

Aus der Klinischen und Experimentellen Pathologie
Forschungszentrum Borstel
Leiter: Prof. Dr. Dr. E. Vollmer

**Auswirkungen des Kardiopulmonalen Bypass unter
Modulation der Pulmonalisperfusion am Lungengewebe
Göttinger Minischweine
Untersuchung der Interleukin 8 Genexpression und der
histologischen Veränderungen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- **Aus der Medizinischen Fakultät** -

vorgelegt von

Joachim Mosel

aus Celle

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Ekkehard Vollmer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Alfred Christian Feller

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.11.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	
2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung	8
2.2 Operationsvorbereitung	8
2.3 Herz-Lungenmaschine	9
2.4 Operationsverlauf und extrakorporale Zirkulation	9
2.5 Materialentnahme	11
2.6 Materialauswertung	12
2.7 Multiplex-PCR	12
2.8 RNA-Isolierung	12
2.9 C-DNA-Herstellung	13
2.10 Primer-Design	13
2.11 Beladung der PCR-Maschine	14
2.12 Bestimmung der Annealing-Temperatur und Zyklenzahl	15
2.13 PCR-Produkt-Gelelektrophorese	17
2.14 Auswertung der Gelelektrophoresebilder	19
2.15 Statistik	23
2.16 Histologie	24
3. Ergebnisse hinsichtlich PCR und Histologie	
3.1 IL8 im zeitlichen Verlauf und im Gruppenvergleich	25
3.2 Histologie im Gruppen- und Zeitvergleich	32
4. Diskussion	
4.1 IL8	36
4.2 Histologie	38
4.3 Beantwortung der Fragestellung	40

5. Zusammenfassung	42
6. Literaturverzeichnis	44
7. Abkürzungsverzeichnis	53
8. Danksagung	54
9. Lebenslauf	55

1. Einleitung

Um Operationen am offenen Herzen durchführen zu können, ist es oftmals notwendig, das Herz zum Stillstand zu bringen. Routinemäßig realisierbar geworden sind solche Operationen 1953 mit der Entwicklung des Kardiopulmonalen Bypasses (KPB) unter Einsatz der Herz-Lungenmaschine (HLM) (Gibbon 1954). Hierbei wird das venöse Blut des Patienten vor dem Herzen entnommen und außerhalb des Körpers mit Sauerstoff angereichert. Direkt hinter der linken Herzkammer wird das oxygenierte Blut wieder in die Aorta eingeleitet. Für die Aufrechterhaltung des Blutflusses sorgt dabei eine mechanische Pumpe.

Der KPB ermöglicht die chirurgische Therapie vieler Erkrankungen am Herzen, kann aber auch zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Lungenfunktionsstörungen sind ein häufiges Problem nach Operationen am Herzen unter Verwendung des KPB. Sie äußern sich unter anderem durch eine Erhöhung des alveolär-arteriellen Sauerstoffgradienten, der Eröffnung intrapulmonaler Shunts, der Ausbildung eines Lungenödems, Verringerung der elastischen Rückstellkräfte der Lunge und Erhöhung des Gefäßwiderstandes im Lungengefäßbett (Gott et al. 1998). Diese Veränderungen können klinisch unauffällig sein, sind aber regelmäßig nachweisbar (MacNaughton et al. 1992). In etwa 1% der Fälle kommt es zur Ausbildung eines Adult-Respiratory-Distress-Syndroms (ARDS), welches mit einer hohen Mortalitätsrate von bis zu 90% behaftet ist. (Fowler et al. 1983, Asimakopoulos et al. 1999 a und b, Messent et al. 1992, Christenson et al. 1996).

Das ARDS ist gekennzeichnet durch einen fortschreitenden Entzündungsprozess in der Lunge mit Zerstörung des Lungengewebes. Viele verschiedene Auslöser, die zu einem ARDS führen können, sind bekannt. Hierzu zählen unter anderem Sepsis, schwere Traumata, Lungenkontusionen, Rauchgasinhalationen und auch Operationen unter Verwendung des KPB, wie oben beschrieben (Demling 1995).

Auf welchem Wege der KPB zu diesen Lungenschädigungen führt ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Es ist bekannt, dass es durch den KPB zu einer Freisetzung verschiedener Substanzen wie Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Aldosteron, Vasopressin, Bradykinin, Prostaglandinen, Leukotrienen, Endotoxin und den Komplementkomponenten C3a, C4a und C5a kommt (Howard et al. 1988, Wan et al. 1997 b, Downing et al. 1992). Es folgt eine Aktivierung von Leukozyten mit der weiteren Freisetzung von freien Radikalen (Prasad et al. 1992, Davies et al. 1994, Larson et al. 1996), Stickstoffmonoxid (Ruvolo et al. 1994), Endothelin (Zhu et al. 1994), Plättchen aktivierendem Faktor (Zehr et al. 1995) und Arachidonsäuremetaboliten (Cave et al. 1993). So entsteht eine systemische Entzündungsreaktion, die alle Organsysteme, also auch die Lunge des Patienten, schädigen kann.

Mögliche Ursachen hierfür können das chirurgische Trauma oder auch der Kontakt des Blutes mit den unphysiologischen Oberflächen im Schlauchsystem der HLM sein (Butler et al. 1993, Westaby 1987).

Ein weiteres Problem ergibt sich aus dem Aufbau des KPB:

Während des KPB fließt kein Blut durch die Pulmonalarterien. Die Lunge wird zu dieser Zeit lediglich über die Bronchialarterien mit oxygeniertem Blut versorgt. Hieraus resultiert eine Ischämie im Bereich der Lungenstrombahn. Wird zum Ende des Bypasses die Lungenstrombahn wieder perfundiert, so stellt diese Reperfusion eine wichtige proinflammatorische Noxe dar (Wan et al. 1997 a).

Interleukine sind Zellbotenstoffe, die unter anderem von Leukozyten freigesetzt werden können. Sie sind Botenstoffe, die in Immunreaktionen eine wichtige Rolle spielen.

