### **2.10 weitere Blutproben**

Pro Tier wurden 5 arterielle Blutentnahmen [vor der Lavage (Stunde -0,5), direkt nach der Lavage (Baseline nach Lavage/Stunde 0), Stunde 2, 4 und 6 nach Baseline nach Lavage] durchgeführt.

Aus jeder dieser Blutproben wurde eine Blutbildanalyse aus mit EDTA versetztem Blut durch das Labor des Uniklinikums Ulm, Bereich Safranberg angefertigt. Dabei wurde die

Konzentration an Leukozyten, neutrophiler Granulozyten, Thrombozyten und Hämatokrit ermittelt.

Aus dem mittels fünfminütiger Zentrifugation mit 5000U gewonnenen Lithium-Heparin-Plasmas von Stunde 0 und 6 die Menge des Gesamtproteins bestimmt. Des weiteren wurden aus dem Lithium-Heparin-Plasma Interleukin 8 (0h, 2h, 4h, 6h) bestimmt.

### **2.11 Blutgasanalysen**

Bei den halbstündlichen arteriellen Blutgasanalysen wurden folgende Parameter untersucht: pH, CO<sub>2</sub>-Partialdruck [mmHg], Sauerstoffpartialdruck (PO<sub>2</sub>) [mmHg], Hämoglobinkonzentration (CtHb) [g/dl], Anteil an oxygeniertem Hämoglobin [%], Basenüberschuss (BE) [mmol/l], Sauerstoffsättigung des Blutes (SO<sub>2</sub>) [%], Sauerstoffkonzentration (CtO<sub>2</sub>) [vol%], Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ionisiertes Ca<sup>2+</sup>, Glukose und Laktat (jeweils in mmol/l).

### **2.12 BAL**

Sowohl die Lavageflüssigkeiten aus der BAL zu Beginn des Experiments als auch die post mortem aus der rechten Lunge gewonnene Lavageflüssigkeit wurde bei 1000U/min 10 min zentrifugiert. Ein Teil des gewonnenen Überstandes wurden in 1ml Eppendorfgläser abpipettiert, die bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren wurden und aus denen der Gesamtproteingehalt und der Interleukin-8-Gehalt bestimmt wurden.

Die Zellpellets, die bei der Zentrifugation der jeweiligen Lavageflüssigkeit je Lavagezeitpunkt mit 1000U/min entstanden, wurden mit ihrem Überstand auf 2ml resuspendiert. 20µl dieses Resuspensats wurden mit 200µl des ersten Überstandes verdünnt, die zellulären Bestandteile mit Hilfe einer Zytocentrifuge auf einen Objektträger gebracht und mit einer HE-Färbung angefärbt. Mit Hilfe dieses Präparates wurden der Anteil der Lymphozyten/Monozyten, der eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten und der Epithelzellen an den in der BAL enthaltenen Zellen in der Initial- und der Post-Mortem-Lavage bestimmt.

## 2.13 Untersuchung der Lungen

### 2.13.1 Gewebe

Die Gewebeproben vom anterioren Teil des Oberlappens und vom dorsalen Teil des Unterlappens der rechten Lunge wurden getrennt voneinander jeweils mit 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung mit einem Homogenisator zerkleinert und anschließend 5min bei 5000U/min zentrifugiert. Der Überstand der beiden Homogenisate wurde in jeweils 5 1ml Eppendorfgefäße pipettiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Aus diesen Proben wurden später der Interleukin-8-Gehalt und der Gesamtproteingehalt des Lungengewebes bestimmt.

### 2.13.2 Feucht-/Trockengewicht

Unter dem Begriff Feucht-/Trockengewicht versteht man den Quotienten aus dem Gewicht der rechten Lunge direkt nach ihrer Entnahme und dem Gewicht im getrockneten Zustand, welcher erreicht war, wenn das Gewicht der Lunge durch Trocknen in einem Wärmeschrank bei  $39^{\circ}\text{C}$  drei Tage unverändert geblieben war.

### 2.13.3 Makroskopische Beurteilung

Die

A: in situ von diaphragmal und sternokostal angefertigten Bilder beider Lungen

B: ex situ angefertigten Bilder der lateralen, medialen, inferioren und diaphragmalen Seite der linken Lunge

wurden bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindet beurteilt. Die Beurteilung erfolgte durch einen tierexperimentell erfahrenen Forscher (Dr. Axel Franz). Beurteilt wurden zwei Parameter: Belüftung (Gasgehalt) und Blutung anhand folgenden Scores (Tabelle 2):

Tabelle 2:  
Score zur makroskopischen Beurteilung der Lunge

	0	1	2	3
Belüftung	sehr gut	gut	schlecht	sehr schlecht
Parenchymblutung	keine	minimal	mäßig	ausgeprägt

### 2.13.4 Lungenhistologie

Von der immersionsfixierten linken Lunge wurden sowohl dem Oberlappen als auch dem Unterlappen aus den abhängigen und den nicht-abhängigen Arealen Gewebeproben entnommen und diese in Paraffin eingebettet. Die anschließend angefertigten HE-gefärbten Schnitte wurden von einem hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der Tiere geblindeten Pathologen (Dr. M. Ebsen, Institut für Pathologie der Ruhr-Universität Bochum, Bürkle-de-la-Camp-Platz 1, 44789 Bochum) begutachtet. Die Bewertung erfolgte semiquantitativ anhand eines Scores und unter Berücksichtigung folgender Parameter (Tabelle 3): alveoläre und interstitielle Inflammation, alveoläre und interstitielle Blutung, alveoläres und interstitielles Ödem, Atelektasen, Nekrosen und Überblähung. Jede Variable wurde mit einer 0-4 Punkteskala bewertet, wobei 0 keine Schädigung, 1 Schädigung in 25% des Gesichtsfeldes, 2 Schädigung in 50% des Gesichtsfeldes, 3 Schädigung in 75% des Gesichtsfeldes und 4 Schädigung in 100% des Gesichtsfeldes zugeordnet wurde.

Tabelle 3:  
Score zur mikroskopischen Beurteilung der Lunge

Kriterien/ Nummer	0	1	2	3	4
Atelektase					
alveoläre Entzündung					
interstitielle Entzündung					
alveoläre Blutung					
interstitielle Blutung					
alveoläres Ödem					
interstitielles Ödem					
Nekrose					
Überblähung					
Summenscore					

## 2.14 Statistik

### 2.14.1 Zielkriterien

Primäres Zielkriterium dieser randomisierten Studie mit zwei Gruppen war das Feucht-/Trockengewicht der rechten Lunge.

Sekundäre Zielkriterien, die in einer deskriptiven Statistik ausgewertet wurden, sind:

Mortalität, Lungenschädigung anhand mikroskopischen, makroskopischen Befunden und Pneumothoraxrate, Gesamtprotein der Lungenlavage als Marker für die Kapillarpermeabilität, Anzahl der Leukozyten/ml Lavageflüssigkeit und ihre Differenzierung, Interleukin-8 in der Lavageflüssigkeit; im Serum die Gesamtproteinkonzentration, Interleukin-8, Blutglukosespiegel und die Elektrolytkonzentrationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}_{\text{ion}}$ ) zur Erfassung der Elektrolytverschiebung durch die hyperkapnische Azidose; im arteriellen Vollblut neutrophile Granulozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Hämatokrit, arterieller pH,  $\text{PO}_2$ ,  $\text{PCO}_2$  und Plasmalaktat Spiegel.

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes Sigmastat Version 2.03 ausgewertet. Kontinuierliche Variablen wurden bei Normalverteilung mit einem zwei-zeitigem t-Test verglichen, bei Nicht-Normalverteilung mit einem Mann-Whitney Rank Sum Test. Wiederholte parametrische Messwerte wurden zwischen den Gruppen bei Normalverteilung mit einer Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messwerte verglichen. Lag bei den wiederholten Messwerten keine Normalverteilung vor, so wurden die Messwerte nach Transformation in Ränge mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messwerte untersucht. Als Signifikanzniveau wurde ein  $P = 0,05$  festgelegt. Alle Daten wurden bei Normalverteilung als Mittelwert +/- Standardabweichung, ansonsten als Median (25.-75. Perzentile), dargestellt.

### 2.14.2 Fallzahlberechnung

Ausgehend von der Hypothese, dass das Feucht-/Trockengewicht in der gepufferten Gruppe um 25% höher liegt als bei der Kontrollgruppe, was einem anhand von Ergebnissen von vorangegangenen Studien errechnetem nachzuweisendem Delta Feucht-/Trockengewicht von: 25% von 5,27, also  $0,25 \times 5,27 = 1,32$  bei  $P \leq 0,05$ , entspricht. Daraus errechnete sich bei einer Standardabweichung von 1,0, einem  $\alpha$ -Fehler von 0,05, einem  $\beta$ -Fehler von 0,2 und einer Power von 0,8 eine Fallzahl von 11 Tieren pro Gruppe. Addiert man noch einen Sicherheitszuschlag von 30%, so ergeben sich 28,6 Tiere.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 *Gewicht, Zahl der Lavagen, Baselinewerte und für die Tiere benötigte Puffermengen*

Während des Versuchs verstarben drei Tiere aus der gepufferten Gruppe vorzeitig. Aus der nicht gepufferten Gruppe überlebten alle Tiere. Dennoch konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebensdauer der beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden. Die Beatmungszeit ab der Baseline betrug in beiden Gruppen im Median 6 Stunden. Auch bezüglich des Gewichtes unterschieden sich die beiden Behandlungsgruppen nicht signifikant (gepuffert/ ungepuffert: 3102 g  $\pm$  76/ 3050 g  $\pm$  125, P= 0,195) (Tabelle 1).

Die Zahl der nach den Kriterien des Protokolls nötigen Lavagen zur Induktion des Surfactantmangels betrug sowohl in der gepufferten Gruppe 4 (4-4) als auch in der ungepufferten Gruppe 4 (3-4). Tabelle 4 zeigt die Ausgangsbedingungen nach den Lavagen in beiden Gruppen.

Tabelle 4:

Baseline nach Lavage Daten der Blut-, Plasma-, Elektrolyt- und Blutgas und BAL-Zellverteilungsbestimmungen, n= 14 je Gruppe (BAL: broncho-alveoläre Lavage, mmHg: Millimeter Quecksilbersäule;  $\mu$ l: Mikroliter; %: Prozent; mmol: Millimol; mg/dl: Milligramm/Deziliter;  $\mu$ l: Mikroliter; mg: Milligramm)

<b>Blutparameter</b>	gepuffert	nicht gepuffert	P
Leukozyten (1000/ $\mu$ l)	3,12 (2,66-3,54)	2,91 (2,34-3,11)	0,234
Segmentkernige (%)	1,82 +/- 0,60	1,57 +/-0,60	0,286
Thrombozyten (1000/ $\mu$ l)	258,43 +/- 55,84	282,23+/- 50,70	0,258
Hämatokrit (%)	0,34 (0,33-0,49)	0,35 (0,33-0,38)	0,981
<b>Blutgasparameter</b>			
PO <sub>2</sub> (mmHg)	104 (87-147)	145 (102-199)	0,148
PCO <sub>2</sub> (mmHg)	43,0 +/- 4,6	40,5 +/- 5,4	0,212
pH	7,35 +/- 0,04	7,36 +/- 0,04	0,469
BE (mmol/l)	-2,5 +/- 1,9	-2,8 +/- 2,9	0,722
SaO <sub>2</sub> (%)	98 (94-99)	99 (97-100)	0,161

**Plasmaparameter**

Laktat (mmol/l)	1,3 (1,0-2,1)	1,7 (1,2-2,0)	0,395
Glukose (mg/dl)	183 ( 169-199)	194 (173-205)	0,223

**Elektrolyte**

Na <sup>+</sup> (mmol/l)	132 +/- 6	132 +/- 3	0,925
K <sup>+</sup> (mmol/l)	3,7 +/- 0,2	3,8 +/- 0,4	0,344
Ca <sup>2+</sup> (mmol/l)	1,40 +/- 0,13	1,35 +/- 0,10	0,231

**Anfangs-BAL-Parameter****jeweils in (%)**

Lymphozyten/Monozyten	2 (2-4)	3 (2-6)	0,555
neutrophile Granulozyten	4 (2-8)	2 (0-3)	0,103
eosinophile Granulozyten	2 (2-6)	2 (2-4)	0,490
Epithelzellen	89 (84-94)	92 (88-93)	0,198

Die Tiere der Gruppe der gepufferten Tiere erhielten 29,1 (22,9-33,6) mmol/ kg KG Na<sup>+</sup>-Bicarbonat während der Behandlung, wohingegen sich die nach Protokoll benötigte Puffermenge bei der ungepufferten Gruppe mit 0 ml/kg KG (0-1,7) von der Menge der ersten Gruppe signifikant unterschied (P < 0,001).

### 3.2 *Feucht-/Trockengewicht*

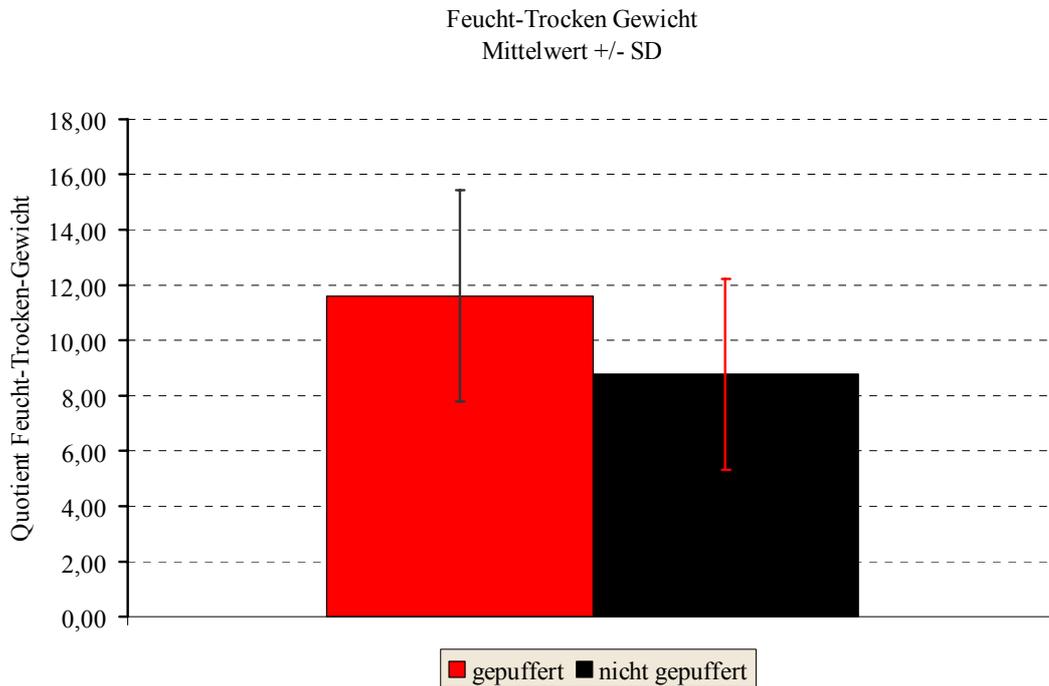


Abbildung 13:

Darstellung des Feucht-/Trockengewichtes der Lungen der gepufferten und der ungepufferten Gruppe, n = 14 je Gruppe, signifikant (P=0,049). (SD=Standardabweichung)

Das Feucht-/Trockengewicht der rechten Lunge als primäres Zielkriterium betrug in der gepufferten Gruppe  $11,6 \pm 3,8$ , in der nicht-gepufferten Gruppe  $8,8 \pm 3,5$  und unterschied sich somit signifikant (P=0,049) (Abbildung 13).

### 3.3 *Proteinbestimmung*

Das Serumgesamtprotein unterschied sich nicht zur Baseline (Tabelle 5, Abbildung 14) zwischen den beiden Gruppen. Zur Stunde 6 des Experimentes war das Serumgesamtprotein in der gepufferten Gruppe jedoch signifikant niedriger (P = 0,035) (Tabelle 5, Abbildung 14).

Die Proteinbestimmungen in der broncho-alveolären Lavage waren zur Baseline in den beiden Gruppen nicht signifikant verschieden (Tabelle 5), zeigten jedoch am Ende des Experimentes in der gepufferten Gruppe signifikant höhere Werte (Tabelle 5).

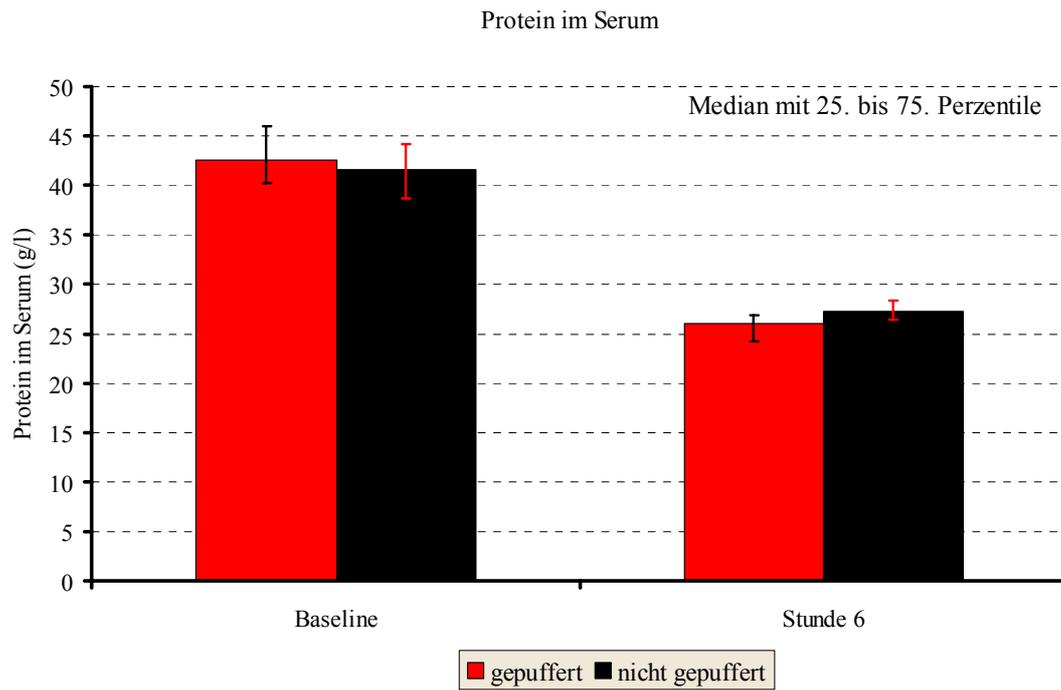


Abbildung 14:

Konzentration des Serumgesamtproteins zur Baseline und zur Stunde 6.  $n = 14$  je Gruppe. Unterschied Baseline nicht signifikant  $P = 0,486$ ; Unterschied Stunde 6 signifikant,  $P = 0,035$ . (g: Gramm, l: Liter)

Tabelle 5:

Proteinkonzentration im Serum und Lavage jeweils zur Stunde 0 und zur Stunde 6 mit Serumkonzentration in g/l und BAL-Konzentration in mg/l. BAL = broncho-alveoläre Lavage, g: Gramm, mg: Milligramm, l: Liter.

Protein im	gepuffert	nicht gepuffert	P
Serum (g/l) Baseline	42,6 +/- 4,1	41,5 +/- 4,1	0,486
Serum (g/l) Stunde 6	26,0 (23,8-26,9)	27,6 (26,4-28,7)	0,035
BAL (mg/l) Baseline	88 (72-126)	93 (65-148)	0,945
BAL (mg/l) Stunde 6	1012 +/- 586	505 +/- 358	0,010

Betrachtet man den Quotienten aus dem Wert des Serumgesamtproteins zur Stunde 6 und dem Wert zur Baseline für das jeweilige Probenmaterial (Abbildung 15, Abbildung 16), so ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Quotienten des Proteins im Serum der gepufferten Gruppe und der nicht gepufferten Gruppe. Das Serumgesamtprotein war in der gepufferten Gruppe stärker abgefallen ( $P = 0,042$ ).

Der Quotient des Proteins in der BAL unterscheidet sich in den Gruppen nicht signifikant, wobei hier ein Trend in Richtung höhere Werte des Quotienten in der gepufferten Gruppe zu erkennen ist ( $P = 0,063$ ).