Der Begriff Interleukin 8 (IL8) wurde erstmals 1989 von Marco Baggiolini eingeführt (Baggiolini et al. 1989). IL8 ist ein Zytokin, welches vor allem an neutrophilen Granulozyten durch Veränderungen am Zytoskelett Chemotaxis und durch Präsentation von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche Migration sowie Ausstoßung

der Granula und den sogenannten Oxidativen Burst bewirkt (Huber et al. 1991, Sham et al. 1993, Rajarathnam et al. 1994, Baggiolini et al. 1997, Drost et al. 2002). So führt es bei entzündlichen Prozessen zu einer Ansammlung von neutrophilen Granulozyten und deren Auswanderung ins Gewebe. In einer Studie von Kawamura und Mitarbeitern an 11 Patienten, die Herzchirurgische Eingriffe unter Verwendung des KPB erhielten, konnte im peripheren Blut ein Anstieg der IL8 Konzentration 60 Minuten nach dem Lösen der Aortenklemme festgestellt werden. Die IL8 Konzentration korrelierte zusätzlich positiv mit der Aktivität neutrophiler Granulozyten, gemessen am Elastaseanstieg im Blut (Kawamura et al. 1993). In einer Untersuchung an 29 Patienten mit dem Risiko, ein ARDS zu entwickeln, fanden Donnelly und Mitarbeiter einen positiven Zusammenhang zwischen der tatsächlichen Entwicklung eines ARDS und der IL8 Konzentration in Bronchioalveolärer Lavageflüssigkeit. Als Quelle für die IL8 Erhöhung identifizierten sie Alveolarmakrophagen (Donnelly et al. 1993). Ähnliche Ergebnisse erhielt H. Takatsuka, der bei 5 ARDS- Patienten IL8 im peripheren Blut nachwies (Takatsuka et al. 2002). Goodman und Mitarbeiter verglichen die IL-8 Konzentration im Plasma von Patienten im frühen Stadium eines posttraumatischen ARDS mit dem Plasma von gesunden Freiwilligen. Dabei fanden sie, dass die Plasmakonzentration an IL-8 in der Entstehungsphase eines ARDS deutlich ansteigt (Goodman et al. 1998).

Zusammenfassend ist IL8 ein wichtiger Marker für ein akutes Entzündungsgeschehen; zusätzlich erwies sich die Konzentration in Bronchioalveolärer Lavageflüssigkeit als ein prognostischer Faktor für die Schwere der zu erwartenden Komplikationen (Kotani et al. 2000 b). Die folgende Arbeit konzentriert sich auf den oben erwähnten Ischämie-Reperfusionsschaden der Lunge. In einem Gemeinschaftsprojekt mit der Herzchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Lübeck sollte im Tiermodell an Göttinger Minischweinen untersucht werden, ob sich durch die zusätzliche Perfusion der Pulmonalisstrombahn während des

Kardiopulmonalen Bypasses ein Schutzeffekt für die Lunge nachweisen lässt.

Aus den oben genannten Überlegungen betrachtet diese Arbeit die Expression von IL8 im Lungengewebe als potentiellen Marker für ein akutes Entzündungsgeschehen. Zusätzlich wurde an histologischen Präparaten im Lungengewebe nach pathologischen Veränderungen als Korrelat zu einer Lungenschädigung gesucht.

Es ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Kommt es im Verlauf beim KPB zu einem Anstieg der IL8-Expression im Lungengewebe?
2. Lässt sich die IL8- Expression im Lungengewebe durch Modulation der Pulmonalisperfusion während des KPB verändern?
3. Lassen sich nach KPB histologische Veränderungen im Lungengewebe nachweisen?
4. Gibt es Unterschiede im histologischen Bild des Lungengewebes nach KPB bei Modulation der Pulmonalisperfusion?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Als Versuchstiere wurden 20 Göttinger Minischweine mit einem Gewicht zwischen 14 und 41kg ausgesucht. Bis zum Versuchstag wurden die Schweine im Tierstall der Universität zu Lübeck nach den geltenden Tierschutzrichtlinien gehalten. Die Versuche wurden beim Sozialministerium des Landes Schleswig Holstein unter der Aktennummer X330a-72241.122-6 beantragt und genehmigt.

Jedes Tier wurde prospektiv randomisiert einer von drei Versuchsgruppen zugeteilt. Gruppe 1 (n=6 Tiere) war dabei die Kontrollgruppe, in der ein totaler KPB durchgeführt wurde. In der Gruppe 2 (n=7 Tiere) erfolgte während des Bypasses zweimalig, in der Gruppe 3 (n=7 Tiere) kontinuierlich die Perfusion der Pulmonalarterien mit gekühltem, oxygeniertem Blut.

2.2 Operationsvorbereitung

Die Prämedikation erfolgte durch eine intramuskuläre Injektion, bestehend aus 20mg/kg KG Ketamin (Ketanest[®]), 2mg/kg KG Xylazine (Rompun Vet[®]) und 0, 5mg/kg KG Atropinsulfat. Sobald die Tiere auf Berührungsreize nicht mehr reagierten, wurden sie auf den Operationstisch gelegt und in Rückenlage mittels elastischer Binden fixiert. Eine Ohrvene wurde kanüliert und die Narkose durch 5mg/kg KG Propofol (Disoprivan[®]) eingeleitet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose bekamen die Tiere in 10 Minuten 0,2mg/kg KG Propofol. Nach der Narkoseeinleitung wurde tracheostomiert und intubiert. Die Beatmung erfolgte mit einem Narkosespiromat Sulla (Draeger, Lübeck) und wurde mit einem positiven endexpiratorischen Druck

(PEEP) durchgeführt. Das Atemzugvolumen betrug 5-7ml/kg KG, die Beatmungsfrequenz 12-15 mal /min.

2.3 Herz- Lungenmaschine (HLM)

Der extrakorporale Kreislauf bestand aus einem handelsüblichen, nicht- heparinisiertem Schlauchsystem (Dedeco 702[®], HMT Medizintechnik GmbH, Fürstenfeldbruck) und einem Membranoxygenator mit variablen Füllvolumen (Cobe VPCML+[®], Cobe, Planegg- Martinsried). Das Vorfüllvolumen des extrakorporalen Kreislaufs setzte sich aus 1000 ml Blut von Hausschweinen, heparinisiert mit 5000 I.E. Heparin (Liquemin[®], Hoffmann laRoche, Grenzach-Whylen), und 500 ml Ringer Lactat Lösung (Ringerlösung) zusammen. Für die Aufrechterhaltung des Blutflusses sorgten nicht-pulsatile Rollerpumpen (S3[™] und CAPS[™], Stöckert, München).

2.4 Operationsverlauf und extrakorporale Zirkulation

Nach Eröffnung des Brustkorbes durch mediane Sternotomie erhielten die Tiere zur Vollheparinisierung 300 I.E. unfraktioniertes Heparin. Um eine Activated-clotting-time (ACT) \geq 400 Sekunden zu erreichen und aufrecht zu erhalten, erfolgten halbstündliche Messungen der ACT mit einem ACT1[™] Gerät (Medtronic Hemotec[®] vertrieben durch Cardiotron[®], Halle) . Nach den ACT- Messungen wurden geeignete Bolusmengen Heparin verabreicht. Anschließend ließ sich das Herz vom Perikard freilegen und die großen Gefäße darstellen. In den Übergang der aufsteigenden Aorta in den Aortenbogen wurde eine 16 French große Kanüle (Jostra, Hirlingen) gelegt und eine zweite Kanüle in den rechten Vorhof (Cava Körbchen). In den linken Vorhof wurde

ein Linksventrikatheter eingelegt um zu verhindern, daß der linke Ventrikel während des Bypasses in der Versuchsgruppe 1 durch den Kollateralfuß und in den Versuchsgruppen 2 und 3 durch den pulmonalen Blutfluß überdehnt wurde. Zusätzlich erfolgte in den Versuchsgruppen 2 und 3 die Plazierung einer 12 French großen Kanüle (Jostra, Hirlingen) in die Arteria pulmonalis .

Mit dem Beginn des Bypasses wurde die Aorta abgeklemmt. Zweimal lief während der Bypasszeit in die Aortenwurzel vor der Klemmung jeweils etwa 200ml auf Eis gekühlte kardioplege Lösung (St Thomas-Lösung) ein, um das Herz zum Stillstand zu bringen und einen Schaden des Herzmuskels durch die Ischämie zu vermeiden. Die totale Bypasszeit bestand aus der Zeit, während der die Aorta geklemmt war. Sie betrug bei allen Tieren 1 Stunde. Die extrakorporale Zirkulation erfolgte in moderater Perfusionshypothermie bei 32°C. Die Flußrate der HLM wurde auf etwa 2,4l/m² Körperoberfläche oder 40- 60ml/ kg KG festgelegt. Der Blutdruck lag dabei zwischen 60 und 80 mmHg.

In den Gruppen 2 und 3 wurde zusätzlich das Lungengefäßsystem mit 1/3 des Herzzeitvolumens auf 15°C gekühltem Blut durchflossen. In Gruppe 2 fand dieses 2 Mal für 10 Minuten statt, in der Gruppe 3 war die Lunge während der gesamten Bypasszeit durchblutet. Der Lungenperforationsdruck war dabei ≤20 mmHg, der pO₂ des Perfusates lag zwischen 100 und 150 mmHg. 10 Minuten vor Beendigung des Bypasses begann die Wiedererwärmung der Tiere, so daß zum Abgangzeitpunkt von der HLM die Körperkerntemperatur wieder bei etwa 36°C lag.

Nach der Lösung der Aortenklemme wurde das Herz defibrilliert und so wieder zum Schlagen gebracht. Die Pumpleistung der HLM wurde reduziert, bis das Herz wieder völlig die Pumpfunktion für den Kreislauf übernommen hatte. Zur Antagonisierung der systemischen Heparinisierung bekamen die Versuchstiere 2-20 mg/kg KG Protamin (Protamin 1000[®], Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen). Nach dem Ende der 3 Stunden Nachbeobachtungszeit und der Entnahme der letzten Biopsie wurden die Tiere mit einer Kaliumchloridinjektion direkt ins Herz terminiert. Bis zum Ende des Versuches blieben die Tiere in tiefer Narkose.

2.5 Materialentnahme

Während des Versuches wurden zu 4 Zeitpunkten Lungenbiopsien entnommen. Aufgrund der Größe der Biopsien von jeweils etwa 1x0,5x0,5 cm wurden diese von verschiedenen Bereichen beider Lungenflügel gewonnen. Die Entnahmestellen wurden anschließend übernäht. Die erste Probenentnahme fand direkt vor Beginn des Bypasses statt (T1). Die zweite Biopsie erfolgte direkt nach der Beendigung des Bypasses (T2). Die dritte Biopsie wurde 1 Stunde nach T2 (T3), die vierte Biopsie 3 Stunden nach T2 (T4) gewonnen. Ein Teil jeder Gewebeprobe kam zur Fixierung in gepufferte Formaldehydlösung, der kleinere Rest (etwa 100-200mg) wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.6 Materialauswertung

Die Auswertung und damit verbundene Weiterverarbeitung der Proben erfolgte in der Klinischen und Experimentellen Pathologie im Forschungszentrum Borstel.

2.7 Multiplex-PCR

Die Expression des Gens für IL8 ließ sich mit Hilfe der PCR bestimmen. Zusätzlich amplifiziert wurde dabei ein Genabschnitt für Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH), um so einen internen Standard im Vergleich zur IL8 Expression zu bekommen. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und wird bekanntermaßen in allen Zellen in gleichbleibender Menge transkribiert. Daher ist es als Vergleichswert für die Expression anderer Gene als sogenanntes Housekeeping-Gen gut geeignet.

2.8 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem Lungengewebe erfolgte mit einem handelsüblichen Isolier- und Aufreinigungskit (RNeasy-Kit, Qiagen). Der Einsatz an Lungengewebe betrug hierbei jeweils 15 bis 30 mg. Dieses wurde im noch gefrorenen Zustand in mit β -Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer (RNeasy[®]-Kit, Qiagen GmbH, Hilden) gegeben und mittels eines automatischen Zerkleinerers (Ultraturrax[®]) lysiert. Das weitere Vorgehen folgte dem zugehörigen Protokoll für RNA-Isolierung des RNeasy-Kits. Dabei wurde das Gewebelysate auf Kieselgelmembranen gegeben, dort mehrfach gewaschen und schließlich mit RNasefreiem Wasser gelöst und aufgefangen. Die Menge und Reinheit der isolierten RNA ließ sich

photometrisch bestimmen (Gene Quant Pro[®], Amersham Pharmacia Biotech, Bucks, GB).

2.9 c-DNA Herstellung

Die Menge an eingesetzter RNA zur c-DNA Herstellung betrug jeweils 1µg in 8µl RNasefreiem Wasser. Um eine Störung des weiteren Verfahrens durch mögliche DNA-Fragmente in diesem Ansatz zu vermeiden, wurden 1µl 10x DNase Reaction Buffer und 1µl DNase hinzu gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur kam 1µl mM EDTA hinzu, um die DNase- Reaktion zu beenden. Um zufällige Basenpaarungen zwischen den einsträngigen RNA-Abschnitten zu vermeiden, wurde der Ansatz 10 Minuten lang auf 65°C erwärmt und anschließend auf Eis gestellt. Als Primer für die folgende c-DNA- Synthese kamen 1µl Oligo DesoxyThymidin-Nukleotide hinzu. Bei 70°C über 10 Minuten und anschließend 1 Minute bei Raumtemperatur lagerten sich diese an die poly-Adenosinketten der m-RNAs und dienten so als Startfragment für den weiteren Anbau passender Nukleotide. Jeder Ansatz erhielt nun 4µl First Strand Buffer, 2µl DTT und 1µl dNTPs. Nach 10 Minuten bei 25°C erfolgte die Zugabe von 1µl Superscript II. Dieses Enzym katalysierte nun die Synthese der c-DNA bei 42°C über 50 Minuten. 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 70°C beendeten die Reaktion und stabilisierten die erhaltene c-DNA.