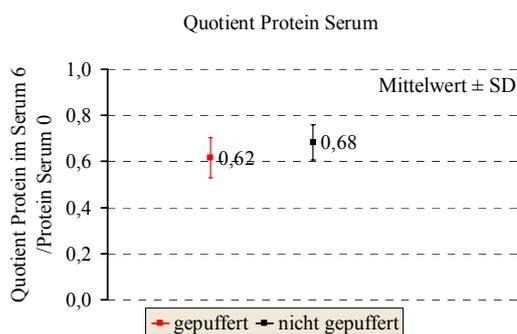


Abbildung 15:  
Quotient der Konzentration des Gesamtproteins im Serum zur Stunde 6 und zur Baseline,  $n = 14$  je Gruppe. Unterschied signifikant ( $P = 0,042$ ). SD: Standardabweichung.

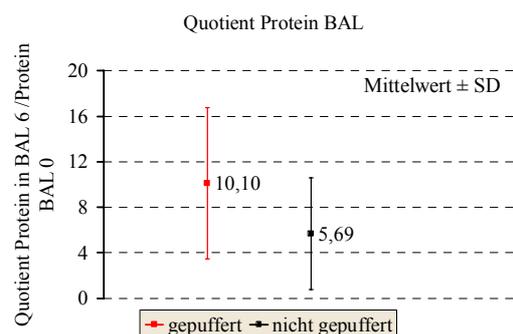


Abbildung 16:  
Quotient der Konzentration des Gesamtproteins in der BAL zur Stunde 6 und zur Baseline,  $n = 14$  je Gruppe. Unterschied nicht signifikant. ( $P = 0,063$ ). BAL: broncho-alveoläre Lavage. SD: Standardabweichung.

### 3.4 Interleukin-8-Bestimmung

Die Interleukin-8-Konzentration wurde im Plasma, in der BAL und dem Lungenhomogenisat bestimmt.

#### 3.4.1 im Plasma

Die Interleukin-8-Konzentration im Plasma der Tiere stieg in beiden Gruppen an, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $P = 0,144$ ) (Abbildung 17).

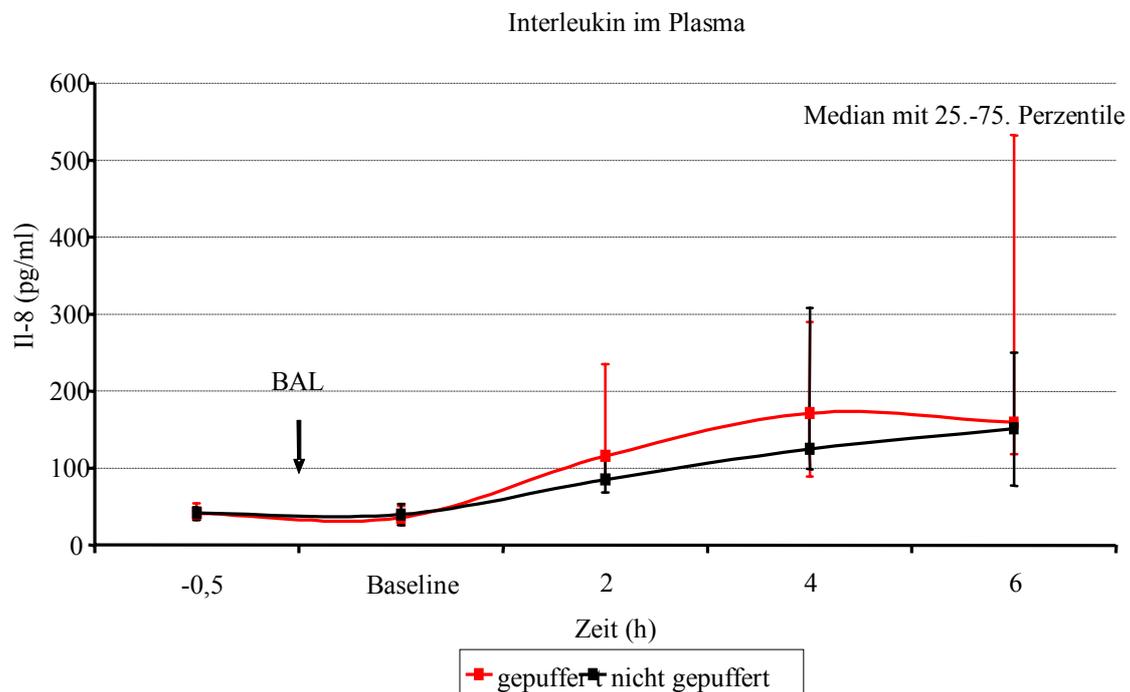


Abbildung 17:

Interleukin-8 (IL-8)-Konzentration jeweils in pg/ml im Blut der gepufferten und der ungepufferten Gruppe im Verlauf des Experimentes mit Bestimmungen zum Zeitpunkt -0,5; 0; 2; 4; 6 Stunden.  $n = 14$  je Gruppe, nicht signifikant (pg: Picogramm, ml: Milliliter, h: Stunde)

#### 3.4.2 in der BAL

Sowohl in der Anfangslavage als auch in der Endlavage konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Interleukin-8 Konzentration in der gepufferten und der nicht gepufferten Gruppe festgestellt werden (Anfangslavage:  $P = 0,323$ , Endlavage:  $P = 0,423$ ) (Abbildung 18).

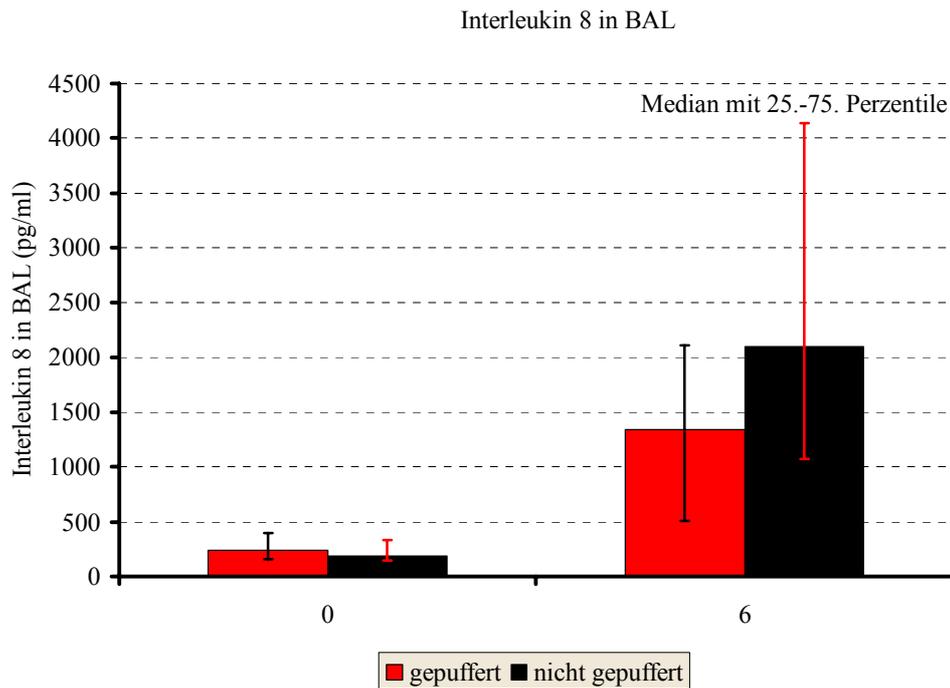


Abbildung 18:

Interleukin-8-Konzentration jeweils in pg/ml in der BAL der gepufferten und der ungepufferten Gruppe vor der Baseline und nach Ende des Experimentes.  $n = 14$  je Gruppe, Unterschied zwischen den Gruppen zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant, Anfangslavage:  $P = 0,323$ , Endlavage:  $P = 0,423$ . BAL = bronchoalveoläre Lavage; pg: Picogramm, ml: Milliliter

Vergleicht man jedoch den Anteil des Il-8 am Gesamtprotein in der Lavage, so ergeben sich aus der Endlavage für die gepufferte Gruppe eine Il-8 Menge von 1377 pg/mg Protein (746-4284) und für die ungepufferte Gruppe von 5076 pg/mg Protein (1271-12365), so unterscheiden sich diese signifikant ( $P = 0,039$ ) (Abbildung 19).

In der Anfangslavage konnte auch beim Anteil des Il-8 am Gesamtprotein in der Lavage kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 19).

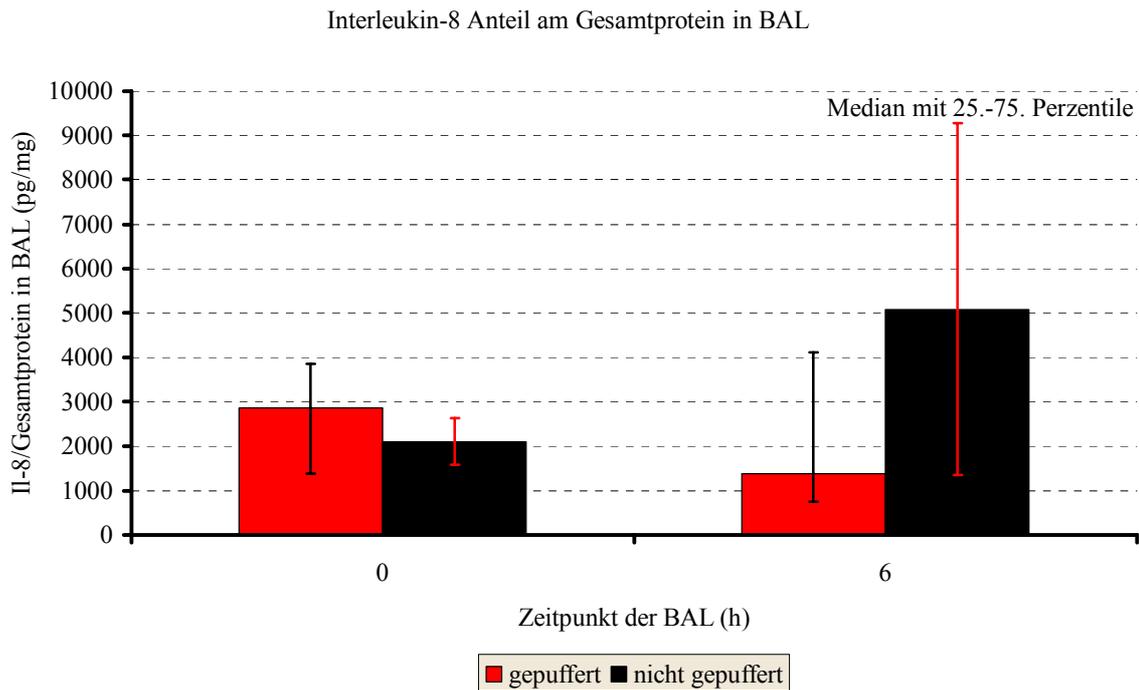


Abbildung 19:

Anteil der Interleukin-8 (=IL-8)-Konzentration an der Gesamtproteinkonzentration jeweils in pg/mg in der BAL der gepufferten und der ungepufferten Gruppe vor der Baseline und nach Stunde 6 des Experimentes. n = 14 je Gruppe, nach Stunde 6 signifikant (P = 0,039). BAL = broncho-alveoläre Lavage, (pg: Picogramm, mg: Milligramm, h: Stunde)

### 3.4.3 im Homogenat

In den Homogenaten ließen sich bezüglich der IL-8 Menge pro g Gewebe weder in den abhängigen Lungenabschnitte noch in den nicht abhängigen Lungenabschnitten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppe nachweisen (Abbildung 20).

Ähnliches ergab die Auswertung der IL-8 Menge als Anteil am Gesamtprotein im Gewebe der abhängigen und der nicht-abhängigen Lungenabschnitte (Abbildung 21), wobei sich ein Trend hinsichtlich höherer IL-8 Werte pro Gesamtprotein in den abhängigen Lungenbereichen der gepufferten Gruppe (P = 0,094) abzeichnete.

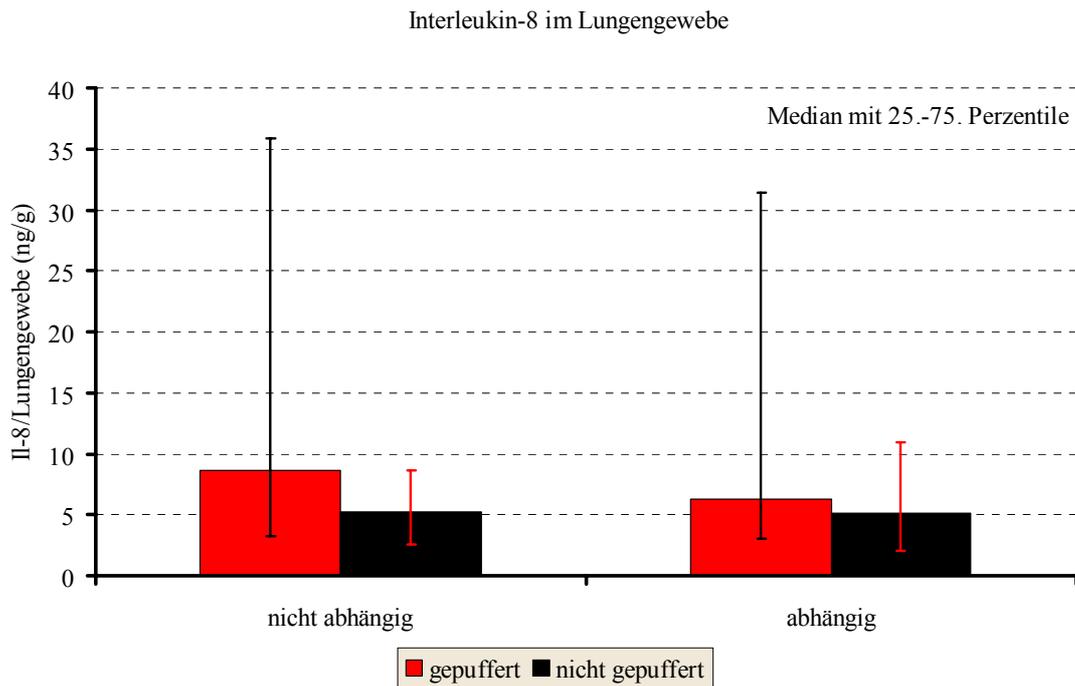


Abbildung 20:  
 Interleukin-8 (= Il-8)-Menge pro Gramm Lungengewebe, jeweils in ng/g im Homogenat des abhängigen und des nicht abhängigen Teiles der Lunge der gepufferten und der ungepufferten Gruppe. n = 14 je Gruppe, nicht signifikant (P = 0,161) in den abhängigen und ebenfalls nicht signifikant in den nicht abhängigen Arealen (P = 0,161); g: Gramm, ng: Nanogramm.

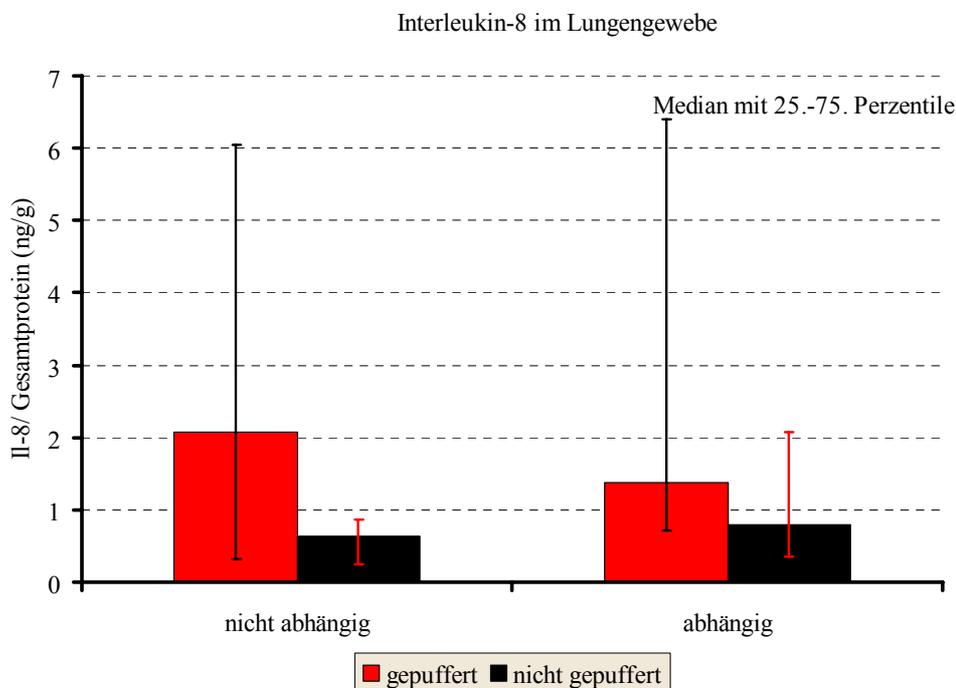


Abbildung 21:  
 Interleukin-8 (= Il-8)-Menge pro Gesamtproteinmenge, jeweils in ng/g im Homogenat des abhängigen und des nicht abhängigen Teiles der Lunge der gepufferten und der ungepufferten Gruppe. n = 14 je Gruppe, nicht signifikant (P = 0,094) in den abhängigen und ebenfalls nicht signifikant in den nicht abhängigen Arealen (P = 0,168), g: Gramm, ng: Nanogramm.

### 3.5 *Lungengewebe*

Bei keinem der Tiere entwickelte sich ein Pneumothorax.

#### 3.5.1 makroskopische Auswertung

Die makroskopische Auswertung erfolgte geblindet anhand der in Tabelle 2 genannten Kriterien „Einblutung in das Parenchym“ und „Belüftung des Parenchyms“. Ein höherer Score spricht hierbei für einen größeren Schaden.

A: in situ Beurteilung beider Lungen:

Weder Belüftung noch Einblutung waren innerhalb der einzelnen Gruppen signifikant unterschiedlich beim Vergleich der linken und rechten Lunge. Daher wurden die Werte gemittelt. Die Lungen der gepufferten Tiere waren schlechter belüftet als die Lungen der nicht gepufferten Tiere ( $P = 0,032$ ) (Tabelle 6).

Die Lungen der gepufferten Gruppe zeigten ebenfalls signifikant mehr Einblutungen ( $P = 0,003$ ) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung der Belüftung und Einblutung in beide Lungen, n=14 pro Gruppe, Belüftung  $P = 0,032$ , Einblutung ( $P = 0,003$ )

	Mann-Whitney Rank sum Test		P
	gepuffert	nicht gepuffert	
Belüftung	1 (0,75-2)	0 (0-1)	0,032
Einblutung	2 (1-2)	0,5 (0-1)	0,003

**B:** detaillierte Beurteilung der verbliebenen linken Lunge:

Die linke Lunge wurde makroskopisch zusätzlich noch getrennt in diaphragmale, mediale, inferiore und laterale Abschnitte anhand des selben Scores (Tabelle 2) nach Parenchymbelüftung und Einblutung beurteilt.

Die Belüftung war in den medial und lateral gelegenen Abschnitten in der gepufferten Gruppe signifikant schlechter, in den anderen Bereichen konnten lediglich Trends nachgewiesen werden (Tabelle 7).

Der Grad der Einblutung war in den medialen, inferioren und lateralen Bereichen der gepufferten Gruppe signifikant schlechter, in den diaphragmalen Bereichen der linken Lunge ergab sich nur ein Trend in Richtung schlechtere Werte in der gepufferten Gruppe (Tabelle 8).

Tabelle 7:

Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung der Parenchymbelüftung der verschiedene Lungenareale der linken Lunge anhand folgenden Scores: 0=sehr gut; 1=gut; 2=schlecht; 3=sehr schlecht (Tabelle 2)

Belüftung von	Mann-Whitney Rank sum Test		P
	gepuffert	nicht gepuffert	
diaphragmal	1 (0-2)	0 (0-1)	0,097
medial	1 (0-2)	0 (0-0)	0,045
inferior	2 (0-2)	1 (0-2)	0,108
lateral	1 (0-2)	0(0-1)	0,036

Tabelle 8:

Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung der Einblutung in verschiedene Lungenareale der linken Lunge anhand folgenden Scores: 0=keine; 1=minimal; 2=mäßig, 3=ausgeprägt (Tabelle 2)

Einblutung in	Mann-Whitney Rank sum Test		P
	gepuffert	nicht gepuffert	
diaphragmal	2 (0-2)	1 (0-1)	0,093
medial	1 (1-2)	0 (0-1)	0,023
inferior	2(1-2)	1 (0-1)	0,032
lateral	2 (1-2)	0 (0-1)	0,029

### 3.5.2 histologische Beurteilung

Die histologische Beurteilung der abhängigen und nichtabhängigen Teile jeweils des Ober- und Unterlappens der linken Lunge anhand des in Tabelle 3 beschriebenen Scores ergab bei der Betrachtung der Mittelwerte der Summenscores keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, jedoch zeigte sich ein Trend zu höheren Werten in der gepufferten Gruppe ( $P = 0,191$ ) (Abbildung 22).