2.10 Primer- Design

Die Basensequenz der Primer für IL8 lautete TATGCCTCATTCTGTGCTG und TGGAAGCCCCAGTTCCAATT; jeweils

vom 5' zum 3' Ende hin gelesen. Um eine ungewollte Bindung der Primer an DNA-Abschnitte auszuschließen, wurden die Basensequenzen mit der Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen. Es ließ sich dabei keine relevante Übereinstimmung der Primer mit einem anderen Genbereich finden als auf der mRNA für IL8 bei Schweinen. Die Basensequenzen der Primer für GAPDH lauteten TGAGACACGATGGTGAAGGT und TCGCCCCATTTGATTTTGGC; ebenfalls vom 5' zum 3' Ende hin gelesen. Auch für diese Primer ließ sich keine weitere relevante Übereinstimmung mit anderen Genbereichen außer der mRNA für GAPDH bei Schweinen finden. Hergestellt wurden die Primer von MWG-Biotech (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg). Die Konzentration betrug 20 mM. Die Spezifität der PCR wurde durch DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt. Die Sequenzierung übernahm Frau Dr. Elvira Richter vom Nationalen Referenzzentrum für Mykobakteriologie, Borstel.

2.11 Beladung der PCR- Maschine

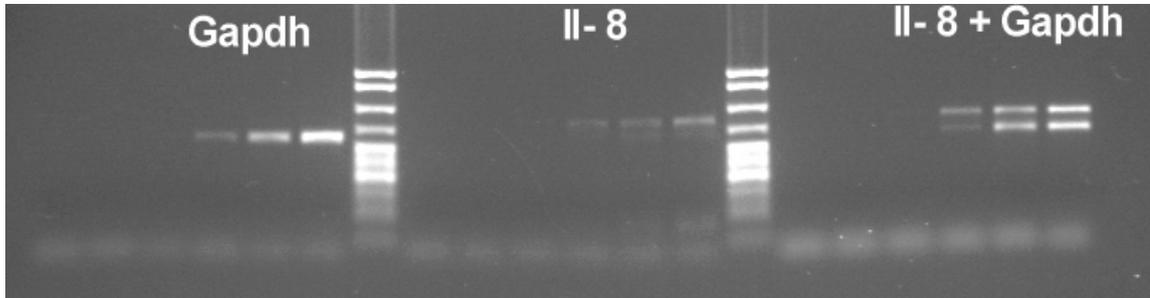
Jeder Ansatz für die PCR setzte sich zusammen aus 2µl c-DNA und 27,5µl destilliertem Wasser. Hinzu kamen 15,5µl vom sogenannten Mastermix, der sich folgendermaßen zusammensetzte: Jeweils 2µl der zwei Primer für IL8, Jeweils 2µl der zwei Primer für GAPDH, 1µl dNTPs, 1,5µl Magnesiumchlorid und 5µl PCR- Puffer. Um ein Verdunsten der Flüssigkeiten bei hohen Temperaturen zu verhindern, wurden die Ansätze mit einem Tropfen Mineralöl versehen. Die Zugabe der hitzestabilen Polymerase (Taq- Polymerase) zur Katalyse

der PCR erfolgte nach Erwärmung der Ansätze auf 94°C in der PCR-Maschine (Biometra Uno Thermoblock[®], Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen). Die Menge betrug für jeden PCR- Ansatz 0,3µl Taq- Polymerase in 4,7µl Wasser.

2.12 Bestimmung der Annealing- Temperatur und Zyklenzahl

Die Annealing- Temperatur, bei der die Primer sich an die mRNA-Stränge binden, lag bei 56°C. Bestimmen ließ sich diese Temperatur empirisch durch mehrere PCRs , wobei der C- und G- Gehalt der Primer einen Anhalt dafür gab, in welchem Bereich die optimale Temperatur liegen mußte. In diesen Versuchs- PCRs zeigte sich, daß bei 56°C sowohl die IL8- als auch die GAPDH- Primer sich spezifisch anlagerten. Somit waren die Bedingungen für eine Multiplex- PCR mit den Primern für IL8 und GAPDH zusammen in einem Ansatz gegeben. Die einzelnen Zyklen der PCR bestanden so aus einer Minute bei 94°C zum Auftrennen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen DNA- Strängen, anschließend eine Minute lang bei der oben beschriebenen Annealing- Temperatur von 56°C und danach eineinhalb Minuten lang bei der für die Taq-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur von 72°C.

Abbildung 1: PCR- Gelbild. Von links nach rechts: PCR- Produkt einer PCR nur mit GAPDH- Primern, IL8- Primern und zusammen in einem Ansatz nach 25, 30 und 35 Zyklen, dazwischen jeweils Längenstandard pBR322.



Um die Anzahl der Zyklen zu bestimmen, wurden bei Probe- PCRs nach 20, 25, 27, 30, 32, 35, 37 und 40 Zyklen jeweils kleine Mengen des PCR- Produktes entnommen und auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des hierbei erhaltenen Bildes wurde die Anzahl der Zyklen für alle PCRs auf 30 festgesetzt. Nach 30 Zyklen ließen sich die Gelbanden für IL8 und GAPDH deutlich erkennen, eine Steigerung der Intensität der Banden war durch weitere Zyklen aber noch durchaus gegeben. Beendet wurde die PCR mit einer 15 Minuten langen Phase bei 72°C zur Stabilisierung des PCR- Produktes.

Abbildung 2: Multiplex RT-PCR Gelbild. Es wurden jeweils nach dem Durchlaufen der angegebenen Zyklenzahlen PCR- Produktmengen entnommen und auf das Gel aufgetragen. Die obere Bande enthält das IL8 PCR-Produkt, die untere GAPDH.

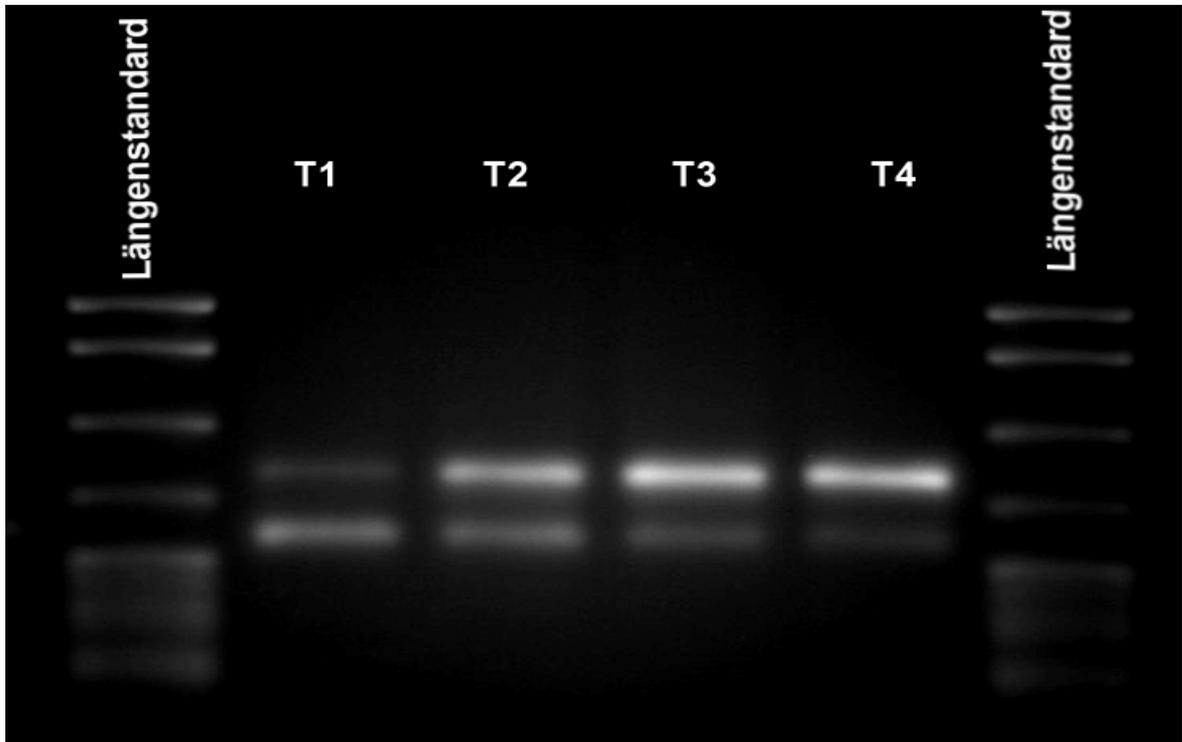


2.13 PCR- Produkt- Gelelektrophorese

Zur Auswertung wurden die PCR- Produkte auf Agarosegelen aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele bestanden aus 2g Agarose (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln), 100 ml 1xTAE- Puffer und 1,5 µl Ethidiumbromid. Der TAE- Puffer beinhaltete 242g Tris, 40 ml 0,5M EDTA, 1750ml destilliertes Wasser und 57,1ml Eisessig. Um die richtige Konzentration zu erhalten, wurden 40ml dieses Ansatzes mit autoklaviertem Wasser auf 2l aufgefüllt. Die oben genannte Mischung für das Gel verfestigte sich nach Erwärmung in vorgefertigten Formen. Käbme bildeten dabei im Gel eine Reihe von Fächern, in die die PCR- Produkte später einpipettiert werden sollten. Vorher wurden die PCR- Produkte mit einem Loading- Buffer

bestehend aus Phenolblau und Glycerol im Verhältnis 2µl des Loading- Buffers zu 5µl PCR- Produkt gemischt. Ein Fach erhielt 5µl des Längenstandards pBR322 DNA- MSP I (Digest, Schwalbach/Ts). Nach dem Anlegen einer Gleichspannung (Minicell Power Back, Biometra GmbH, Göttingen) an die Elektrophoresekammer begannen die PCR- Produkte im elektrischen Feld zu wandern. Die angelegte Spannung betrug zunächst für 20 Minuten 40 mV, dann für 40 Minuten 90 mV. Nach dem Ende der Elektrophorese konnten die Banden der PCR- Produkte anhand des interkalierten Ethidiumbromids als Banden unter dem Licht einer UV- Lampe sichtbar gemacht werden. Diese Banden wurden abfotografiert. Die IL8 Sequenz hatte eine Länge von 343 Basen, die GAPDH- Sequenz war 302 Basen lang. Aus dieser unterschiedlichen Länge und damit auch unterschiedlichen Masse resultierte für das IL8- PCR- Produkt eine geringere Laufgeschwindigkeit auf dem Gel und damit auch eine geringere Laufstrecke. Erkennen ließ sich dieses aus dem Vergleich mit dem Längenstandard pBR322.

Abbildung 3: PCR- Gelbild am Beispiel des Tieres 20 nach 21 Zyklen. Von links nach rechts wurden aufgetragen: Längenstandard, PCR- Produkt des Messpunktes T1, T2, T3, T4, Längenstandard. Die obere Bande gibt jeweils IL8 wieder, die untere GAPDH. Man erkennt deutlich, wie die Leuchtintensität der IL8 Bande von T1 nach T2 hin zunimmt



2.14 Auswertung der Gelelektrophoresebilder

Als Maß für die Menge der in den Proben vorhandenen mRNA für IL8 sollte die Leuchtintensität der IL8 Gelbanden betrachtet werden. Die Auswertung der Gelbilder erfolgte mit Hilfe des Programms Bandleader. Dabei wurden über die Laufstrecke jedes Fachs des Gelbildes ein Rahmen gezogen. Das Programm erstellte ein Profil, welches die Leuchtintensitäten im Bereich dieses Rahmens graphisch wiedergab. In diesen Profilen zeigten sich die Leuchtbanden von IL8 und GAPDH als zwei aufeinanderfolgende Gipfel. Diese graphischen Profile ließen sich in absoluten Zahlenwerten darstellen, welche als

Datenreihen in Tabellen übertragen wurden (Excel[®] , Microsoft). Als vergleichbaren Wert sollte nun die Fläche unter den Kurven gemessen werden. Um die Leuchtintensität des Hintergrundes von den Gelbänden zu subtrahieren, wurden Geraden von den Anfangs- zu den Endpunkten der Kurvengipfel gelegt. Diese Geraden schlossen nun mit der Kurve zusammen den Bereich ein, der die Leuchtintensität der dazugehörigen Banden darstellte.

Abbildung 4: Grafische Darstellung der Leuchtintensität der Gelbänden am Beispiel von Tier 20 zum Zeitpunkt T1 (vergleiche Abbildung 3). Die zwei Gipfel der Kurven geben die Banden von GAPDH und IL8 wieder. Die Geraden unter der Kurve sollen den Hintergrund eliminieren, die ausgefüllte Fläche unter der Kurve gibt das Maß für die Leuchtintensität der Banden an.

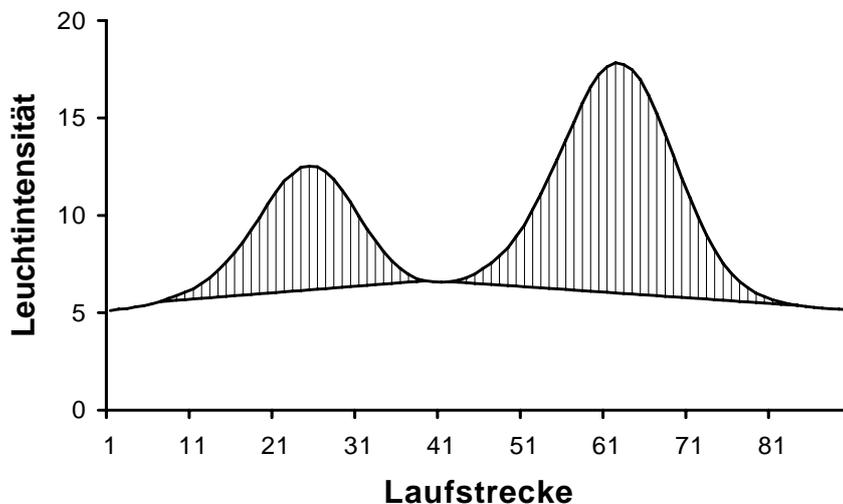


Abbildung 5: Grafische Darstellung der Leuchtintensität der Gelbanden am Beispiel von Tier 20 zum Zeitpunkt T2. Man erkennt, dass im Vergleich zu T1 (Abbildung 4) der erste Gipfel (IL8) deutlich größer ist als der zweite (GAPDH).