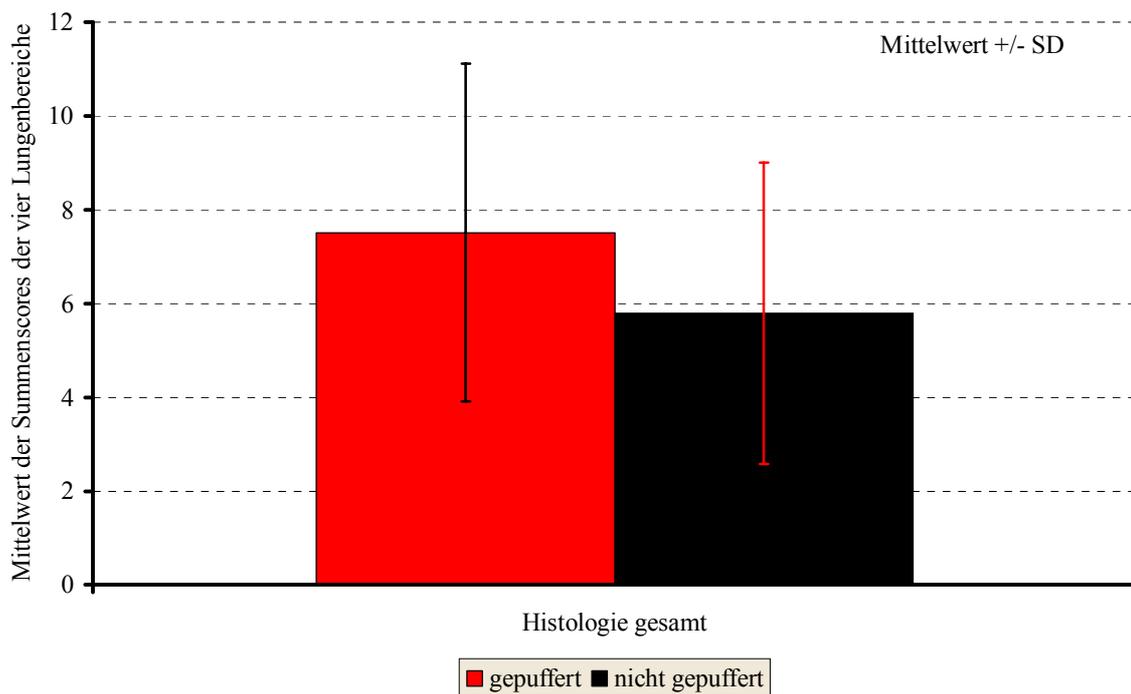


Abbildung 22:  
histologische Bewertung der Lungenabschnitte mit Berücksichtigung von Ödem, Entzündungsreaktion, Nekrosen, Atelektasen, Einblutung und Überblähung der Lungenabschnitte,  $n=14$  je Gruppe,  $P = 0,191$ , (SD=Standardabweichung)

Bei der statistischen Auswertung der abhängigen und nicht abhängigen Areale getrennt voneinander ergaben sich weder bei den abhängigen noch bei den nicht-abhängigen Arealen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 9). Auch die getrennte Untersuchung von Ober- und Unterlappen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 9), wobei im Unterlappen der gepufferten Gruppe tendenziell größere Schädigungen vorhanden waren.

Tabelle 9:

Summenscore aus der histologischen Beurteilung. Die Werte entsprechen dem Median der Summenscores der in jeweils zwei Arealen erreichten Gesamtpunkte zum Vergleich abhängige vs. nicht abhängige Areale bzw. Oberlappen vs. Unterlappen. Score siehe Tabelle 3.

	Ergebnis als Median (25%-75%)		P
	gepuffert	nicht gepuffert	
Lungenareal			
nicht abhängig	6,5 (4,6-9,4)	4,0 (3,6-5,8)	0,135
abhängig	7,3 (4,5-12,4)	5,5 (3,8-7,0)	0,251
Oberlappen	5,5 (4,0-8,5)	4,5 (4,0-5,0)	0,505
Unterlappen	8,8 (5,1-13,4)	4,8 (3,5-7,6)	0,093

Die Einzelbetrachtung der bewerteten Parameter zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich Atelektase, alveolärer und interstitieller Entzündungsreaktion, alveolärer und interstitieller Einblutung, alveolärer und interstitieller Ödeme, Nekrose und Überdehnung (Tabelle 10).

Tabelle 10

Ergebnisse der histologischen Beurteilung, aufgeschlüsselt nach betrachteten Parametern. Die Werte entsprechen dem Median der Mittelwerte aus allen vier Lungenarealen (max. mögliche Punktzahl: 4). Score siehe Tabelle 3

Parameter	Mann-Whitney Rank sum Test		P
	gepuffert	nicht gepuffert	
Atelektase	0 (0-1)	0 (0-1,5)	0,69
Alveoläre Entzündung	1,0 (0-2,5)	0,25 (0-2,25)	0,24
interstitielle Entzündung	0,75 (0-2)	0,25 (0-2,25)	0,37
alveoläre Einblutung	0,38 (0-1)	0 (0-1,5)	0,32
interstitielle Einblutung	1,5 (0-2,75)	0,75 (0-2,75)	0,36
alveoläre Ödeme	0,13 (0-1,25)	0 (0-1,0)	0,12
interstitielle Ödeme	0,5 (0-2,0)	0 (0-1,75)	0,18
Nekrosen	0	0	1
Überblähung	2,88 (1,5-3,0)	3,0 (2,25-3,0)	0,1

Bei der Untersuchung der histologischen Präparate wurden in der gepufferten Gruppe bei 7 Tieren und in der nicht gepufferten Gruppe bei zwei Tieren hyaline Membranen gesehen.

### 3.6 Volumenzufuhr

Zur Unterstützung der Hämodynamik wurden den Tieren gemäß Protokoll 0,9%ige NaCl-Lösung i.v. zugeführt. Diese Volumengaben betragen, jeweils in ml pro kg KG, für die gepufferte Gruppe 29 (19-39) und die ungepufferte Gruppe 21 (10-36). Die zugeführten Volumina unterscheiden sich nicht signifikant ( $P=0,591$ ) (Abbildung 23).

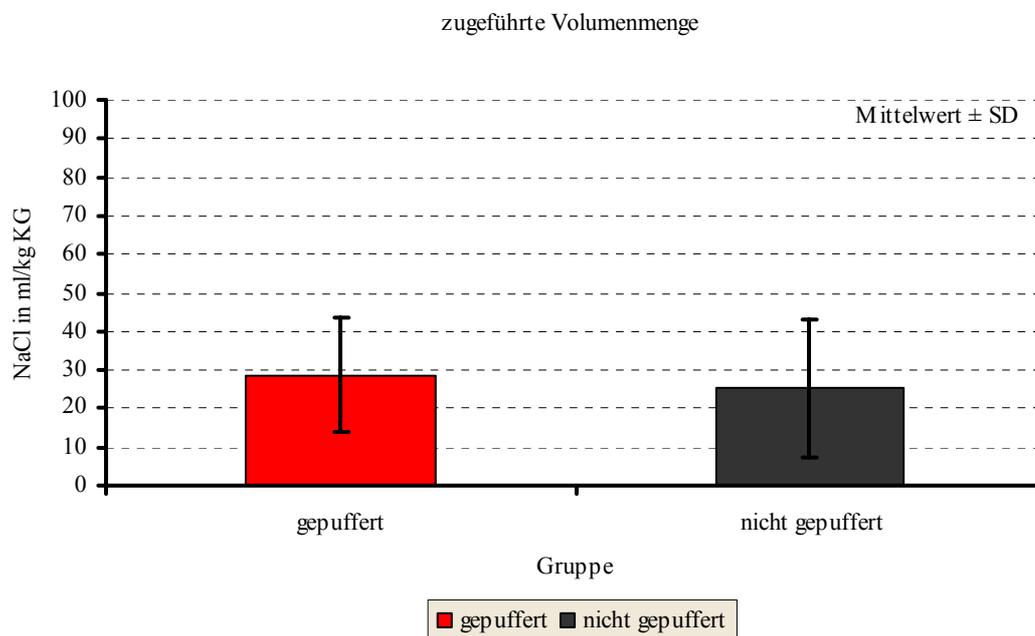


Abbildung 23

zugeführte Menge an Volumen über die Gesamtdauer des Experimentes,  $n = 14$  je Gruppe, nicht signifikant ( $P = 0,591$ ), (SD=Standardabweichung, NaCl=Natriumchlorid, KG=Körpergewicht, ml=Milliliter, kg=Kilogramm)

### 3.7 Blutproben

Zur Zeit der Baseline konnte bei keinem der untersuchten Parameter ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Tabelle 4).

#### 3.7.1 Leukozytenkonzentrationen

Die Leukozytenkonzentration der beiden Gruppen unterscheidet sich zu Beginn des Versuches nicht signifikant. Im Verlauf des sechs-stündigen Experiments zeigten sich jedoch ab Stunde 4 signifikant höhere Leukozytenzahlen im Blut der nicht gepufferten Gruppe (Abbildung 24). Innerhalb der gepufferten Gruppe lässt sich ein Abfall der Leukozytenkonzentration bis zur Stunde 4 erkennen, der sich dann aber auf diesem niedrigeren Niveau hält. Innerhalb der nicht-gepufferten Gruppe erkennt man im Gegensatz dazu einen Anstieg der Leukozytenzahl im Blut bis zur Stunde 4 und ein Einpendeln auf dem dort erreichten Niveau.

Betrachtet man die Daten über den gesamten Beobachtungszeitraum, so unterscheiden sich die beiden Gruppen signifikant ( $P = 0,029$ ).

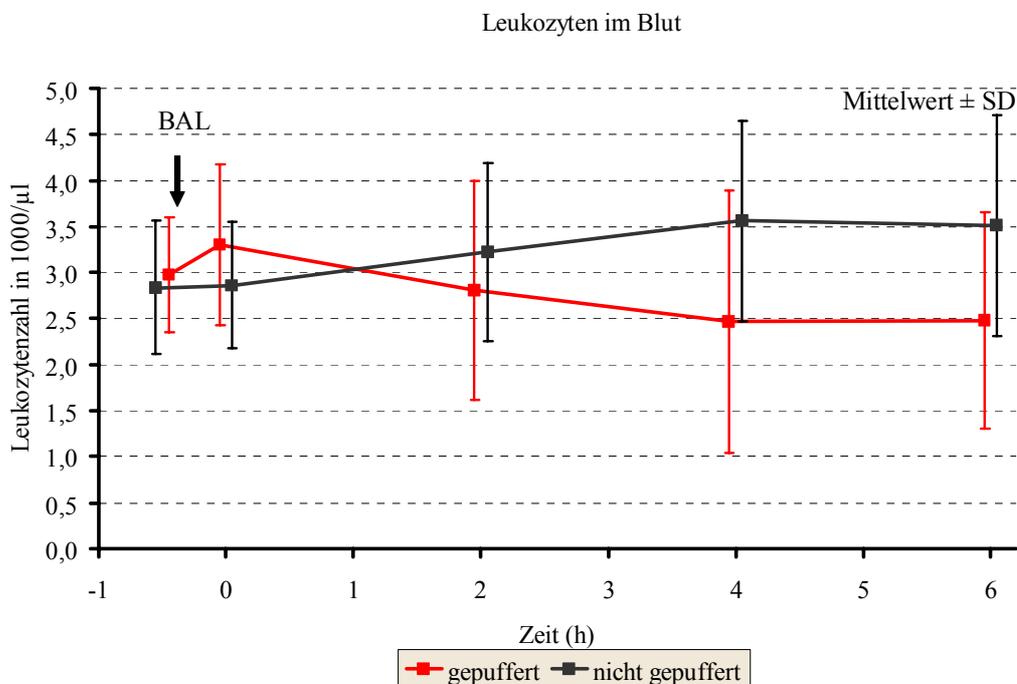


Abbildung 24:

Leukozytenkonzentration im Blut der gepufferten und der nicht gepufferten Gruppe im Verlauf des Experimentes mit Bestimmungen zum Zeitpunkt -0,5h, 0h; 2h; 4h, 6h; n = 14 je Gruppe, signifikant ( $P = 0,029$ ). (SD=Standardabweichung, BAL=broncho-alveoläre Lavage, µl=Mikroliter, h: Stunde)

### 3.7.2 neutrophile Granulozyten

Die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut der beiden Gruppen im Hinblick auf signifikante Unterschiede wurde mit Hilfe eines zweizeitigen Test für wiederholte Messungen (ANOVA on Ranks) nicht-normalverteilter Daten untersucht. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $P=0,117$ ). Zur Stunde 4 findet man jedoch einen signifikanten Unterschied der Mediane der beiden Gruppen von 0,29 ( $P=0,048$ ). Zu anderen Zeiten unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht signifikant (Abbildung 25).

Insgesamt ist ein signifikanter Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten innerhalb des Beobachtungszeitraumes ( $P = 0,001$ ) von  $1,60 \times 1000/\mu\text{l}$  (1,18-1,70) auf  $2,40 \times 1000/\mu\text{l}$  (2,18-2,68) in der nicht-gepufferten Gruppe zu beobachten.

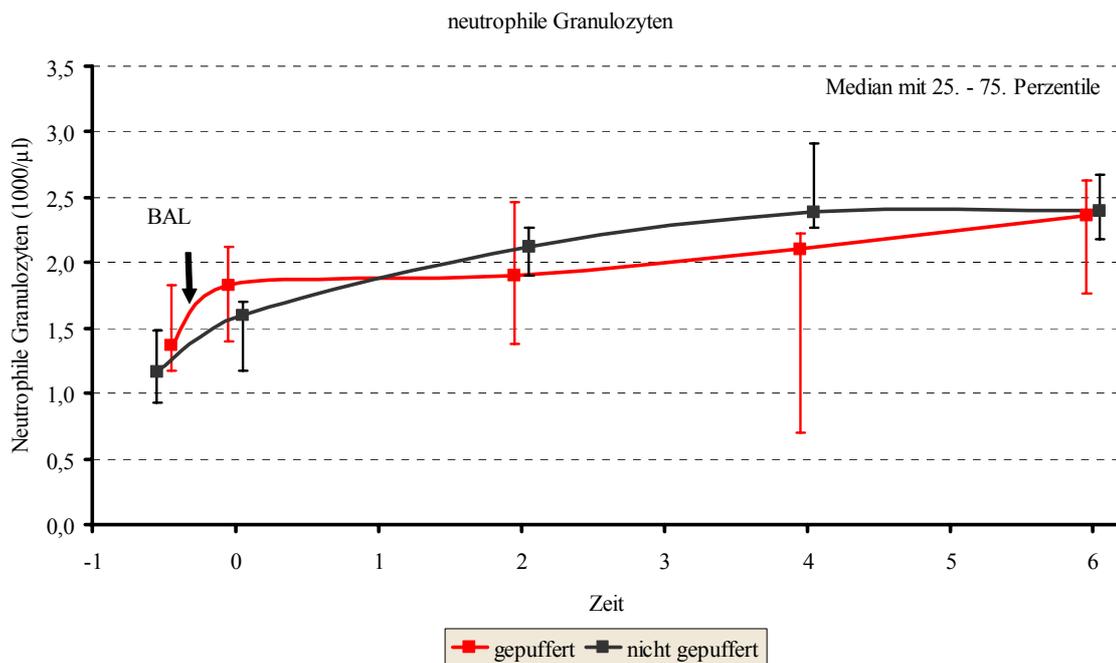


Abbildung 25:

neutrophile Granulozytenkonzentration im Blut der gepufferten und der ungepufferten Gruppe im Verlauf des Experimentes mit Bestimmungen zum Zeitpunkt -0,5; 0; 2; 4; 6 Stunden,  $n = 14$  je Gruppe, nicht signifikant ( $P=0,117$ ),  $\mu\text{l}$ =Mikroliter.

### 3.7.3 Thrombozyten

Die Zahl der Thrombozyten wies keinen Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe auf (Abbildung 26). Im Verlauf des Experiments fiel die Zahl der Thrombozyten in beiden Gruppen (gepuffert:  $P = 0,002$ ; nicht gepuffert  $P < 0,001$ ), jedoch unterscheiden sich die Werte zu keiner Zeit signifikant ( $P = 0,758$ ).

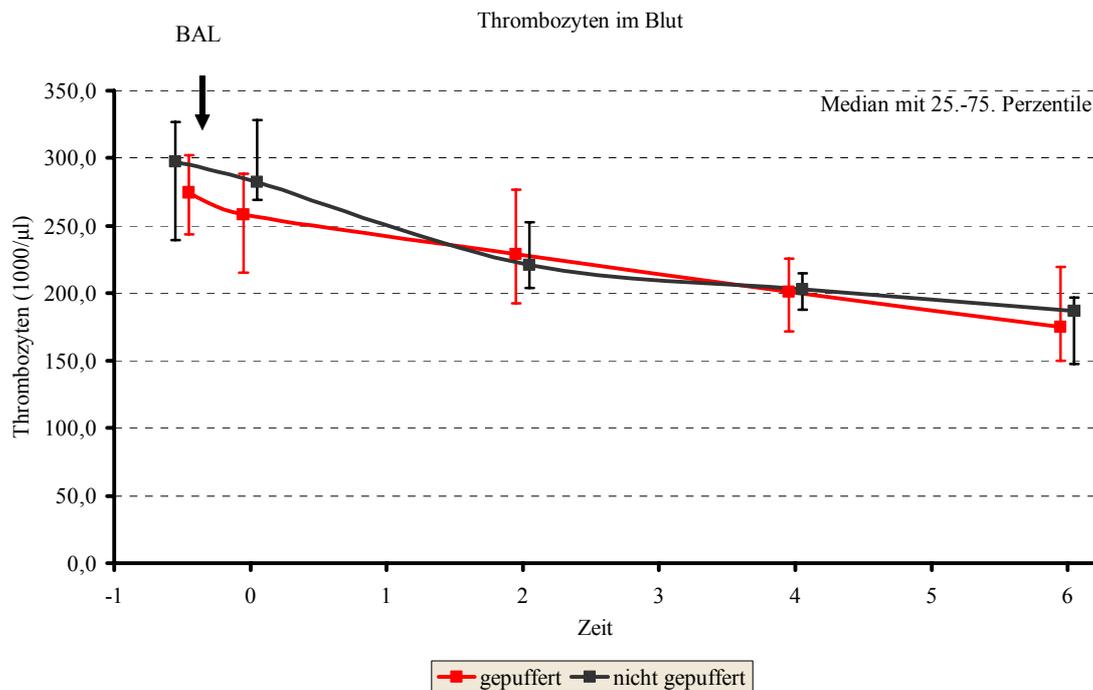


Abbildung 26:

Thrombozytenkonzentration im Blut der gepufferten und der ungepufferten Gruppe im Verlauf des Experimentes mit Bestimmungen zum Zeitpunkt -0,5; 0; 2; 4; 6 Stunden. Dargestellt als Median mit 25.-75. Perzentile.  $n = 14$  je Gruppe; nicht signifikant ( $P = 0,758$ ),  $\mu$ l=Mikroliter.

### 3.7.4 Hämatokrit

Der Hämatokrit wies keinen Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe auf (Abbildung 27). Im Verlauf des Experimentes fiel der Hämatokrit in beiden Gruppen (gepuffert:  $P = 0,095$ ; nicht gepuffert  $P = 0,264$ ), jedoch unterscheiden sich die Werte zu keiner Zeit signifikant ( $P = 0,592$ ).

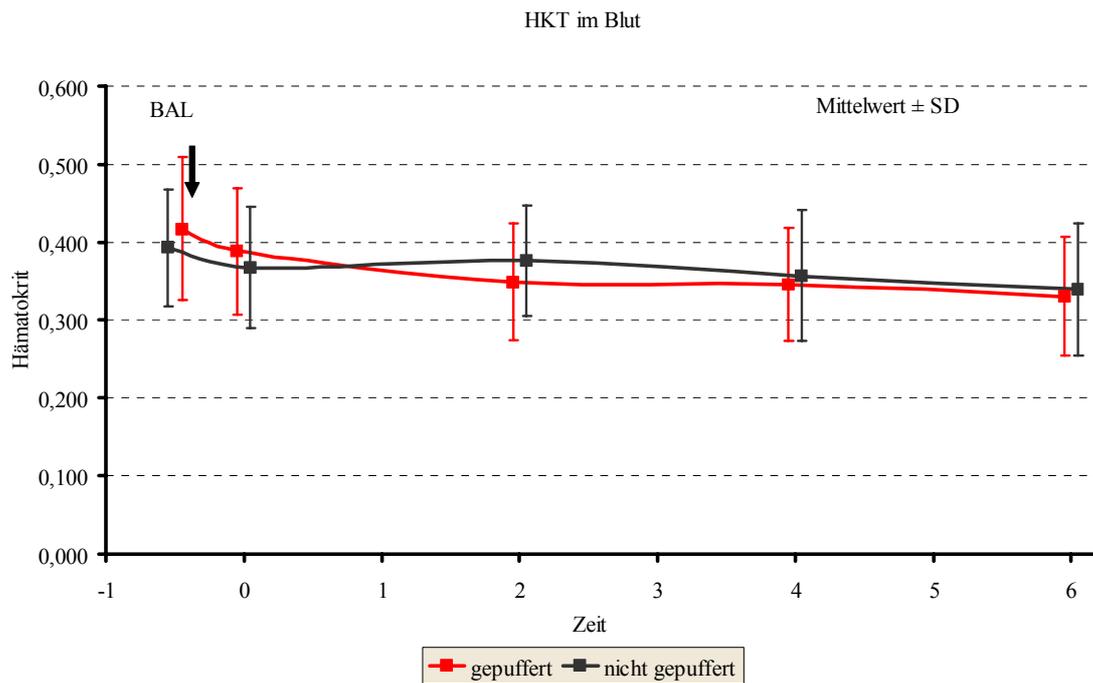


Abbildung 27:

Hämatokrit (Hkt) im Blut der gepufferten und der ungepufferten Gruppe im Verlauf des Experimentes mit Bestimmungen zum Zeitpunkt -0,5; 0; 2; 4; 6 Stunden, n = 14 je Gruppe; nicht signifikant ( $P = 0,592$ ), (SD=Standardabweichung, BAL=broncho-alveoläre Lavage)

### 3.8 Blutgasanalysen

Keiner der Untersuchten Parameter unterschied sich zur Baseline des Experimentes zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 4).

#### 3.8.1 PaCO<sub>2</sub>

Der PaCO<sub>2</sub> der beiden Gruppen steigt zu Beginn des Versuches wie im Protokoll vorgegeben auf 80mmHg an und pendelt sich auf diesem Niveau ein. Die beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant ( $P = 0,329$ ) (Abbildung 28).

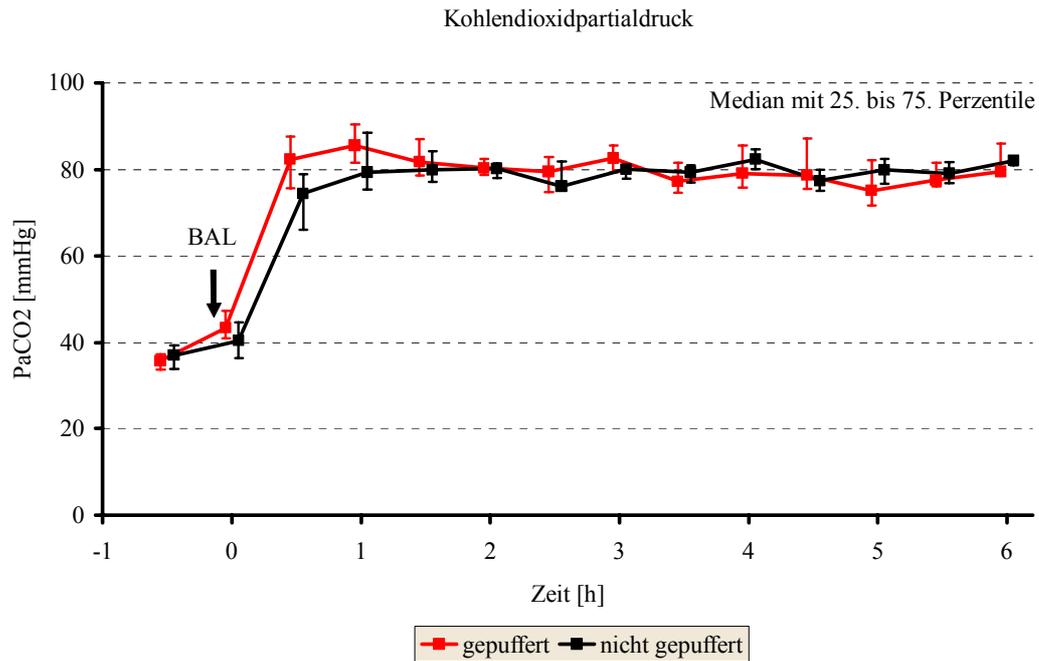


Abbildung 28:

Verlauf des Kohlendioxidpartialdruckes (PaCO<sub>2</sub>) über die Dauer des Experimentes, mit n=14 je Gruppe; nicht signifikant (P = 0,329), (BAL=broncho-alveoläre Lavage, mmHg=Millimeter Quecksilbersäule, h: Stunde)

### 3.8.2 PaO<sub>2</sub>

Zwischen den Medianen des PaO<sub>2</sub> der beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (P = 0,157). In beiden Gruppen fällt nach der BAL der PaO<sub>2</sub> stark ab, dieser steigt aber im Versuchsverlauf kontinuierlich an und beträgt am Ende des Versuchs zur Stunde 6 in der gepufferten Gruppe 417 mmHg (204-449) und in der ungepufferten Gruppe 374 mmHg (249-423) (Abbildung 29).

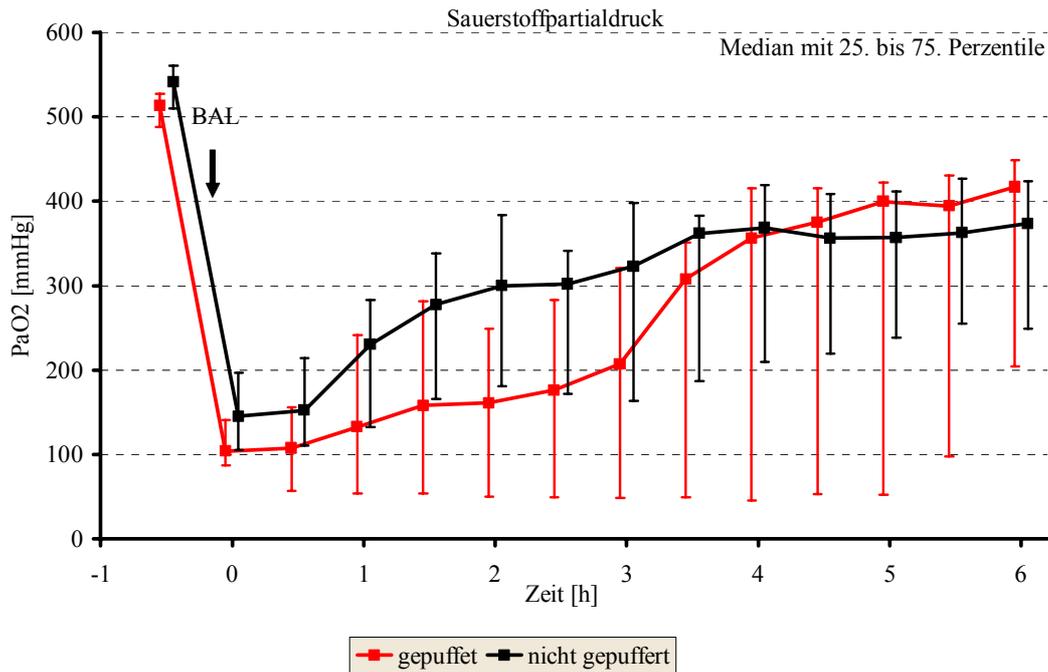


Abbildung 29:

Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>) im Blut der gepufferten und der ungepufferten Gruppe im Verlauf des Experimentes, mit n=14 je Gruppe, nicht signifikant, (P = 0,157), (BAL=broncho-alveoläre Lavage, mmHg=Millimeter Quecksilbersäule, h=Stunde).

### 3.8.3 SaO<sub>2</sub>

Abbildung 30 zeigt, dass die beiden Gruppen sich bezüglich der Sauerstoffsättigung des Blutes nicht signifikant unterscheiden (P = 0,302). Auch bei der statistischen Auswertung der einzelnen Zeitpunkte lässt sich zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied feststellen.

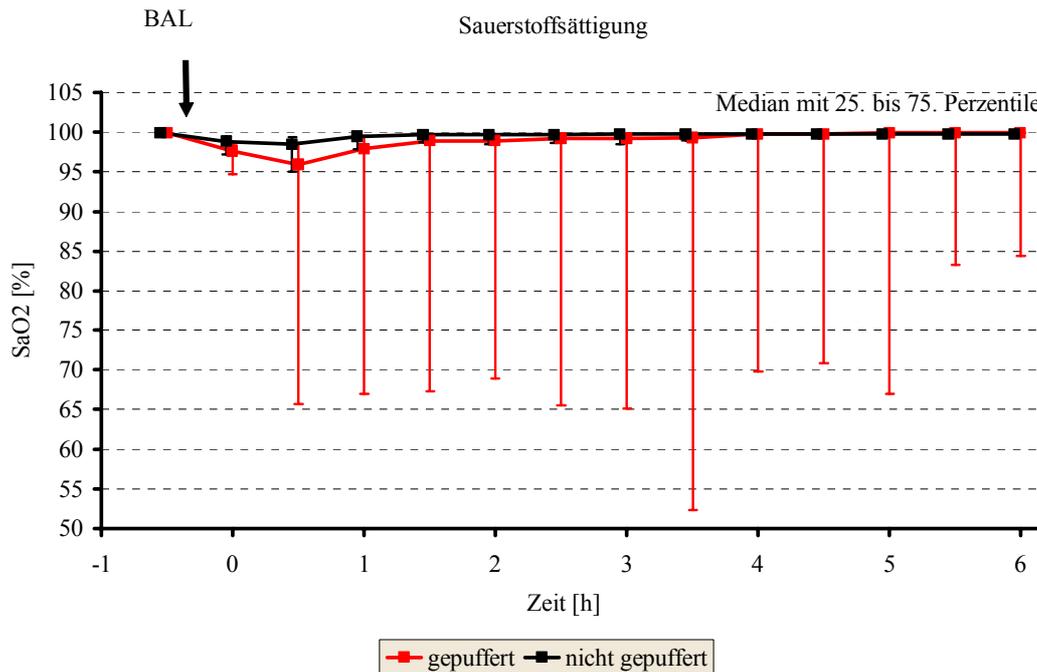


Abbildung 30:

Sauerstoffsättigung (SaO<sub>2</sub>) im Blut der gepufferten und der ungepufferten Gruppe im Verlauf des Experimentes, mit n=14 je Gruppe, nicht signifikant, (P = 0,302), (BAL=broncho-alveoläre Lavage, h=Stunde).

### 3.8.4 Herzzeitvolumenindex und Sauerstofftransport

Der Herzzeitvolumenindex (HZVI) der Tiere beider Gruppen stieg in der ersten Stunde nach der Initial-BAL von ca. 140 ml/kg/min auf ca. 200 ml/kg/min an (Abbildung 31). Insgesamt ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen (P = 0,411).

Betrachtet man den Sauerstofftransport als Produkt aus Sauerstoffkonzentration im arteriellen Blut und HZVI (Abbildung 32), so wird signifikant mehr Sauerstoff in der nicht gepufferten Gruppe transportiert. (P = 0,002 bei n = 14 je Gruppe). Der maximale Unterschied zwischen den beiden Gruppen findet man zur Stunde 2 nach Initiallavage mit 17,8 ml/kg/min in der gepufferten bzw. 22,0 ml/kg/min in der ungepufferten Gruppe, was einem um ca. 24% höherem Sauerstofftransport in der nicht gepufferten Gruppe im Vergleich zur gepufferten Gruppe entspricht.

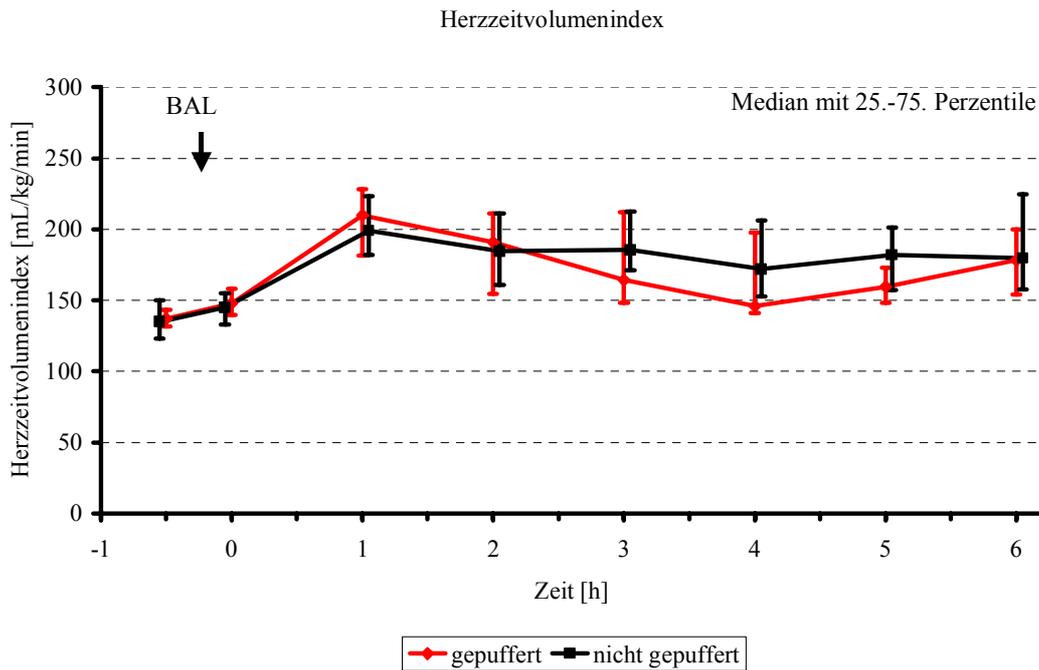


Abbildung 31:  
Herzzeitvolumenindex im Verlauf des Experiments, n=14 je Gruppe, nicht signifikant, (P = 0,411), (ml=Milliliter, kg=Kilogramm, min=Minute, BAL=broncho-alveoläre Lavage, h: Stunde)

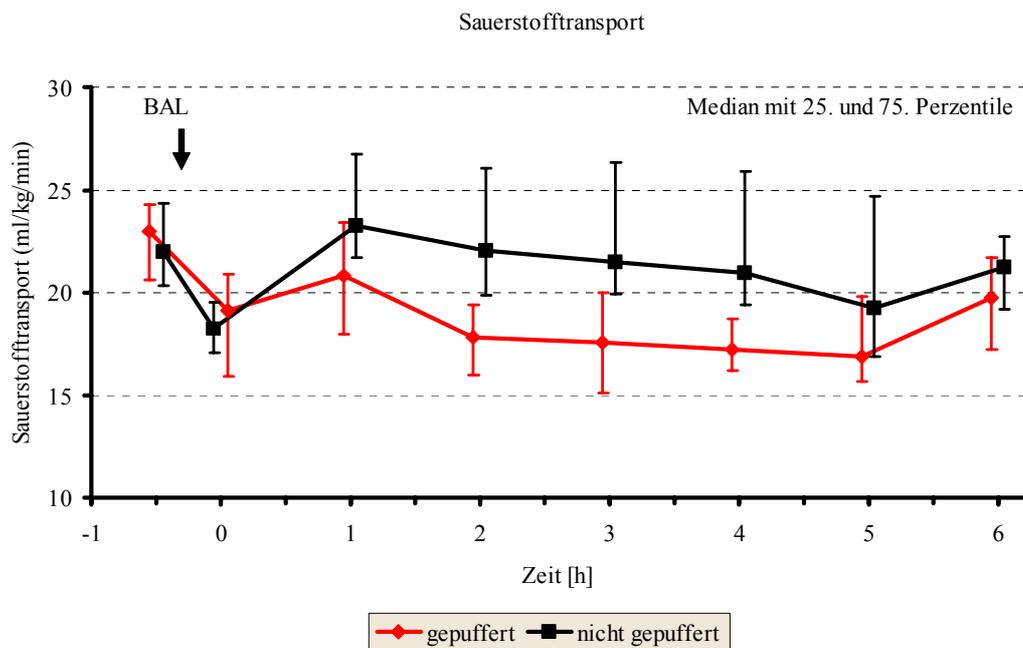


Abbildung 32:  
Sauerstofftransport im Verlauf des Experiments, mit n=14 je Gruppe. signifikant, (P = 0,002), (ml=Milliliter, kg=Kilogramm, min=Minute, BAL=broncho-alveoläre Lavage, h: Stunde)

### 3.9 *metabolische Parameter*

#### 3.9.1 pH-Wert:

Zu Beginn des Experiments direkt nach der BAL befindet sich der pH-Wert in beiden Gruppen, die sich nicht signifikant unterscheiden (Tabelle 4), im Normbereich. Der pH-Wert fällt jedoch in der gepufferten Gruppe auf ein Minimalwert zum Zeitpunkt 0,5 h von 7,27 (7,25-7,28), steigt dann bis zum Zeitpunkt Stunde 2 wieder an und bleibt dann relativ konstant bis zum Ende des Experiments bei einem Median von 7,37 (7,35-7,40), (Abbildung 33).

Im Gegensatz dazu fällt der pH-Wert des Blutes der ungepufferten Tier bis zum Ende des Experimentes, wobei die größte Änderung des pH-Wertes zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0,5 Stunden zu verzeichnen ist. Hier misst man einen Unterschied zwischen den Medianen von 0,21 ( $P < 0,001$ ).

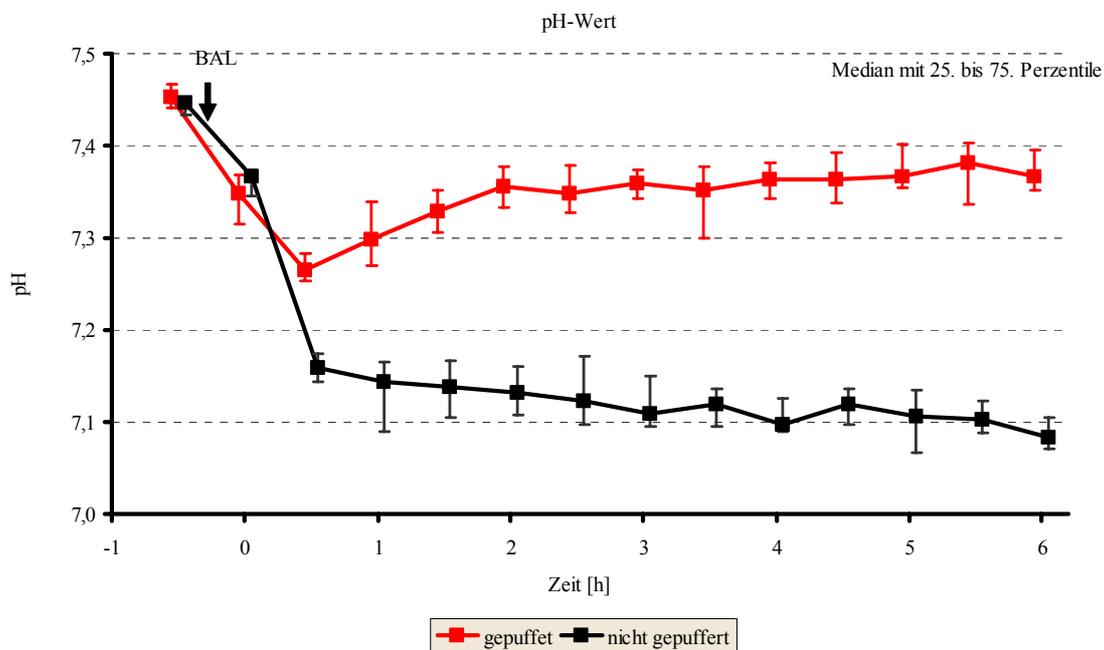


Abbildung 33:

Verlauf des pH-Wertes über die Dauer des Experimentes, mit n=14 je Gruppe, signifikant, ( $P < 0,001$ ), (BAL = broncho-alveoläre Lavage, h=Stunde)

### 3.9.2 Laktat

Die Laktatwerte im Blut der Kaninchen (Abbildung 34) unterscheiden sich signifikant. ( $P = 0,035$ ). Zur Zeit der Baseline konnte noch kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 4). Die Mediane der Gruppe der gepufferten Tiere weisen ab Stunde 1 höhere Werte als die nicht gepufferte Gruppe auf. Bei der statistischen Auswertung der einzelnen Messzeitpunkte stellt man ab einschließlich Stunde 3 signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen fest. Am Ende des Versuches wurden bei der gepufferten Gruppe eine Laktatkonzentration in Höhe von 2 mmol/l (1,3-4,55) und im Gegensatz dazu in der nicht gepufferten Gruppe 1,2 mmol/l (0,8-2,05) gemessen.