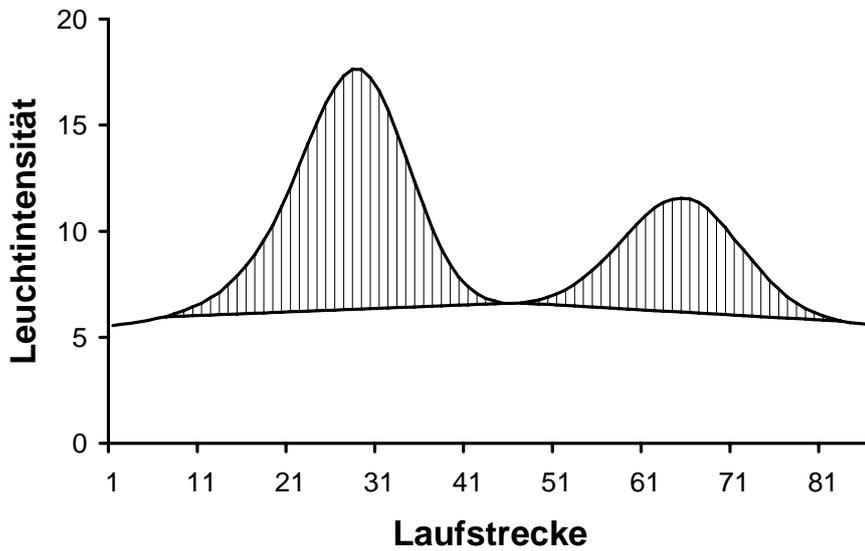


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Leuchtintensität der Gelbanden am Beispiel von Tier 20 zum Zeitpunkt T3.

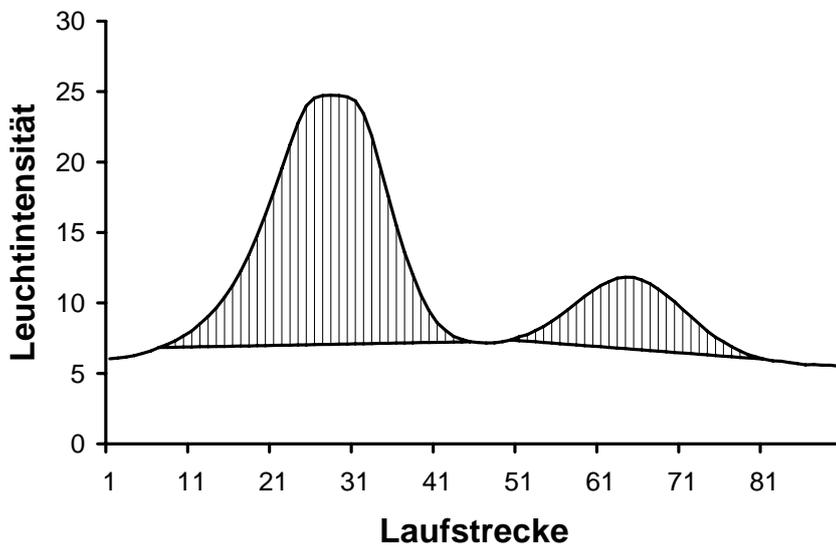
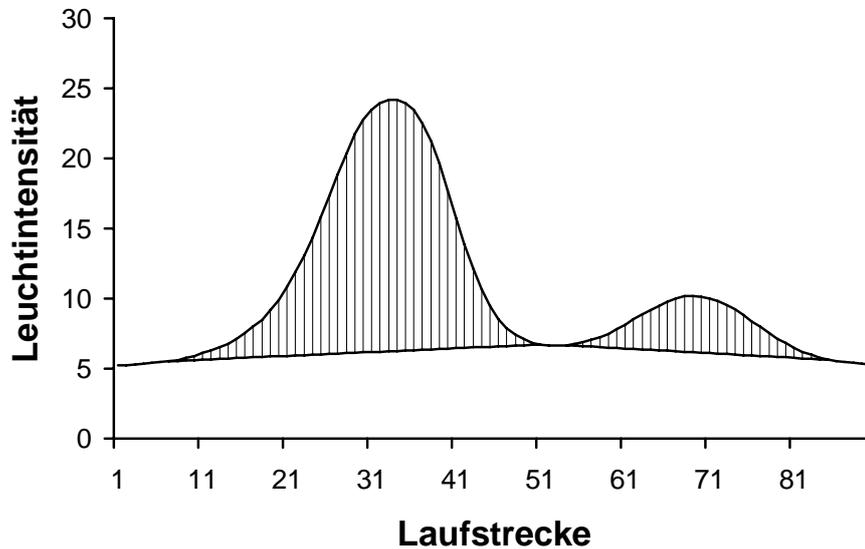
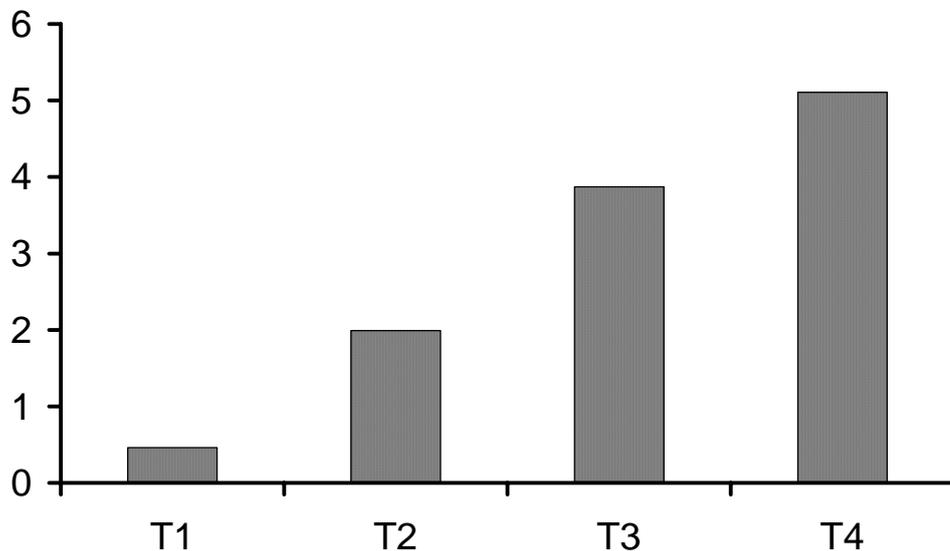


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Leuchtintensität der Gelbenden am Beispiel von Tier 20 zum Zeitpunkt T4.



Die Fläche ließ sich nun berechnen, indem von jedem Funktionswert der Kurve der dazugehörige Funktionswert der Gerade subtrahiert und die Ergebnisse aufsummiert wurden. Um nun die so erhaltenen Werte für die IL8 Expressionen zu den verschiedenen Zeiten des Versuches und zwischen den verschiedenen Tieren vergleichen zu können, wurden sie ins Verhältnis zum jeweiligen Wert für GAPDH gesetzt. Die so erhaltenen Quotienten stellten die Ergebnisse dar und fanden Eingang in die Statistik.

Abbildung 8: Grafische Darstellung des Verhältnisses IL8/GAPDH am Beispiel des Tieres 20 zu den Zeitpunkten T1, T2, T3 und T4 (Vergleiche hierzu die Abbildungen 3 bis 7).



2.15 Statistik

Die oben beschriebenen Quotienten sollten in Bezug auf zwei Fragen untersucht werden. 1.: Gibt es eine statistisch signifikante Änderung der Quotienten im zeitlichen Verlauf des Versuches? 2.: Gibt es statistisch signifikante Unterschiede der Quotienten zwischen den drei verschiedenen Versuchsgruppen? Der Quotient zum Zeitpunkt T1 ist dabei jeweils der Ausgangswert, mit dem die Quotienten der folgenden Entnahmezeitpunkte verglichen werden. Daher wurden bei jedem Tier die Quotienten durch den zugehörigen T1- Wert dividiert. Folglich war bei allen Tieren der Ausgangswert bei T1 vor dem Bypass gleich 1. Aufgrund der kleinen Stichprobe, die keine Rückschlüsse auf eine Normalverteilung der Werte zuließ, kam für die erste Frage der Wilcoxon- Test für verbundene Stichproben zur Anwendung.

Verglichen wurden die Quotienten aller Tiere zwischen den Zeitpunkten T1 zu T2, T1 zu T3, T1 zu T4, T2 zu T3, T2 zu T4 und T3 zu T4. Anschließend wurden die Quotienten aller Tiere jeweils der einzelnen Versuchsgruppen zwischen den oben genannten Zeitpunkten untereinander verglichen. Die zweite Frage ließ sich mit dem U- Test für unverbundene Stichproben bearbeiten. Hierbei wurden die Quotienten der Tiere jeweils einer Versuchsgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt T1 bis T4 mit den Quotienten der Tiere einer anderen Versuchsgruppe zum selben Zeitpunkt verglichen. Eine statistische Signifikanz sollte dabei gegeben sein bei einem errechnetem P- Wert $< 0,05$.

2.16 Histologie

Das in Formaldehyd fixierte Lungengewebe wurden in üblicher Weise in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom ließen sich $4\mu\text{m}$ dicke Schnitte anfertigen und diese auf Objektträger ziehen. Nach Entparaffinisierung und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe konnten die Schnitte eingefärbt werden. Dieses erfolgte in üblicher Weise mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).

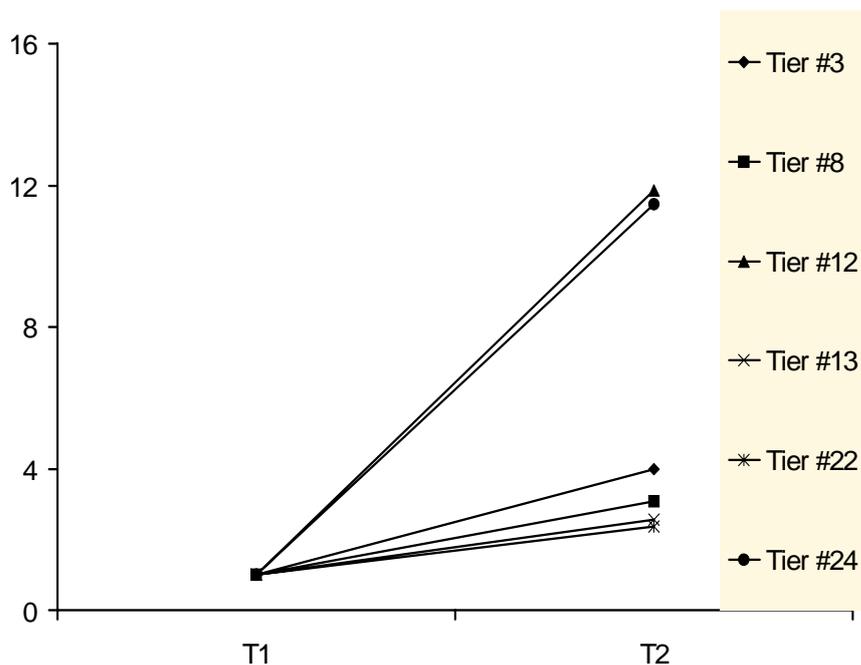
3. Ergebnisse hinsichtlich PCR und Histologie

3.1 IL8 im zeitlichen Verlauf und im Gruppenvergleich

Zunächst sollen die einzelnen Versuchsgruppen im Zeitverlauf betrachtet werden.

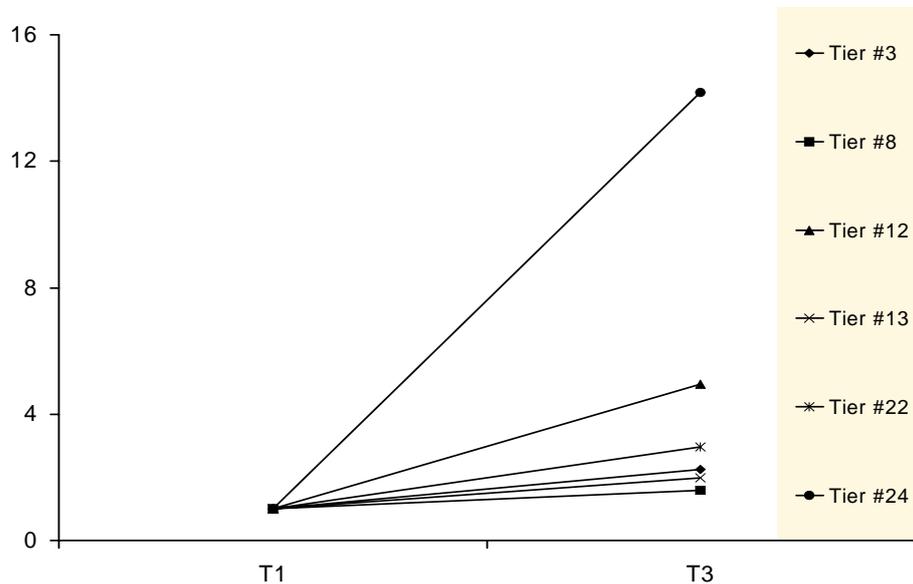
In der Kontrollgruppe konnte zum Zeitpunkt T1 ein deutlicher Anstieg der IL8-Werte bei allen Tieren beobachtet werden. Diese Steigerung lag zwischen dem 2,37fachen und dem 11,50fachen des Ausgangswertes bei T1. Mit einem errechneten $P=0,0277$ war dieser Anstieg signifikant.