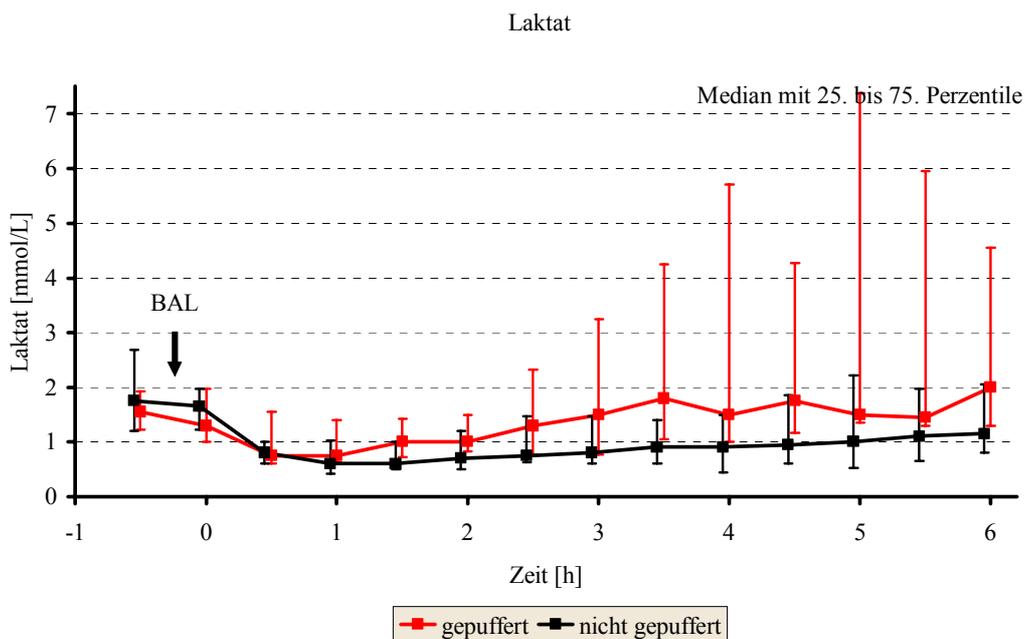


Abbildung 34:

Verlauf des Laktates über die Dauer des Experimentes, mit  $n=14$  je Gruppe, signifikant, ( $P = 0,035$ ), (BAL=broncho-alveoläre Lavage, mmol=Millimol, l=Liter, h=Stunde)

### 3.9.3 Basenüberschuss

Erwartungsgemäß unterscheiden sich die beiden Gruppen in diesem Versuch ab Stunde 0,5 signifikant in ihrem Basenüberschuss ( $P < 0,001$ ). Beide Kurven fallen nach der BAL ab, anschließend steigt in der gepufferten Gruppe der Basenüberschuss steil an, mit einem maximalen Anstieg zwischen Baseline und Stunde 0,5. Die ungepufferte Gruppe steigt bis zur Stunde 1 geringfügig an, fällt dann aber kontinuierlich und erreicht am Ende ein Basendefizit von 6,2 mmol/l (6,7 - 5,0) (Abbildung 35).

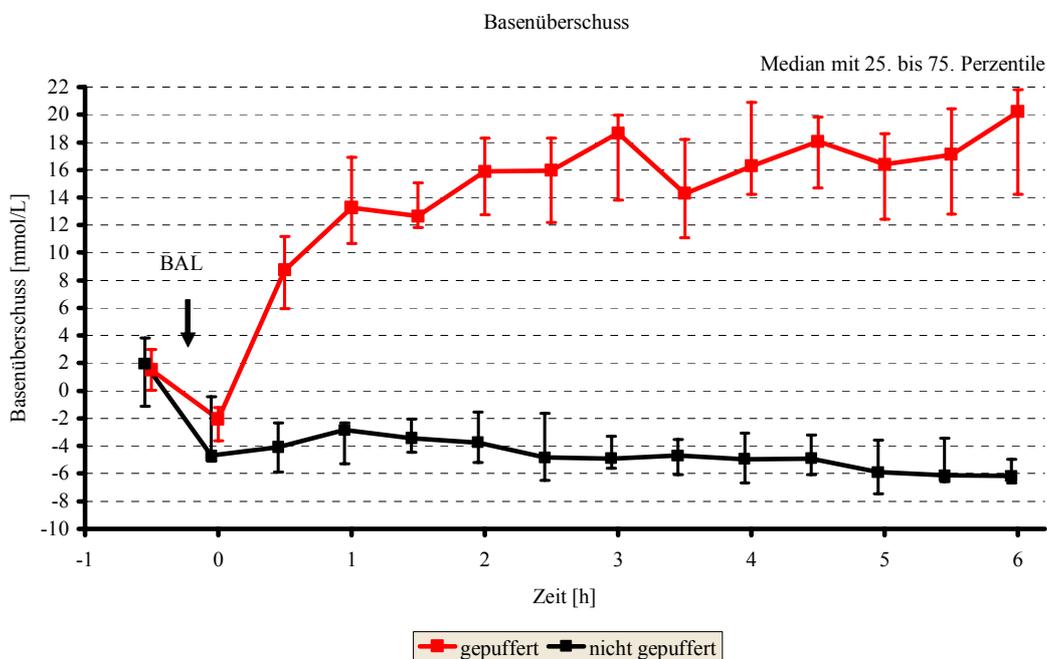


Abbildung 35:

Verlauf des Basenüberschusses über die Dauer des Experimentes, mit  $n=14$  je Gruppe, signifikant, ( $P < 0,001$ ), (BAL=broncho-alveoläre Lavage, mmol=Millimol, l=Liter, h=Stunde)

### 3.9.4 Glukose

Die Glukosekonzentration im Blut unterscheidet sich weder zur Baseline des Experimentes (Tabelle 4) noch während des Verlaufs signifikant ( $P = 0,059$ ) innerhalb der beiden Gruppen (Abbildung 36). Es gibt jedoch einen Trend in Richtung höhere Blutglukosewerte in der nicht gepufferten Gruppe. Die Menge an zugeführter Glucose unterscheidet sich nicht ( $P = 0,909$ ).

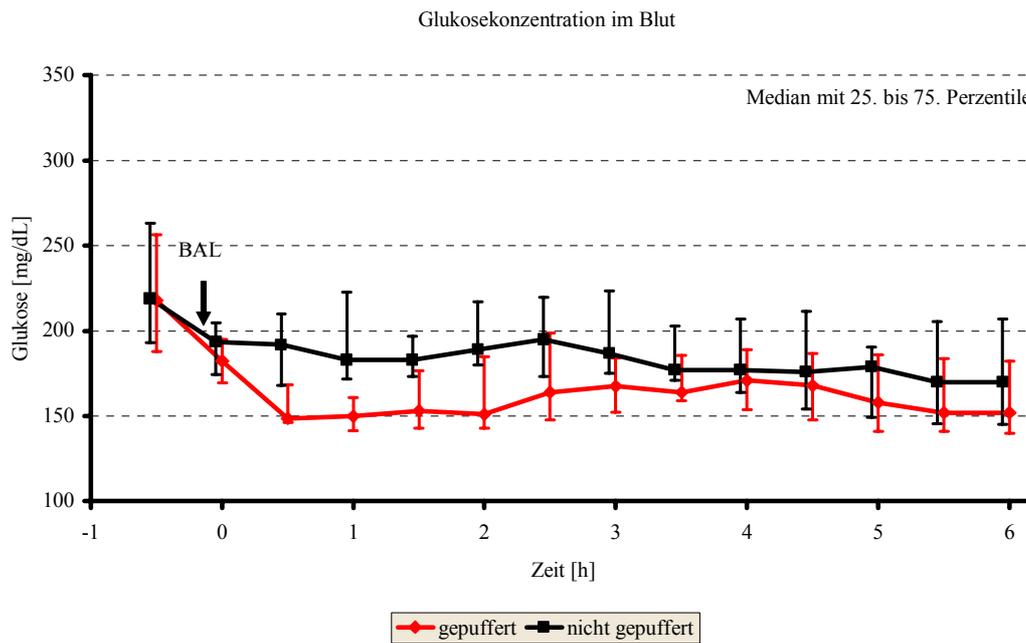


Abbildung 36:

Verlauf der Glukosekonzentration über die Dauer des Experimentes, mit n=14 je Gruppe, nicht signifikant, (P= 0,059), (mg=Milligramm, dl= Deziliter, h=Stunde, BAL=broncho-alveoläre Lavage)

### 3.10 Elektrolyte

#### 3.10.1 Natriumkonzentration

Zum Zeitpunkt der Baseline gab es keine Unterschiede zwischen der Na<sup>+</sup>-Konzentration der gepufferten und der ungepufferten Versuchsgruppe (Tabelle 4).

Bei der statistischen Untersuchung der Messwerte der Na<sup>+</sup>-Konzentration ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in der Zeit nach der Baseline bis zum Ende des Experimentes (P < 0,001). Am Ende des Versuches unterschieden sich die beiden Gruppen in der Na<sup>+</sup>-Konzentration um 18,2 mmol/l (Abbildung 37).

Innerhalb der Gruppe der gepufferten Tiere ergab sich ein signifikanter Anstieg der Na<sup>+</sup>-Konzentration von 131,7 mmol/l ± 5,6 auf 152,7 mmol/l ± 6,0 mit P<0,001 zwischen Baseline und Stunde 6. Im Gegensatz dazu änderte sich die Na<sup>+</sup>-Konzentration in der nicht-gepufferten Gruppe über diesen Zeitpunkt nicht signifikant. [Baseline: 131,6 mmol/l ± 2,6; Stunde 6: 134,4 mmol/l ± 4,9; P = 0,069].

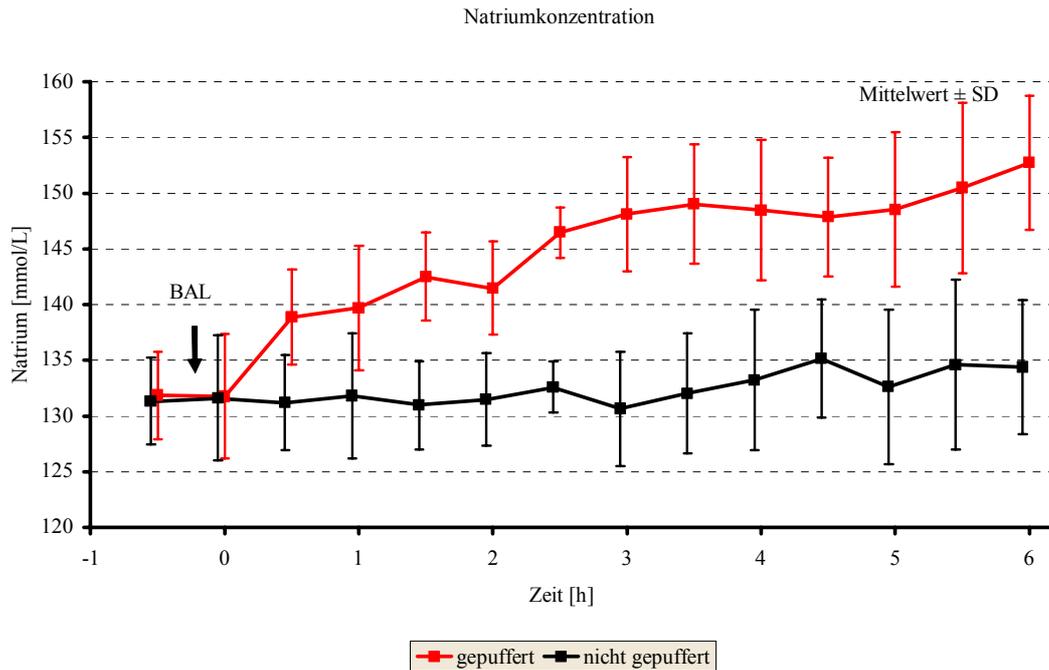


Abbildung 37:

Natriumkonzentration im Serum im Verlauf des Experiments, mit  $n = 14$  pro Gruppe, signifikant ( $P < 0,001$ ), (mmol=Millimol, l=Liter, SD=Standardabweichung, BAL=broncho-alveoläre Lavage, h=Stunde)

### 3.10.2 Kaliumkonzentration

Zu Beginn des Versuches lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Kaliumkonzentration feststellen (Tabelle 4). Im Verlauf des Experimentes unterscheiden sich die Mediane der Kaliumkonzentrationen der beiden Gruppen signifikant ( $P < 0,001$ ).

Die extrazelluläre Kalium-Konzentration der Gruppe der ungepufferten Tiere steigt während des Versuchsverlaufes bis zum Ende des Experimentes auf  $5,0 \text{ mmol/l}$  ( $4,75\text{-}5,5$ ). Die Kaliumkonzentration steigt innerhalb der nicht-gepufferten Gruppe signifikant ( $P < 0,001$ ) um  $1,2 \text{ mmol/l}$ .

Die Gruppe der gepufferten Tiere zeigt über den selben Zeitintervall dagegen einen signifikanten Abfall ( $P = 0,024$ ) der Kaliumkonzentration (Abbildung 38).

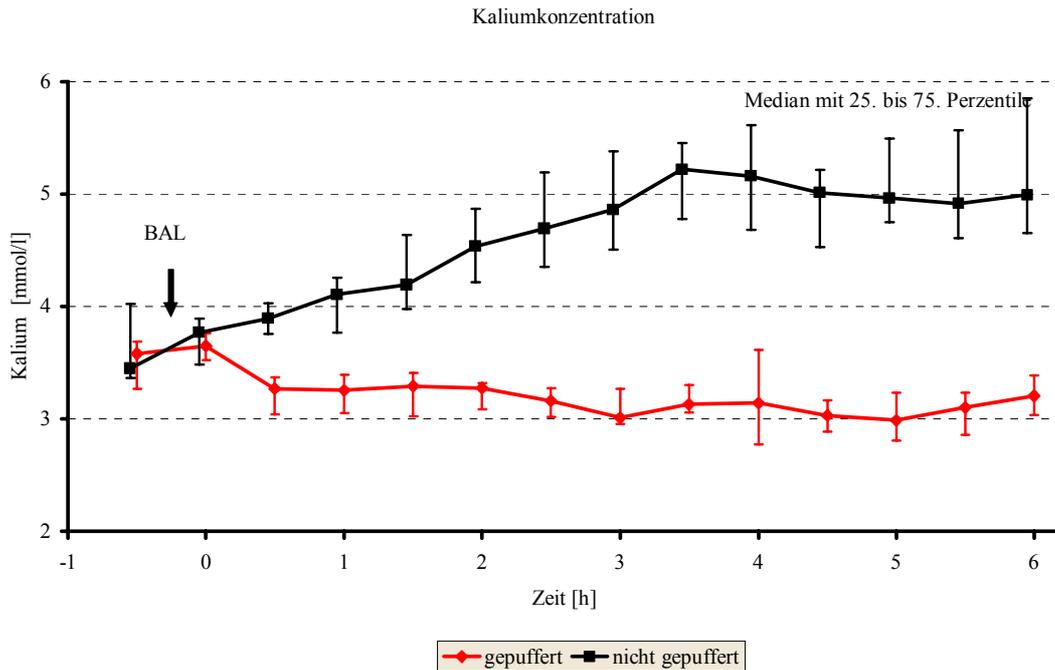


Abbildung 38:

Kaliumkonzentration im Serum im Verlauf des Experiments, mit n= 14 pro Gruppe, signifikant, ( $P < 0,001$ ), (mmol=Millimol, l=Liter, h=Stunde, BAL=broncho-alveoläre Lavage)

### 3.10.3 ionisiertes Kalzium

Die Konzentration des ionisierten Kalziums ist zwischen den beiden Gruppen signifikant verschieden ( $P < 0,001$ ). Der maximale Unterschied der Mediane der beiden Gruppen beträgt zum Zeitpunkt 4,5h 0,52 mmol/l. Die Gruppen unterscheiden sich zur Baseline noch nicht voneinander (Tabelle 4), dann fällt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Blut der gepufferten Gruppe jedoch signifikant ( $P < 0,001$ ) bis zum Ende um 0,52 mmol/l ab und erreicht am Ende einen Wert von  $0,88 \text{ mmol/l} \pm 0,11$ , was einer Abnahme um 37% entspricht (Abbildung 39).

Die Gruppe der ungepufferten Tiere zeigt im Verlauf des Experimentes keine signifikanten Änderung der Ca-Konzentration.

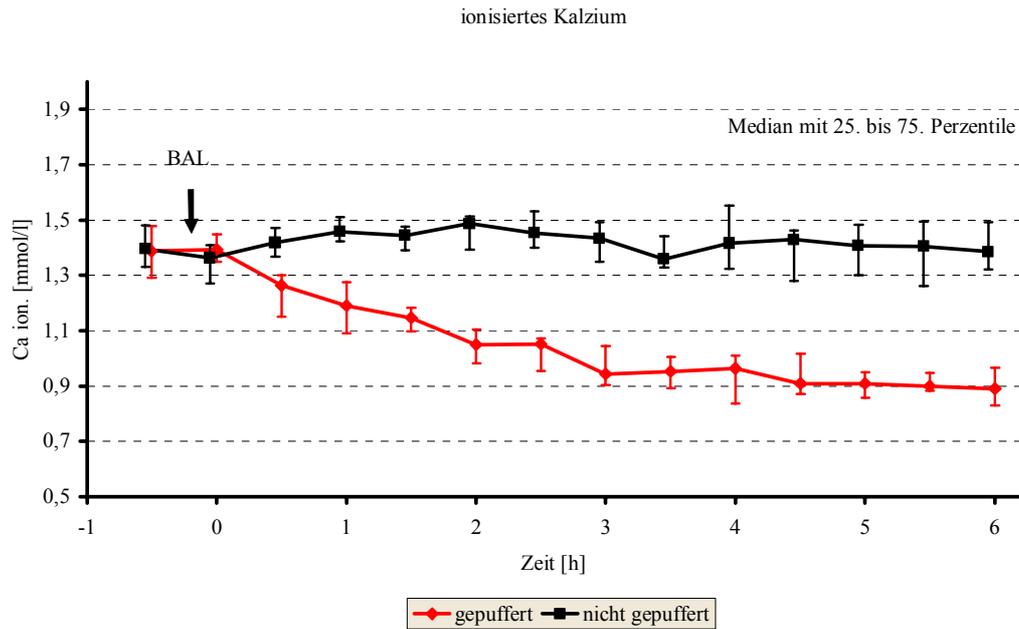


Abbildung 39:

Verlauf der ionisierten Kalziumkonzentration (Ca ion) über die Dauer des Experimentes, mit n=14 je Gruppe, signifikant, ( $P < 0,001$ ), (BAL=broncho-alveoläre Lavage, mmol=Millimol, l=Liter, BAL=broncho-alveoläre Lavage, h=Stunde)

### 3.11 broncho-alveoläre Lavage

Es wurden in der broncho-alveolären Lavage folgende Zellarten unterschieden: Epithelzellen, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten zusammen mit Monozyten, neutrophile Granulozyten.

Bei der Lavage am Anfang des Versuches konnte bei keiner der Zellarten zwischen den jeweiligen Gruppen signifikante Unterschiede gefunden werden (Tabelle 4).

Die Abbildung 40 veranschaulicht die Verteilung der Zellarten in der BAL der jeweiligen Gruppe sowohl in der Lavageflüssigkeit, die zu Beginn des Versuches gewonnen wurde als auch in der Lavageflüssigkeit der BAL am Ende des Versuches.

Der Lymphozyten- und Monozyten-Anteil, der eosinophile Granulozyten-Anteil und der Anteil der Epithelzellen der letzten Lavage war nicht signifikant verschieden in den beiden Gruppen (Tabelle 11).

Tabelle 11:

Prozentualer Anteil von Epithelzellen, Lymphozyten/Monozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophilen Granulozyten am Gesamtzellaufkommen in der End-Lavage, (SD=Standardabweichung)

End-BAL-Parameter jeweils in (%)	Ergebnis als Mittelwert +/- SD oder Ergebnis als Median, 25%-75%		P
	gepuffert	nicht gepuffert	
Lymphozyten/Monozyten	16 (12-22)	16 (6-44)	0,945
neutrophile Granulozyten	59 +/- 23	39 +/- 29	0,047
eosinophile Granulozyten	3 (2-6)	5,5 (2-8)	0,613
Epithelzellen	15 (4-24)	30 (16-43)	0,085

Jedoch unterscheidet sich der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten in der gepufferten Gruppe signifikant ( $P = 0,047$ ) vom Anteil der Neutrophilen in der ungepufferten Gruppe. In der gepufferten Gruppe ließen sich 59,1% +/- 22,5 neutrophile Granulozyten nachweisen, im Gegensatz dazu enthielt die Lavage der ungepufferten Tiere nur 38,8% +/- 28,7 neutrophile Granulozyten.

Untersucht man die Veränderungen der Zellartverteilung innerhalb der Gruppe der gepufferten Tiere, so ergibt sich ein signifikanter Anstieg der Lymphozyten und Monozyten von 2% (2-4) auf 16% (12-22), ( $P < 0,001$ ) oder Verachtfachung des Ausgangswertes.

Auch der Anteil der neutrophilen Granulozyten steigt signifikant von 4% (2-8) auf 62% (34-78) an ( $P < 0,001$ ).

Dagegen bleibt der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten weitgehend unverändert ( $P = 0,731$ ). Der Median des Anteils der Epithelzellen fällt in dieser Gruppe signifikant um 74% ab ( $P < 0,001$ ).

Wie auch in der gepufferten Gruppe steigt in der Gruppe der nicht gepufferten Tiere der Anteil der Lymphozyten und Monozyten ( $P < 0,001$ ) und der Anteil der neutrophilen Granulozyten, wobei geringer als bei der gepufferten Gruppe nur von 2% (0-3) auf 31,5% (18-54),  $P < 0,001$ , signifikant an. Der Anteil der Epithelzellen fiel auch in dieser Gruppe signifikant von 92% (88-93) auf 30% (16-43) ( $P < 0,001$ ). Im Gegensatz dazu änderte sich die Zahl der eosinophilen Granulozyten nicht signifikant ( $P = 0,161$ ).

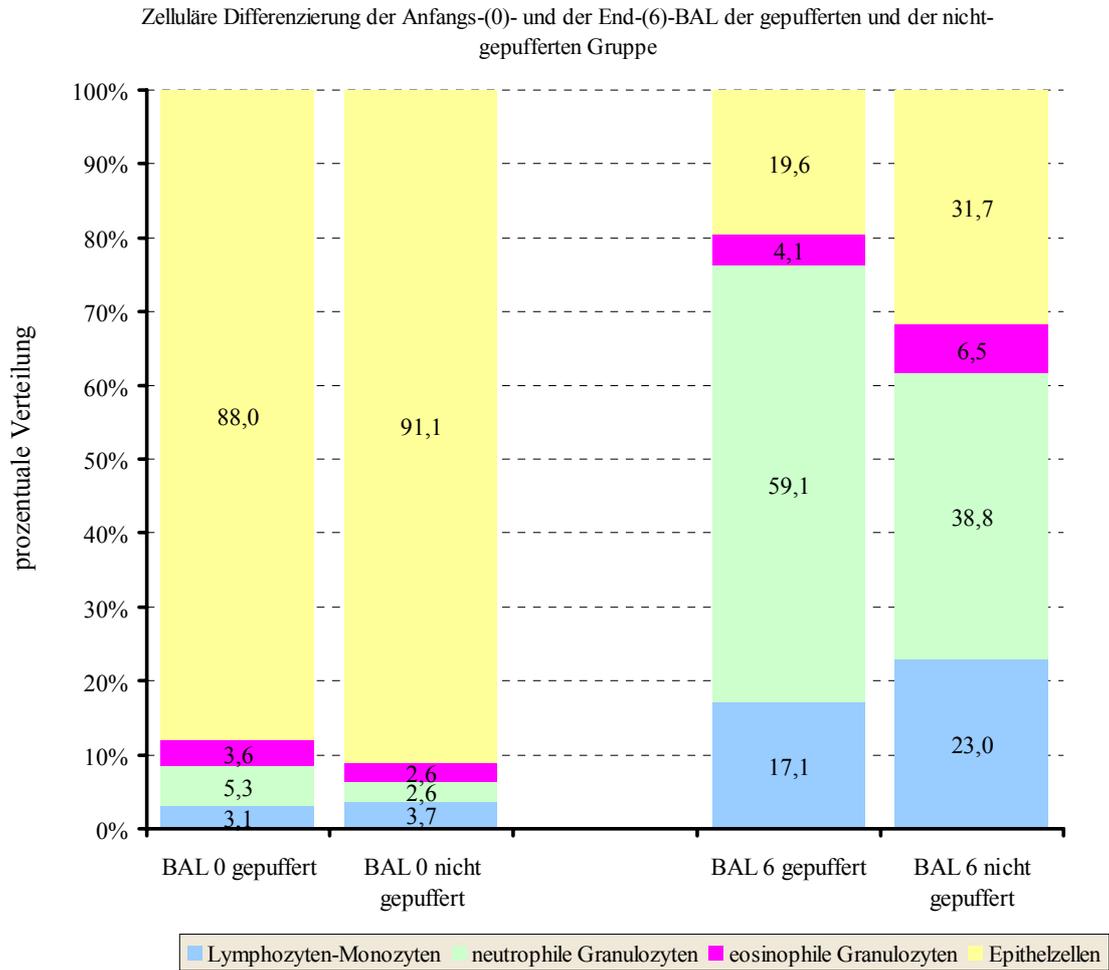


Abbildung 40:  
 Prozentualer Anteil von Epithelzellen, Lymphozyten/Monozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophilen Granulozyten am Gesamtzellaufkommen in der Anfangs- und End-Lavage der gepufferten und der nicht gepufferten Gruppe n = 14, Darstellung der Mittelwerte. BAL=broncho-alveoläre Lavage

## 4. Diskussion

Mit dieser Studie wurde erstmals die Auswirkungen der Pufferung der hyperkapnischen Azidose beim surfactant-depletierten Versuchstier auf systemische Inflammation und Lungenparenchym in vivo untersucht.

Obwohl es weder ausreichend Fall-Kontroll Studienmaterial zum Thema Pufferung der hyperkapnischen Azidose am Tiermodell noch am Menschen gibt, ist die Pufferung im klinischen Alltag eine gängige, aber auch kontrovers diskutierte Praxis.

### ***4.1 Gründe für die Anwendung des vorliegenden Tiermodells zur Untersuchung der inflammatorischen, mikro- und makroskopischen Veränderungen durch Pufferung der permissiven Hyperkapnie bei RDS durch Surfactantmangel***

Die Anwendung dieses Tiermodells erschien hinsichtlich der Übertragbarkeit auf das RDS bei Neugeborenen aufgrund des Gewichtes und der Körpergröße, welche einem Neugeborenen ähnlich sind und einer ausreichenden Grundlage an vorangegangenen Studien, die sich ebenfalls mit permissiver Hyperkapnie befassen und somit die Planung und Durchführung des Experimentes erleichterten, geeignet. Das Tiermodell von der Arbeitsgruppe bereits in anderen Studien angewandt [22].

Die Methode der Schädigung der Lunge durch Entfernung eines Großteils des Surfactants imitiert den pulmonalen Zustand eines unreifen Neugeborenen mit RDS durch insuffiziente Surfactant Produktion. Jedoch sind die in dieser Studie verwendeten drei Monate alten Tiere aufgrund ihrer ausreichenden Lungenreife dazu fähig, durch die Lavage entferntes Surfactant durch Aktivierung der Pneumozyten Typ 2 zumindest teilweise zu ersetzen, was sich in unserem Experiment vermutlich auch darin widerspiegelt, dass der nach der Anfangslavage in der gepufferten Gruppe auf 104 mmHg (87-141) und in der ungepufferten Gruppe bis auf 145 mmHg (105-197) gefallene  $PO_2$  während des Experimentes in beiden Gruppen bis auf Werte zwischen 300 und 400 mmHg anstieg.

Die Ergebnisse der Studie lassen sich aber nur eingeschränkt auf das RDS beim Frühgeborenen übertragen, da man davon ausgehen muss, dass die rechtsventrikulären

Adaptationsmöglichkeiten an höhere pulmonale Drücke bei Neugeborenen im Vergleich zu den reifen Kaninchen höher sind.

## 4.2 *Verwendeter Puffer*

Im klinischen Bereich wird zur Pufferung aufgrund langjähriger Erfahrung und der klinischen Relevanz des Präparates  $\text{Na}^+$ -Bicarbonat zur Pufferung der Azidose verwendet. Bei der Verwendung von  $\text{Na}^+$ -Bicarbonat zur Pufferung der hyperkapnischen Azidose kann bei starker Hypoventilation und somit Retention nicht nur des intrazellulär anfallenden  $\text{CO}_2$ , sondern auch des bei der Pufferung der Anionen zusätzlich entstehenden  $\text{CO}_2$  kommen. So kann der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck über das bei der therapeutischen Hyperkapnie gängige Maß von 75-85 mmHg hinaus im Sinne einer exzessiven Hyperkapnie mit all ihren möglicherweise negativen Auswirkungen, wie z.B. zerebrovaskuläre Vasodilatation und Minderung der myokardialen Kontraktilität, ansteigen. Andererseits kann die Puffersubstanz auch nur dann puffernde Wirkung zeigen, wenn das  $\text{CO}_2$  auch dem Gleichgewicht entzogen, also abgeatmet, wird.

Um den erniedrigten pH Wert wieder in den Normalbereich anzuheben, sind aufgrund der relativ niedrigen Pufferkapazität des  $\text{Na}^+$ -Bicarbonates große Mengen und somit auch hohe Volumenmengen nötig, um adäquat auf die Azidose zu reagieren, was bei kardial vorbelasteten Patienten zu einer verstärkten Volumenbelastung bis hin zur Herzinsuffizienz führen kann. Des weiteren zeigte sich, dass bei der raschen Zufuhr größerer Mengen  $\text{Na}^+$ -Bicarbonats  $\text{CO}_2$  durch die Zellmembran diffundiert, dort mittels Carbonanhydrase  $\text{H}^+$  entsteht und so auch der intrazelluläre pH gesenkt wird, da im Gegensatz zu  $\text{CO}_2$  Bicarbonat nicht nach intrazellulär diffundiert [12]. Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austausch wird aktiviert, anschließend kommt es zur Pufferung der aus der Zelle heraustransportierten Protonen und daraus folgend zu einer Einstellung eines veränderten Bikarbonatgleichgewichtes [27].

In der vorliegenden Studie wurde die gepufferte Gruppe mit einem Median von 29,06 ml Bicarbonat pro kg KG versorgt. Diese zusätzliche Volumengabe war jedoch nicht hämatokritwirksam, denn es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu verzeichnen. Es erscheint damit auch unwahrscheinlich, dass eine wesentliche zusätzliche Volumenbelastung des Herzens entstand.

Des Weiteren wurde in dieser Studie die Atemfrequenz  $\text{PCO}_2$ -abhängig verändert, so dass eine Exazerbation der hyperkapnischen Azidose und Verschiebung des  $\text{CO}_2$ -Gleichgewicht und damit des intrazellulären pH-Wertes in dieser Studie ausgeschlossen war.

### **4.3 *Diskussion der Messwerte***

#### **4.3.1 Direkte Hinweise auf die Lungenschädigung**

Das Feucht-/Trockengewicht der Lunge, Proteinkonzentration in der BAL, die makroskopischen und histologischen Untersuchungen dienen zur Quantifizierung der direkten Lungenschädigung.

##### **4.3.1.1 Feucht-/Trockengewicht**

Das Feucht-/Trockengewicht ergab in der gepufferten Gruppe um 32% höhere Werte (Abbildung 13). Unter der Annahme, dass das erhöhte Feucht-Gewicht der Lunge durch eine Zunahme der interzellulären Ödeme bedingt ist, weist die Erhöhung dieser Werte in der gepufferten Gruppe auf einen negativen Effekt der Pufferung auf die Integrität des Lungengewebes im Sinne einer gesteigerten Kapillarpermeabilität hin. Steigerungen des Trocken-Gewichtes der Lunge weisen auf den Einstrom primär von Proteinen aus den Gefäßen und deren Akkumulation im Interstitium und in den Alveolen hin. Jedoch auch die anderen im Exsudat enthaltenen zellulären Bestandteile erhöhen das Trocken-Gewicht. Die Hypothese der Studie, dass durch Pufferung der hyperkapnischen Azidose das Feucht-/Trockengewicht der Lunge um mehr als 25% höher liegt als bei ungepufferter Hyperkapnie, wurde in unserem Experiment bestätigt.

Damit werden die Ergebnisse von Laffey et al. [24], die am Ischämie-Reperfusionsmodell ex vivo bereits signifikant höhere Feucht-/Trockengewichte bei Pufferung im Vergleich zur nicht gepufferten hyperkapnischen Azidose zeigten, erstmals in vivo bestätigt.

##### **4.3.1.2 Protein im Serum und der Lavage**

Andere Autoren fanden eine reduzierte BAL-Proteinkonzentration unter Anwendung von permissiver Hyperkapnie im Vergleich zu normokapnischen Beatmung bei surfactant-depletierten Kaninchen [17]. Die Verläufe der Proteinkonzentrationen in Serum und BAL

sprechen in beiden Gruppen für die Entwicklung eines alveolären Ödems: Abnahme der Proteinkonzentration im Serum und im Gegenzug dessen Zunahme im Lungengewebe und auch in der Lavage während des Experimentes (Tabelle 5).

Durch den Vergleich der *Quotienten* der Proteinkonzentrationen (Stunde 6/Stunde 0) konnten Inhomogenitäten innerhalb einer Gruppe eliminiert werden. Obwohl der Quotient der Proteinkonzentration in der BAL in der gepufferten Gruppe nicht signifikant höher war, zeigte sich doch ein deutlicher Trend in diese Richtung ( $P=0,063$ ; Abbildung 16).

Die Gesamtproteinkonzentration in der BAL war in der gepufferten Gruppe mehr als doppelt so hoch wie in der nicht-gepufferten Gruppe. Die erhöhte Proteinkonzentration ist in doppelter Hinsicht hinweisend auf einen durch Pufferung geminderten protektiven Effekt der hyperkapnischen Azidose: Dieser Proteinanstieg ist vermutlich einerseits Folge einer gesteigerten Permeabilität, die Laffey et al. in ihrer Studie [24] durch Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten direkt quantifizieren konnten und bezüglich dieses Parameters signifikant höhere Werte bei Pufferung nachweisen konnten, andererseits wird die Funktion des noch in der Lunge verbliebenen Surfactants durch proteinhaltige Alveolarflüssigkeit direkt negativ beeinflusst [9].

#### 4.3.1.3 Interleukin-8

Interleukin-8 ist eine potente, chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkende Substanz. Il-8 wird im klinischen Alltag als Frühmarker für die Entstehung von systemischen inflammatorischen Reaktionen verwendet und wird von Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen produziert und ausgeschüttet. Vlahakis et al. [49] konnten in vitro das wiederholte Dehnen von Alveolarzellen, ohne Auftreten von strukturellen Schädigungen der Zellen, als einen weiteren Reiz zur Ausschüttung von Il-8 nachweisen. Goodman et al. haben nachgewiesen, dass die Konzentration von IL-8 stark mit der Neutrophilenkonzentration in der BAL von erwachsenen ARDS Patienten korreliert [13]. Deshalb erschien es sinnvoll diesen Parameter zur Einschätzung der Auswirkung der Pufferung der Azidose unter permissiver Hyperkapnie auf die systemische inflammatorische Reaktion vor allem an diesem Tiermodell zu untersuchen.

Der Interleukin-8-Gehalt stieg im Verlauf des Experimentes in der BAL und im Serum sowohl in der gepufferten als auch in der ungepufferten Gruppe an (Abbildung 17, Abbildung 18). Es ließen sich jedoch, bis auf die Il-8-Konzentration in der BAL als Anteil am Gesamtprotein, in keinem der Probenmaterialien signifikante Unterschiede feststellen

(Abbildung 18). Überraschender Weise lag der Anteil des Il-8 am Gesamtprotein in der BAL in der ungepufferten Gruppe signifikant höher. Diese Ergebnisse sind schwierig zu deuten, zumal Ergebnisse anderer Untersuchungen zum Teil widersprüchliche Informationen über die Bedeutung von Interleukin 8 als Marker der Schädigung bei permissiver Hyperkapnie liefern.

Rai et al. [38] untersuchten am selben Tiermodell Unterschiede des Einflusses von Normoventilation-Hyperkapnie, Normoventilation-Normokapnie, Hypoventilation-Hyperkapnie und Hypoventilation-Normokapnie auf die ventilator-assoziierte Lungenschädigung und maß in allen vier Gruppen einen Anstieg der Interleukin-8-Konzentration innerhalb des 150-minütigen Beobachtungszeitraumes, jedoch erkannten sie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch Strand et al. [44] fanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Il-8-mRNA Konzentrationen des Lungengewebes und den Zellen der BAL hyperkapnisch-hypoventilatorisch und normokapnisch-hypoventilatorisch beatmeter frühgeborener Lämmer, jedoch höhere Werte im Lungengewebe hyperkapnisch-beatmeter Lämmer und niedrigere Werte in den Zellen der BAL. Ein Anstieg der Il-8-Konzentration über den Beatmungszeitraum wurde bei allen erwähnten Studien festgestellt, jedoch konnte in keinem der Fälle ein signifikanter protektiver Effekt der Hyperkapnie festgestellt werden.

Klinische Daten von Ranieri et al. [39] konnten keinen Unterschied zwischen Normo- und Hypoventilation von erwachsenen ARDS-Patienten bezüglich der Il-8-Konzentration im Plasma und in der BAL, dennoch aber einen signifikanten Il-8-Abfall in der BAL während der hypoventilatorischen Beatmung, zeigen.

Hummler et al. [22] dagegen fanden in einer experimentellen Studie eine signifikant niedrigere Il-8-Konzentration im Plasma unter Hypoventilation mit Hyperkapnie als unter Normoventilation mit Normokapnie beim surfactant-depletierten Kaninchen.

Obwohl die Il-8-Konzentrationen mit dem Risiko der Entwicklung eines ARDS beim Erwachsenen korreliert und bei später verstorbenen ARDS Patienten mit Multiorganversagen von Beginn an höhere Interleukin-8-Konzentrationen im Plasma [19] und in der BAL [19, 31] nachweisbar waren, könnte es sein, dass bei dem vorliegenden Kurzzeitmodell Il-8 eine geringer Rolle spielt.

Betrachtet man die Il-8 Konzentrationen im Gewebe, die Ergebnisse der interstitiellen und alveolären Inflammation und die Zellverteilung in der BAL, so finden sich alle diese inflammatorischen Parameter zwar nicht signifikant, aber dennoch tendenziell erhöht in der gepufferten Gruppe.

#### 4.3.1.4 makroskopische Analysen

Die geblindet durchgeführten makroskopischen Analysen spiegeln ebenfalls die unter Pufferung der Hyperkapnie verstärkte Lungenschädigung unter mechanischer Beatmung durch zyklische Wiedereröffnung, Atelektasenbildung und die damit verbundenen Scherkräfte bei Surfactantmangel sowohl hinsichtlich der Einblutungen als auch der Lungenbelüftung wider. Bei der Beurteilung der einzelnen Lungenareale der linken Lunge wurde in allen Bereichen (diaphragmal, medial, inferior und lateral) Unterschiede sowohl bezüglich der Belüftung als auch der Einblutung gefunden, wobei der Median in allen Bereichen in der gepufferten Gruppe (Score Tabelle 2) schlechter als in der nicht gepufferten Gruppe war (Tabelle 6). Die Tatsache, dass die Belüftung in beiden Gruppen im inferioren Abschnitt um einen Scorepunkt schlechter als in den anderen Arealen ist, könnte dadurch erklärt werden, dass die Tiere auf dem Rücken gelagert waren und so durch äußere komprimierende Einflüsse, wie das Gewicht des Herzens und der abdominelle Druck, die inferioren Abschnitte atelektatisch wurden.

#### 4.3.1.5 histologische Analysen

Die Tendenz in Richtung Verstärkung der Lungenschädigung durch Pufferung, die sich in der makroskopischen Beurteilung der Lunge zeigte, zeichnete sich auch in der histologischen Beurteilung der rechten Lunge ab (Tabelle 9, Tabelle 10).

Dreyfuss et al. [5] gingen von der Unterbrechung des Endothels als Schädigungsmechanismus aus, die, hervorgerufen durch die Lungendehnung, neutrophile Granulozyten direkt mit der Basalmembran des Lungengewebes in Kontakt treten lässt und diese dadurch aktiviert werden. Der Ausprägungsgrad der Infiltration der Lunge mit Leukozyten scheint jedoch stark von der Zeit unter Beatmung abzuhängen, denn auch andere Autoren konnten erst bei längerer Beatmungsdauer Unterschiede der Granulozytenzahlen in der BAL bzw. im Lungenparenchym feststellen [4]. Würde der 6-stündige Behandlungszeitraum noch verlängert werden, so wäre eventuell mit stärkeren histologischen Unterschieden zwischen den beiden Gruppen zu rechnen.

Die Entstehung von interstitiellen und alveolären Ödemen wird in verschiedenen Modellen zur Lungenschädigung als relativ schnell eintretendes Ereignis beschrieben. Parker et al. [36] konnten schon nach 10 minütiger Beatmung von Hunden mit 45 cmH<sub>2</sub>O die Ausbildung eines interstitiellen Ödemes beobachten. Die Ödeme entstehen sowohl durch

den steigenden intrakapillären Druck als auch durch die Steigerung der Kapillarpermeabilität.

Nach Schädigung durch Ischämie und anschließender Reperfusion isolierter Rattenlungen untersuchten Moore et al. [33] den Einfluss eines azidotischen extrazellulären pH-Wertes und der Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausches auf die mikrovaskulären Schäden. Die Perfusion der Lunge vor der ischämischen Phase mit mittels HCl auf einen pH von 7,09 gesenkten Perfusionslösung verhinderte den sonst nach Ischämie und Reperfusion beobachteten Permeabilitätsanstieg, gemessen am kapillären Filtrationskoeffizient, vollständig. Auch die Zugabe von Amilorid, welches den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch hemmt, verhinderte einen Anstieg der Permeabilität nach der Reperfusion. Moore erklärte seine Ergebnisse mit einer pH- und  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch Abhängigkeit der für den Ischämie-Reperfusionsschaden verantwortlichen Faktoren, wie z.B. die Produktion freier Sauerstoffradikale, der Xanthinoxidase, Leukozyten und endothelialer Adhäsionsmoleküle. Da dieselben Mediatoren auch für die ventilator-induzierte Lungenschädigung verantwortlich gemacht werden [23], [39], sind die Ergebnisse von Moore et al. wahrscheinlich auch auf das Schädigungsmodell der vorliegenden Studie übertragbar. Der Trend in Richtung eines vermehrten interstitiellen und alveolären Ödems in der gepufferten Gruppe spricht für die pH-Abhängigkeit der Permeabilitätzunahme des Endothels. Auch Laffey et al. [24] konnten nach Ischämie-Reperfusionsschaden eine stärkere Erhöhung des kapillären Filtrationskoeffizienten bei Pufferung einer hyperkapnischen Azidose messen, als bei Perfusion der Lunge mit einer Perfusionslösung mit einem pH Wert von 6,87 +/- 0,01. Jedoch nahm die Permeabilität in der gepufferten Gruppe Laffeys weniger stark zu als in seiner normokapnischen Kontrollgruppe.

Die Tatsache, dass in beiden Gruppen noch Überblähungen im Sinne von Basalmembran und Alveolarseptenzerreißen in beinahe 100% des Gesichtsfeldes zu sehen waren drängt den Gedanken auf, in wie weit die trotz Beatmung mit einem niedrigen Tidalvolumen und einem PEEP oberhalb des unteren Umschlagspunktes der Druck-Volumenkurve aufgetretenen strukturellen Lungenschädigungen durch eine weitere Reduktion des Tidalvolumens zu verringern wären. Da die Sauerstoffsättigung in beiden Gruppen noch annähernd 100% war, wäre eine Reduktion des  $V_t$  im Hinblick auf eine noch ausreichende Oxygenierung durchaus möglich, der  $\text{PaCO}_2$  würde ohne zusätzliche Atemfrequenzerhöhung jedoch steigen.

Die erhöhte Gesamtschädigung in Unterlappen bzw. abhängigen Teilen der Lunge lassen sich wie auch die makroskopischen Unterschiede durch die Lagerung des Kaninchens erklären. Aufgrund der Rückenlage sammelt sich das ödematöse Exsudat in den abhängigen Bereichen. Aufgrund dieser physiologischen Gegebenheiten wird versucht, bei der Therapie von Langzeitbeatmeten durch kontinuierliche Lagerungsänderungen in die Bauchlage die Ödementwicklung und die Belüftungsstörung in den abhängigen Lungenarealen möglichst gering zu halten.

### **4.3.2 Blutproben**

#### **4.3.2.1 Leukozyten und neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten spielen durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffgruppen, Proteinasen und Arachidonsäuremetaboliten eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie des RDS [40]. Da eine Depletion der Granulozyten, die Entwicklung einer pulmonalen Dysfunktion in verschiedenen Tiermodellen[23], [52] verhindern kann, geht man von einem direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung und Akkumulation der Granulozyten und dem Schweregrad des ARDS aus. Betrachtet man die Ergebnisse der Leukozytenzahl und der neutrophilen Granulozytenzahl im Blut, so stellt man fest, dass die neutrophilen Granulozyten in beiden Gruppen kontinuierlich und gleichwertig ansteigen, die Leukozytenzahl im Blut jedoch in der nicht-gepufferten Gruppe ansteigt, in der gepufferten Gruppe jedoch eher abfällt (Abbildung 24, Abbildung 25). Untersucht man jedoch den Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten zur Stunde 6, so stellt man fest, dass sich in beiden Gruppen ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Blut zeigt, wobei dieser nur in der nicht gepufferten Gruppe signifikant war (Abbildung 25). Der Anstieg könnte als eine systemische inflammatorische Reaktion gedeutet werden.

In vitro konnten Rabinovitch et al. eine gesteigerte Migration neutrophiler Granulozyten im Agarose-Gel unter Azidosefeststellen [37].

Strand et al. [44] untersuchten den protektiven Effekt einer hyperkapnischen Beatmung ( $PCO_2 = 95 \pm 5$  mmHg) an surfactantbehandelten frühgeborenen Lämmern und stellten in der hyperkapnisch beatmeten Behandlungsgruppe nach sechs Stunden einen Anstieg der Zahl der Neutrophilen im Blut um ca. 70% fest, wohingegen die Neutrophilen in der normokapnischen Kontrollgruppe um ca. 160% anstiegen. Der signifikante Anstieg der Neutrophilenzahl in der nicht gepufferten Gruppe ließe sich mit der geringfügig höheren

Neutrophilenzahl zur Stunde 0 in der gepufferten Gruppe erklären. Eine weitere Möglichkeit der Erklärung für den geringeren Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der gepufferten Gruppe könnte eine Migration der Zellen in die Lunge darstellen. Dies ließe sich anhand einer quantitativen Auswertung der Neutrophilenzahl in der BAL mittels Durchflusszytometrie näher untersuchen, was leider aus methodischen und organisatorischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte.

#### **4.3.2.2 Thrombozyten**

Am signifikanten Abfall der Thrombozytenzahlen in beiden Gruppen (Abbildung 26) können folgende Faktoren beteiligt sein. Erstens: Verdünnung des Blutes durch die zugeführten Volumina. Zweitens: durch die ventilator-induzierte Lungenschädigung kam es zu Einblutungen in das Lungengewebe und damit zum Verbrauch der Thrombozyten. Drittens: bei der systemischen Entzündungsreaktion kam es zur Thrombozytenaktivierung und zum disseminierten Verbrauch bzw. zu einer Kombination dieser drei Faktoren. Die relative Bedeutung dieser möglichen Faktoren ist hochgradig spekulativ, da sie nicht untersucht wurden.

#### **4.3.2.3 Hämatokrit**

Der Hämatokrit sank in beiden Gruppen vermutlich aufgrund der Blutentnahmen und der zugeführten Erhaltungsinfusionen in beiden Gruppen geringfügig ab (Abbildung 27). Der tendenziell stärkere Abfall in der gepufferten Gruppe lässt sich mit der in dieser Gruppe durch die Pufferung zusätzlich zugeführte Volumenmenge begründen.

### **4.3.3 Blutgasanalysen**

#### **4.3.3.1 PaCO<sub>2</sub>**

Auch der Anstieg des PaCO<sub>2</sub> im Verlauf unseres Experimentes wurde von uns erwartet und lag bei allen Tieren in dem vom verwendeten Protokoll vorgegebenen Bereich von 75-85 mmHg, was durch Änderung der Beatmungsfrequenz in Abhängigkeit von den regelmäßig durchgeführten BGAs erreicht wurde. Der Ziel-PaCO<sub>2</sub> wurde in beiden Gruppen zum Zeitpunkt 1h erreicht (Abbildung 28). Die von Hickling et al. [14, 18] vorgeschlagenen PaCO<sub>2</sub> Werte für die klinische Anwendung einer permissiven

Hyperkapnie wurden damit in unserem Experiment eingehalten. Beide Gruppen erhielten durch die Hyperkapnie, PEEP und ein auf 4 ml/kg KG reduziertes Tidalvolumen dieselben protektiven Ausgangsvoraussetzungen.

#### **4.3.3.2 PaO<sub>2</sub> und SaO<sub>2</sub>**

Die arterielle Sauerstoffsättigung (SaO<sub>2</sub>) ist von dem arteriellen O<sub>2</sub>-Partialdruck (PaO<sub>2</sub>) abhängig, welcher wiederum sowohl vom alveolären Sauerstoffpartialdruck (PAO<sub>2</sub>) als auch vom alveolären CO<sub>2</sub> Partialdruck abhängt. Steigt durch die Hyperkapnie der alveoläre PCO<sub>2</sub>, so fällt nach der alveolären Gasgleichung der alveoläre PO<sub>2</sub> ab, wodurch wiederum die Sauerstoffaufnahme durch das kapilläre Blut und somit der PaO<sub>2</sub> etwas verringert wird. Dieser Tatsache muss im klinischen Alltag mittels eines hohen FiO<sub>2</sub> entgegengewirkt werden. Durch die respiratorische Azidose kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve (Bohr-Effekt) und damit zu einer verminderten Sauerstoffsättigung des Blutes[16].

Die durch die hyperkapnische Azidose entstehende Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und damit schlechtere Sauerstoffsättigung lässt sich durch die Pufferung der Azidose vermindern. In der Studie von Wetterberg et al. [51] führte dieser Effekt zu einer reduzierten Mortalität bei der Pufferung der Azidose hyperkapnisch (FiCO<sub>2</sub> = 0,2) beatmeter Ferkel mit Na<sup>+</sup>-Bicarbonat. Jedoch wurden in diesem Versuch die Tiere mit einem FiO<sub>2</sub> von 0,15 beatmet und man muss davon ausgehen, dass sich unter hyperkapnischen Bedingungen eine Veränderung des PaO<sub>2</sub> durch die Hyperkapnie viel stärker auf die Sauerstoffsättigung auswirkte, als bei einer Beatmung mit FiO<sub>2</sub> = 1, wie es in der vorliegenden Studie der Fall war.

Der vor allem während der ersten Hälfte des Versuchszeitraumes signifikant höhere PaO<sub>2</sub> in der nicht gepufferten Gruppe (Abbildung 29) könnte sich durch eine Verschiebung der Perfusion in nicht-abhängige und somit besser belüftete Areale begründen lassen, was wiederum zu einer Optimierung des Ventilations-Perfusions-Quotienten führen würde. Im weiteren Verlauf des Experiments könnte eine geringgradigere Lungenschädigung eine Rolle gespielt haben.

#### **4.3.3.3 Herzzeitvolumenindex und Sauerstofftransport**

Eine ausgeprägte Hyperkapnie ist durch die Azidose mit einer Reduktion der myokardialen Kontraktilität aufgrund einer Störung der Interaktion zwischen Myofilamenten und Ca<sup>2+</sup> assoziiert [6].

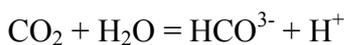
Der Herzzeitvolumenindex der beiden Gruppen unterscheidet sich nicht signifikant, steigt in beiden Gruppen zu Beginn des Experiments an und bleibt über die Dauer des Experiments weitgehend konstant (Abbildung 31). Das Konstantbleiben bzw. sogar initiale Ansteigen des HZVI in beiden Gruppen trotz Kontraktilitätsminderung lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine über verstärkte Katecholaminfreisetzung gesteigerte Herzfrequenz unter hyperkapnischen Bedingungen erklären.

Multipliziert man den Herzzeitvolumenindex mit der Sauerstoffkonzentration des Blutes, so erhält man den Sauerstofftransport des Blutes in ml/kg/min, der in der gepufferten Gruppe signifikant niedriger war (Abbildung 32). Dieser könnte zusammen mit einer reduzierten Organperfusion die erhöhte Laktatkonzentration in der gepufferten Gruppe verursacht haben.

### **4.3.4 metabolische Parameter**

#### **4.3.4.1 pH**

Der Blut-pH-Wert lag erwartungsgemäß in der gepufferten Gruppe mit 7,36 (7,32-7,39) im Normbereich und in der hyperkapnischen Gruppe im Median bei 7,08 (7,07-7,10) (Abbildung 33). Da das Atemminutenvolumen PaCO<sub>2</sub>-orientiert verändert wurde, war es möglich, das durch Pufferung mit Na<sup>+</sup>-Bicarbonat zusätzlich entstehende CO<sub>2</sub> im Sinne eines offenen Systems abzuatmen und das Gleichgewicht der Reaktion



durch Entzug des CO<sub>2</sub> durch Abatmung nach links zu verschieben und so eine Pufferung überhaupt möglich zu machen. Die Notwendigkeit der vermehrten Abatmung des CO<sub>2</sub> in der gepufferten Gruppe spiegelt sich in einem signifikant erhöhten Atemminutenvolumen dieser Gruppe wider [21].

#### **4.3.4.2 Laktat**

Laktat entsteht beim anaeroben Abbau von Kohlenhydraten und Fettsäuren in der Zelle und senkt durch die bei der Dissoziation bei Norm-pH-Wert entstehenden H<sup>+</sup> Protonen, wenn die Ausscheidungskapazität der Niere überschritten wird, den pH-Wert zuerst extrazellulär und später auch intrazellulär. Das Absinken des pH-Wertes reduziert jedoch im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die endogene Laktatproduktion durch Hemmung der Glykolyse [11]. Studien sowohl am Menschen [7] als auch an Tiermodellen

[29] zeigten, dass durch Gabe von  $\text{Na}^+$ -Bicarbonat eine bestehende Laktazidose durch Erhöhung der Netto-Laktatproduktion verstärkt wird. Ein ähnlicher Feedback-Suppressionsmechanismus scheint im Falle einer Ketoazidose eine Rolle zu spielen [20, 26].

Hood et al.[20] konnten bei fastenden Patienten durch  $\text{Na}^+$ -Bicarbonatgabe im Vergleich zur Kontrollgruppe, die dieselbe Menge isotone NaCl-Lösung erhalten hatte, eine zusätzlich gesteigerte Säureproduktion feststellen. Auch LaGrange et al. [26] konnten eine Supprimierung der Ketosäuren-Produktion bei Ratten mit chronischer Keto-Azidose nachweisen, da beim Abfall des Blut-pH-Wertes sowohl durch metabolische als auch durch respiratorische Veränderungen die Ketokörperproduktion gesenkt und bei einer Steigerung des pH-Wertes dagegen gesteigert wurde.

Abu Romeh et al. [1] führten Versuche an Ratten durch, bei denen sie die Versuchstiere einer hypoxiebedingten Laktazidose aussetzte. Sie stellten fest, dass die Laktatkonzentration durch Zufuhr von  $\text{CO}_2$  bis zu einem  $\text{PaCO}_2$  von 60 mmHg unter Hypoxie signifikant weniger anstieg als in der hypoxischen Kontrollgruppe, die normokapnisch beatmet wurden. Abu Romeh et al. erreichten nach dreistündiger Versuchsdauer bei den hyperkapnischen Tieren Laktatkonzentrationen von  $1,7 \pm 0,6$  mmol/l, in der Kontrollgruppe  $7,0 \pm 1,2$  mmol/l. In der vorliegenden Studie wurden in der gepufferten Gruppe nach sechs Stunden höhere Laktatkonzentrationen gefunden als bei den nicht gepufferten Tieren (Abbildung 34), die Werte, die Abu Romeh in ihrer Untersuchung bei rein hypoxischen Tieren erzielten, wurden jedoch nicht erreicht. Vermutlich waren in Abu Romeh et als Studie die hypoxischen Bedingungen ausschlaggebend für die höheren Laktatkonzentrationen. Andererseits könnte die signifikant höhere Laktatkonzentration in der gepufferten Gruppe als höhere Produktion infolge einer schlechteren Oxygenierung des Gewebes in dieser Gruppe im Vergleich zur nicht gepufferten Gruppe gedeutet werden.

Abu Romeh et al führten ihre Ergebnisse auf die pH-Abhängigkeit der Phosphofruktokinase zurück, da durch Diffusion des  $\text{CO}_2$  nach intrazellulär und durch daraus mittels Carbonanhydrase intrazellulär entstehendes  $\text{H}^+$  die Phosphofruktokinase gehemmt und somit die Laktatproduktion gemindert werden kann. In der vorliegenden Studie war der  $\text{PaCO}_2$  in beiden Gruppen zwar gleich, jedoch ist davon auszugehen, dass durch die Pufferung der hyperkapnischen Azidose mit  $\text{Na}^+$ -Bicarbonat der intrazelluläre pH-Wert in der gepufferten Gruppe höher ist und somit die Phosphofruktokinasehemmung weniger ausgeprägt ist.

#### 4.3.4.3 Basenüberschuss

Die erzielten Ergebnisse entsprachen den Erwartungen. Beim Menschen gilt für den Basenüberschuss ein Normalwert von  $\pm 3$  mmol/l, innerhalb dessen die meisten Versuchstiere beider Gruppe während der Baseline lagen (Abbildung 35).

Die metabolische Kompensation der hyperkapnischen Azidose durch die Bicarbonatpufferung war anhand des pH-Wertes zur Stunde 2 mit  $\text{pH} = 7,36$  (Median) vollständig erreicht. Der Basenüberschuss stieg in der gepufferten Gruppe vor allem durch die kontinuierliche Bicarbonatzufuhr weiter an.

#### 4.3.4.4 Glukose

Die Blutglukosewerte sind in der nicht gepufferten Gruppe tendenziell höher. Mögliche Ursachen könnten 1. eine höhere Sympathikusaktivierung [6], 2. eine pH-Abhängigkeit der Glukoneogenese und der Glykolyse und 3. eine uneinheitliche Glukosezufuhr sein.

Eine hyperkapnische Azidose steigert die Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennieremark, welche wiederum die Glukoneogenese in der Leber und die Glykogenolyse in Leber und Muskel steigern. Die Phosphofruktokinase, welche ein wichtiges Enzym der Glykolyse darstellt, wird durch eine azidotische Stoffwechsellage gehemmt. In beiden Gruppen wurde ähnlich viel Glucose zugeführt ( $P = 0,909$ ).

Somit lassen sich die tendenziell höheren Glukosewerte in der nicht gepufferten Gruppe durch die unter 1. und 2. aufgeführten Zusammenhänge erklären.

#### 4.3.5 Elektrolyte

Im Laufe des Experimentes steigt die  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Blut der gepufferten Gruppe auffällig stark an. Die  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der gepufferten Gruppe wurde maßgeblich durch die Gabe von Natrium-Bicarbonat beeinflusst.

Die Erhöhung der  $\text{K}^+$ -Konzentration ist durch die Azidose erklärbar, die zur Freisetzung von  $\text{K}^+$ -Ionen von intra- nach extrazellulär führt.

Die signifikant höheren Konzentrationen des ionisierten Kalziums in der nicht-gepufferten Gruppe waren zu erwarten, da die Bindungskapazität des Albumins bei niedrigem pH-Wert sinkt und somit die Konzentration des freien ionisierten Kalziums steigt.

### 4.3.6 Broncho-alveoläre Lavage

Die broncho-alveoläre Lavage diente zu Beginn des Experimentes zur Schädigung der Lunge und auch als Referenz zur BAL am Versuchsende zu analytischen Zwecken.

Eine Zellzählung mit Flowzytometrie wäre die Methode der Wahl zur Bestimmung der Anzahl inflammatorischer Zellen in den Alveolen gewesen. Diese Technik stand leider organisatorischen Gründen nicht zur Verfügung. Des weiteren war der Rückfluss von Lavageflüssigkeit individuell unterschiedlich, was die Analyse der Gesamtzahl inflammatorischer Zellen zusätzlich erschwert. Aus diesen Gründen wurde nur der relative Anteil der Zellen in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Der Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der BAL zeigte signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Migration von neutrophilen Granulozyten in das pulmonale Gewebe ist ein entscheidender Aspekt in der Pathophysiologie der Lungenschädigung durch mechanische Beatmung unter Surfactantmangel.

Daher deuten die Ergebnisse der BAL auf einen ausgeprägteren Lungenschaden durch Pufferung der hyperkapnischen Azidose hin, wobei bei der Beurteilung der Ergebnisse wichtig ist, dass auch eine rein hyperkapnische Beatmung mit  $V_t = 5$  ml/kg KG ohne zusätzliche Schädigung der Lunge durch Ischämie oder BAL schon zu einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten in den Alveolen führt [3].

Lang et al. [28] konnten an Alveolarepithelzellen fetaler Ratten schädigende Effekte einer Hyperkapnie zeigen. In dieser Studie wurde durch Exposition mit 15% CO<sub>2</sub> ein hyperkapnisches extrazelluläres Milieu bei nahezu normalem pH-Wert (7,28) erzeugt und mit Hilfe von Zytokinen und Lipopolysacchariden eine inflammatorische Reaktion ausgelöst. Unter diesen Bedingungen wiesen Lang et al. eine signifikant höhere NO-Produktion und Konzentration von nitrierenden Substanzen nach, welche sich bei einer längerfristigen Anwendung einer permissiven Hyperkapnie negativ auf den Lungenschaden auswirken könnte. Unter hyperkapnischen Bedingungen im Vergleich zur Normokapnie war weiterhin auch die Barrierefunktion der Epithelzellschicht, gemessen anhand der Albuminpermeabilität, geschädigt und die Apoptoserate der Epithelzellen gesteigert. Diese Studie weist also eher auf die tendenziell schädlichen Effekte der Hyperkapnie hin.

Serrano et al. [41] untersuchten den Einfluss einer hyperkapnischen Azidose auf die CD 18 Expression menschlicher neutrophiler Granulozyten und auf das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) an Endothelzellen und das Endothelial leuykocyte adhesion molecule-1 (E-Selectin). Dabei

wurde eine Steigerung der Expression von CD18 auf der Neutrophilen-Oberfläche unter hyperkapnischen Bedingungen (20% CO<sub>2</sub>) festgestellt, die innerhalb von 30 min wieder reversibel war. Bei der Expression der beiden anderen Adhäsionsmoleküle wurden keine pH-Abhängigkeit festgestellt. Diese Ergebnisse würden die These unterstützen, dass die hyperkapnische Azidose über CD-18 eine Steigerung der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und damit einen vermehrten Gefäßschaden und dadurch eine vermehrte Lungenschädigung verursachen könnte. In unserer Studie wurde unter Azidose eine höhere Konzentration von Granulozyten in der BAL gefunden, was in gewissem Widerspruch zu den Daten von Serrano et al. steht. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die CD-18 Expression erst bei höheren CO<sub>2</sub>-Konzentrationen eine Rolle spielt, oder dass andere Mechanismen der Lungenprotektion überwogen.

Andererseits gibt es Hinweise dafür, dass die hyperkapnische Azidose über eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF-κB die Ausprägung eines Lungenschadens reduzieren kann. So wurden in einer experimentelle Studie von Takeshita et al. festgestellt, dass die durch Lipopolysaccharide (LPS) vermittelte Signalkaskade in Gefäßendothelien durch Inhibition der LPS induzierten Degradation des inhibitorischen Proteins κB (IκB), welche wiederum zu einer erhöhten NF-κB Aktivierung führt, letztlich die NF-κB-Expression reduziert. Dieses führt über eine verminderte mRNA-Proteinkonzentration von ICAM-1 und Il-8 zu einer reduzierten Inflammationsreaktion [46]. Der durch die Autoren gefundene reduzierte Effekt einer gepufferten hyperkapnischen Azidose passt wiederum zu den Ergebnissen unserer Studie, so dass die PaCO<sub>2</sub>- und pH-abhängige Beeinflussung der NF-κB Signalkaskade ein oder vielleicht der entscheidenden Faktor zur Erklärung der Ergebnisse unserer Studie bzw. der Studie an isolierten Lungenpräparaten von Laffey et al. sein könnte.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Es konnte gezeigt werden, dass unter Pufferung einer hyperkapnischen Azidose sowohl die pulmonale Reaktion, als auch der Grad der Lungenschädigung ausgeprägter sind. Damit wurde erstmals in vivo gezeigt, dass die lungenprotektiven Effekte einer hyperkapnisch-hypoventilatorische Beatmung durch Pufferung der hyperkapnischen Azidose reduziert werden. Diese Ergebnisse stellen damit eine gängige klinische Praxis, nämlich die Pufferung zur Vermeidung eines Abfalls des pH-Wertes bei der klinischen Anwendung der permissiven Hyperkapnie, in Frage.

## 5. Zusammenfassung

Das RDS (respiratory distress syndrome) bei Frühgeborenen und das ARDS (acute respiratory distress syndrome) bei älteren Kindern oder Erwachsenen sind mit einer signifikanten Mortalität und Morbidität assoziiert und erfordert häufig eine mechanische Beatmung. Das Konzept der permissiven Hyperkapnie reduziert den beatmungsassoziierten Lungenschaden, geht jedoch mit einer respiratorischen Azidose einher, die im klinischen Alltag häufig mit Natrium-Bicarbonat gepuffert wird. Basierend auf in vitro Untersuchungen wurde die Hypothese untersucht, dass der Grad der Lungenschädigung, gemessen am Feucht-/Trockengewicht der Lunge unter gepufferter hyperkapnischer Azidose (physiologischer pH-Wert) um mindestens 25% höher ist als unter nicht korrigierter hyperkapnischer Azidose.

28 Kaninchen wurde mittels broncho-alveolärer Lavage (BAL) surfactant-depletiert und mit einem  $V_t$  (Tidalvolumen) = 4-5 ml/kg KG beatmet. Der Ziel- $\text{CO}_2$ -Partialdruck betrug 75-85 mmHg. Die Tiere wurden in eine Puffer- und eine Kontrollgruppe randomisiert. Man beobachtete die Tiere über einen Zeitraum von 6 Stunden und untersuchte sie auf Veränderungen des Gasaustausches, der zellulären Blutbestandteile, des Interleukin-8 als Entzündungsmediator, der Proteinmenge und Elektrolytverhältnisse im Serum sowie auf Anzeichen einer Gewebshypoxie. Nach der Tötung der Tiere am Ende des Behandlungszeitraumes wurden zusätzliche Proteinbestimmungen, makroskopische und histologische Untersuchungen des Lungengewebes, sowie die Untersuchung der zellulären Bestandteile, der Protein- und Interleukin-8-Konzentration einer broncho-alveolären Lavage durchgeführt. Schließlich wurde bei jeweils einer Lunge der Kaninchen das Feucht-/Trockengewicht ermittelt.

Das Feucht-/Trockengewicht der rechten Lunge als Marker der Lungenschädigung und primäres Zielkriterium betrug in der gepufferten Gruppe  $11,6 \pm 3,8$ , in der nicht-gepufferten Gruppe  $8,8 \pm 3,5$  und lag in der gepufferten Gruppe somit 32% ( $P = 0,049$ ) höher als in der nicht gepufferten Gruppe.

Proteinverschiebungen vom Serum in die BAL-Flüssigkeit mit signifikant niedrigeren Serumproteinquotienten ( $P = 0,042$ ) und einem Trend zu höheren BAL-Proteinquotienten ( $P = 0,063$ ) waren in der gepufferten Gruppe zu verzeichnen.

Interleukin-8 wurde sowohl im Serum, in der BAL-Flüssigkeit, als auch im Lungengewebe durch Pufferung der Azidose nicht signifikant beeinflusst. Makroskopisch fiel eine schlechtere Belüftung, ( $P = 0,032$ ) und Verstärkung der Einblutungen ( $P = 0,003$ ) durch

Pufferung auf. Auch histologisch gibt es Hinweise für eine Verstärkung der Lungenschädigung durch Pufferung der permissiven Hyperkapnie.

Entsprechend einer kontinuierlichen Verdünnung fielen Thrombozyten und Hämatokrit in beiden Gruppen gleich stetig ab und auch bei den Gasaustauschparametern (arterieller Sauerstoffpartialdruck, arterielle Sauerstoffsättigung und arterieller Kohlendioxidpartialdruck) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Es fiel jedoch auf, dass bei unbeeinflussbarer Hämodynamik der Sauerstofftransport in der nicht gepufferten Gruppe besser und die Laktatkonzentration signifikant niedriger war ( $P = 0,002$  bzw.  $P = 0,035$ ).

Die Glukosekonzentration wird durch die Azidose beeinflusst und zeigt einen Trend in Richtung höhere Blutglukosewerte in der nicht gepufferten Gruppe ( $P = 0,059$ ).

Entsprechend der herbeigeführten Veränderung des pH-Wertes kam es zu erwarteten Verschiebungen der Konzentrationen von  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$ , die jedoch allesamt nicht bedenklich waren.

Untersuchungen der relativen Zellverteilung in der Flüssigkeit der End-BAL ergaben einen signifikant höheren Anteil der neutrophilen Granulozyten in der gepufferten Gruppe ( $P = 0,047$ ), was wiederum für einen vermehrten Lungenschaden spricht.

Betrachtet man die Interleukin-8 Konzentrationen im Gewebe, die Ergebnisse der interstitiellen und alveolären Inflammation und die Zellverteilung in der BAL, so finden sich alle diese inflammatorischen Parameter zwar nicht signifikant aber dennoch erhöht in der gepufferten Gruppe.

Mit der vorliegenden Studie wurde erstmals die Auswirkungen der Pufferung der hyperkapnischen Azidose beim surfactant-depletierten Versuchstier auf systemische Inflammation und Lungenparenchym in vivo untersucht und gezeigt, dass die lungenprotektiven Effekte einer hyperkapnisch-hypoventilatorischen Beatmung durch Pufferung der hyperkapnischen Azidose reduziert werden. Die Ergebnisse dieser Studie stellen eine gängige medizinische Praxis in Frage. Wie lange und in welcher Ausprägung eine hyperkapnische Azidose jedoch vom Organismus toleriert wird, wann die negativen Effekte überwiegen und ob die pH-Neutralisierung mit einem anderen Puffer ähnliche Auswirkungen hat, sollte Anlass zu weiteren Untersuchungen sein.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abu Romeh S, Tannen R: Amelioration of hypoxia-induced lactic acidosis by superimposed hypercapnea or hydrochloric acid infusion. *Am J Physiol* 250: F702-F709 (1986)
2. Amato M, Barbas C, Medeiros D, Magald R, Schettino G, Lorenzi-Filho G, Kairalla R, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki T, Carvalho C: Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 338: 347-354 (1998)
3. Billert H, Drobnik L, Makowski A: The Influence of acute hypercapnia on the quantity and oxidative metabolism of bronchoalveolar lavage-derived leukocytes in the mechanically ventilated rabbit. *Med Sci Monit* 9(1): 8-15 (2003)
4. Domenici-Lombardo L, Adembri C, Consalvo M, Forzini R, Meucci M, Romagnoli P, Novelli G: Evolution of endotoxin induced acute lung injury in the rat. *Int J Exp Pathol* 76(5): 381-390 (1995)
5. Dreyfuss D, Saumon G: Ventilator-induced lung injury. In: Tobin M (Hrsg) *Principles and Practice of Mechanical Ventilation*, New York, S. 793-811 (1994)
6. Feihl F, Perret C: Permissive Hypercapnia-How permissive should we be. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 1722-1737 (1994)
7. Fraley D, Adler S, Bruns FJ, Zett B: Stimulation of lactate production by administration of bicarbonate in a patient with a solid neoplasm and lactic acidosis. *N Engl J Med* 303: 1100-1102 (1980)
8. Fu Z, Costello M, Tsukimoto K: High lung volume increases stress failure in pulmonary capillaries. *J Appl Physiol* 73: 123-133 (1992)
9. Fuchimukai T: Artificial pulmonary surfactant inhibition by proteins. *J Appl Physiol* 62: 429-437 (1987)
10. Gammon R, Shin M, Jr.Groves R, Hardin J, Hsu C, Buchalter S: Clinical risk factors for pulmonary barotrauma: a multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1235-1240 (1995)
11. Gewers W, Dowdle E: The effect of pH on glycolysis in vitro. *Clin Sci* 25: 343-349 (1963)
12. Goldsmith DJ, Forni LG, Hilton P: Bicarbonate therapie and intracellular acidosis. *Clin Sci* 93: 593-598 (1997)
13. Goodman R, Strieter R, Martin D, Steinberg K, Milberg J, Maunder R, Kunkel S, Walz A, Hudson L, Martin T: Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 602-611 (1996)
14. Hickling K: Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Intens Care Med* (1990)
15. Hickling K: Lung-protective ventilation in Acute Respiratoy Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2021-2022 (2000)
16. Hickling K, Joyce C: Permissive hypercapnia in ARDS and it's effect on tissue oxygenation. *Acta Anaesthesiol Scand* 39: 201-208 (1995)
17. Hickling K, Town I, Epton M, Neill A, Tie A, Whitehead M, Graham P, Everest E, A'Court G, Darlow B, Laubscher K: Pressure limited ventilation with permissive hypercapnia and minimum PEEP in saline-lavaged rabbits allows progressive improvement in oxygenation, but does not avoid ventilator-induced lung injury. *Intens Care Med* 22: 1445-1452 (1996)

18. Hickling K, Walsh J, Henderson S, Jackson R: Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low-volume, pressure-limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study. *Crit Care Med* 22: 1568-1578 (1994)
19. Hirani N, Antonicelli F, Strieter R, Wiesener M, Ratcliffe P, Haslett C, Donnelly S: The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages-a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Mol Med* 7(10): 685-697 (2001)
20. Hood V, Tannen R: Protection of Acid-Base Balance by pH Regulation of Acid Production. *N Engl J Med* 339: 819-826 (1998)
21. Hummler HD, Häring S, Engelmann A: (Publikation in Vorbereitung)
22. Hummler HD, Quinzler K, Franz AR, Pohlandt F, Wolfson M, Ebson M, Engelmann A: Effects of Lung Protective Mechanical Ventilation and/or Hypercapnic Acidosis on Gas Exchange and Lung injury in Surfactant Deficient Rabbits. *Pediatric Research* 53: 463A (2003)
23. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, Bryan A: Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 62: 27-33 (1987)
24. Laffey J: Buffering Hypercapnic Acidosis Worsens Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 141-146 (2000)
25. Laffey J, Tanaka M, Engelberts D, Luo X, Yuan S, Tanswell K, Post M, Lindsay T, Kavanagh B: Therapeutic hypercapnia reduces pulmonary and systemic injury following in vivo lung reperfusion. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2287-2294 (2000)
26. LaGrange B, Hood V: Ketoacid production in acute respiratory and metabolic acidosis and alkalosis in rats. *Am J Physiol* 256: F437-F445 (1989)
27. Landow L, Visner M: Does NaHCO<sub>3</sub> exacerbate myocardial acidosis? *J Crit Care* 7: 340-350 (1993)
28. Lang JDJ, Chumley P, Eiserich JP, Estevez A, Bamberg T, Adhami A, Crow J, Freeman BA: Hypercapnia induces injury to alveolar epithel cells via nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L994-L1002 (2000)
29. Leach WJ, Arieff A: Sytemic effects of bicarbonate in experimental lactic acidosis in diabetic rabbits. *Clin Res* 29: 411 A (1981)
30. Mariani G, Cifuentes J, Carlo W: Randomized trial of permissive hypercapnia in preterm infants. *Pediatrics* 104: 1082-1088 (1999)
31. Meduri G, Kohler G, Tolley SHE, Stentz F, Postlethwaite A: Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 108: 1303-1314 (1995)
32. Menitove S, Goldring R: Combined ventilator and bicarbonate strategy in the management of status asthmaticus. *Am J Med* 74: 898-901 (1983)
33. Moore TM, Khimenko PL, Taylor AE: Restoration of normal pH triggers ischemia-reperfusion injury by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange activation. *Heart Circ Physiol* 38: (1995)
34. Network ARDS: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1301-1308 (2000)
35. Nomura F, Aoki M, Forbess J, Mayer J: Effects of hypercarbic acidotic reperfusion on recovery of myocardial function after cardioplegic ischemia in neonatal lambs. *Circulation* 90: 321-327 (1994)
36. Parker JC, Townsley MI, Rippe B, Taylor AE, Thigpen J: Increased microvascular permeability in dog lungs due to high airway pressures. *J Appl Physiol* 57: 1809-1816 (1984)

37. Rabinovitch M, DeStefano M, Dziezanowski M: Neutrophil migration under agarose: Stimulation by lowered medium pH and osmolarity. *Res J Reticuloendothel Soc* 27: 189-200 (1980)
38. Rai S, Engelberts D, Laffey J, Frevert C, Kajikawa O, Martin T, Post M, Kavanagh B: Therapeutic Hypercapnia Is Not Protective in the in vivo Surfactant-Depleted Rabbit Lung. *Pediatric Research* 55: 42-49 (2004)
39. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, Tullio RD, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS: Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 282: 54-61 (1999)
40. Rinaldo J, Christman J: Mechanism and Mediators of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 11: 621-632 (1990)
41. Serrano C, A Fraticelli, R Pannicia, A Teti, B N, Corda S, Faraggiana T, Ziegelstein R, Zweier J, M C: pH dependence of neutrophil-endothelial cell adhesion and adhesion molecule expression. *Am J Physiol* 271: C962-C970 (1996)
42. Shibata K, Cregg N, Engelberts D, Takeuchi A, Fedorko L, Kavanagh B: Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1578-1584 (1998)
43. Sinclair S, Kreggenow D, Lamm J, Starr I, Chi E, Hlastala M: Hypercapnic acidosis is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Care Med* 166: 403-408 (2002)
44. Strand M, Ikegami M, Jobe A: Effects of PCO<sub>2</sub> on Ventilated Preterm Lamb Lung. *Pediatric Research* 53: 468-472 (2003)
45. Taeusch, Ballard, Avery: Hyaline Membrane Disease. In: Schaffer, Avery (Hrsg) *Diseases of the newborn*, WB Saunders, Philadelphia, S. 498-504 (1991)
46. Takeshita K, Suzuki Y, Nishio K, Takeuchi O, Toda K, Kudo H, Miyao N, Ishii M, Sato N, Naoki K, Aoki T, Suzuki K, Hiraoka R, Yamaguchi K: Hypercapnic Acidosis Attenuates Endotoxin-Induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 124-132 (2003)
47. Tsuno K, Mitura K, Takey M, Kolobow T, Morioka T: Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *Am Rev Respir Dis* 143: 1115-1120 (1991)
48. Vannucci R, Towfighi J, Heitjan D, Brucklacher R: Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics* 95: 868-874 (1995)
49. Vlahakis N, Schroeder M, Limper A, Hubmayr R: Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 277: L167-173 (1999)
50. Walley K, Lewis T, Wood L: Acute Respiratory Acidosis Decreases Left Ventricular Contractility but Increases Cardiac Output in Dogs. *Circulation Research* 67: 628-635 (1990)
51. Wetterberg T, Sjoberg T, Steen S: Effects of buffering in hypercapnia and hypercapnic hypoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 37: 343-349 (1993)
52. Worthen G, Haslett C, Rees A, Gumbay R, Henson J, Henson P: Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *Am Rev Respir Dis* 136: 19-28 (1987)

## 7. Danksagung

PD Dr. med. Helmut Hummler möchte ich für die intensive Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Promotionsarbeit danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. med. Anja Engelmann, die vor allem bei der Durchführung der Tierexperimente mitwirkte.

Ohne die Unterstützung durch alle Mitarbeiter des Tierforschungsinstituts Oberberghof wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich den Bereichslaboren der Kliniken Michelsberg und Safranberg für die Unterstützung bei den laborchemischen Analysen, sowie der onkologischen Forschungsgruppe der Frauenklinik des Universitätsklinikums Ulm für das Zurverfügungstellen ihrer Räumlichkeiten und ihrer labortechnischen Geräte.

Abschließend möchte ich Marla Wolfson für die Interleukinbestimmungen, Dr. med. A. Franz für die makroskopischen und Dr. med. M. Ebsen für die mikroskopische Beurteilung der Lungenpräparate danken.