Abbildung 9: Änderung der Quotienten der Gruppe 1 von T1 zu T2. Da alle Werte zunächst durch den jeweiligen T1- Wert dividiert wurden, ist für jedes Tier der T1- Wert gleich 1. Der zu beobachtende Anstieg ist mit einem $P=0,0277$ signifikant.



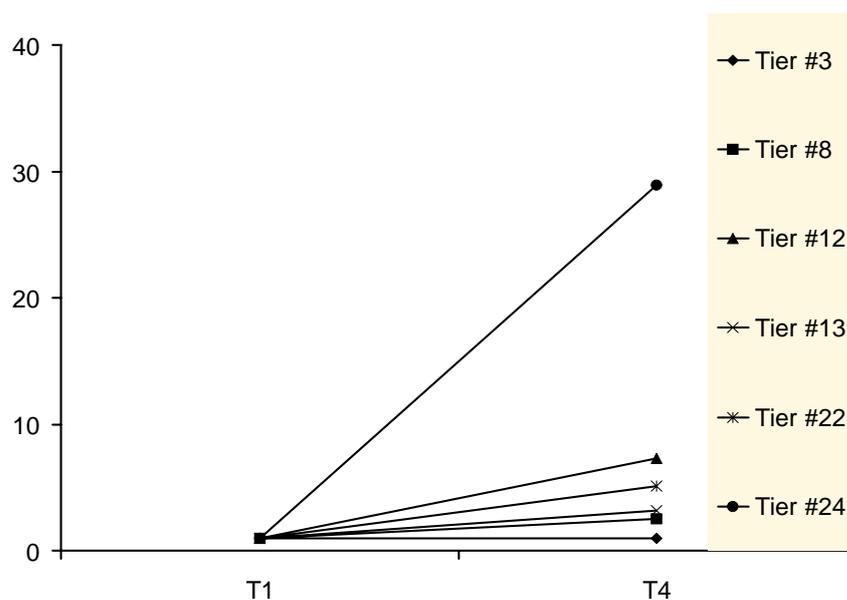
Auch zum Zeitpunkt T3 zeigten sich bei allen Tieren erhöhte Quotienten vom 1,60fachen bis zum 14,18fachen der T1- Werte. Auch hierfür konnte eine deutliche Signifikanz nachgewiesen werden ($P=0,0277$).

Abbildung 10: Änderung der Quotienten der Gruppe 1 von T1 zu T3. Auch hier läßt sich wieder eine Steigerung der IL8-Werte erkennen, die mit einem $P=0,0277$ als signifikant anzusehen ist.



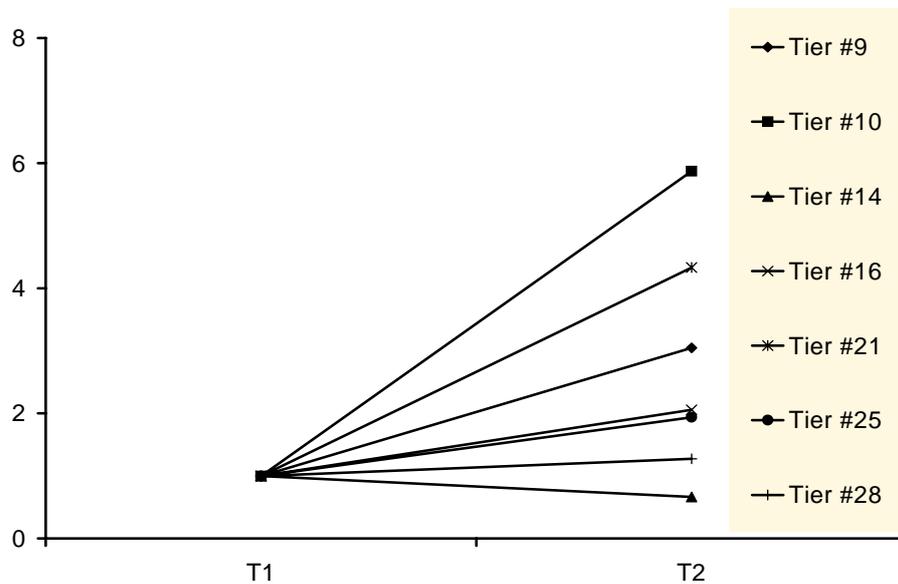
Zum Zeitpunkt T4 war lediglich bei einem Tier wieder der Ausgangswert bei T1 in etwa erreicht, bei den anderen Tieren waren noch immer vom 2,52fachen bis zum 28,94fachen höhere Quotienten vorhanden. Mit einem P-Wert von 0,0464 war auch hier eine Signifikanz gegeben.

Abbildung 11: Änderung der Quotienten der Gruppe 1 von T1 zu T4. Auch hier lässt sich wieder eine Steigerung erkennen, die mit einem $P=0,0464$ als signifikant anzusehen ist.



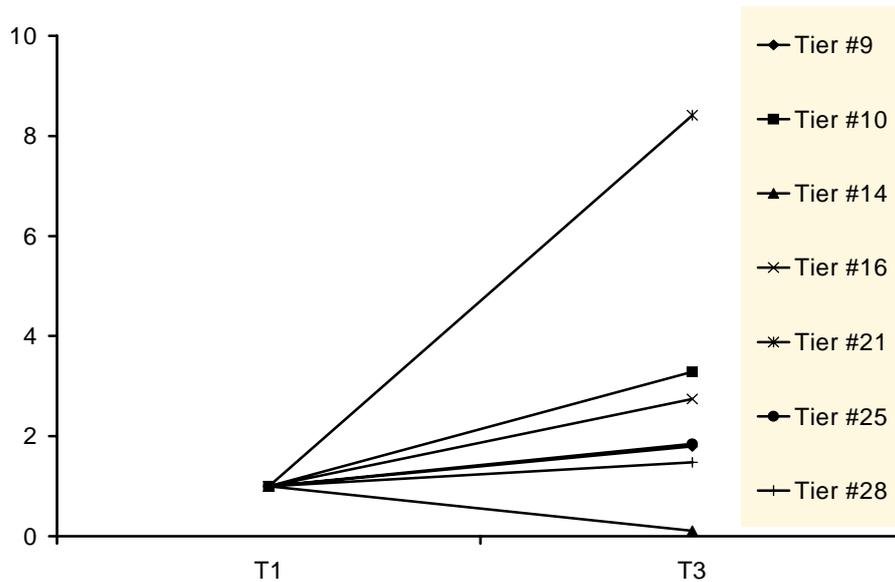
In der Gruppe 2 lag bei einem Tier der T2- Wert mit 0,66 unter dem Ausgangswert. Bei allen anderen Tieren waren die IL-8-Werte von 1,27fach bis 5,87fach größer als zum Zeitpunkt T1. Diese Erhöhung war mit einem $P= 0,0425$ signifikant.

Abbildung 12: Änderung der Quotienten der Gruppe 2 von T1 zu T2. Die erkennbare Steigerung ist mit einem $P=0,0425$ signifikant.



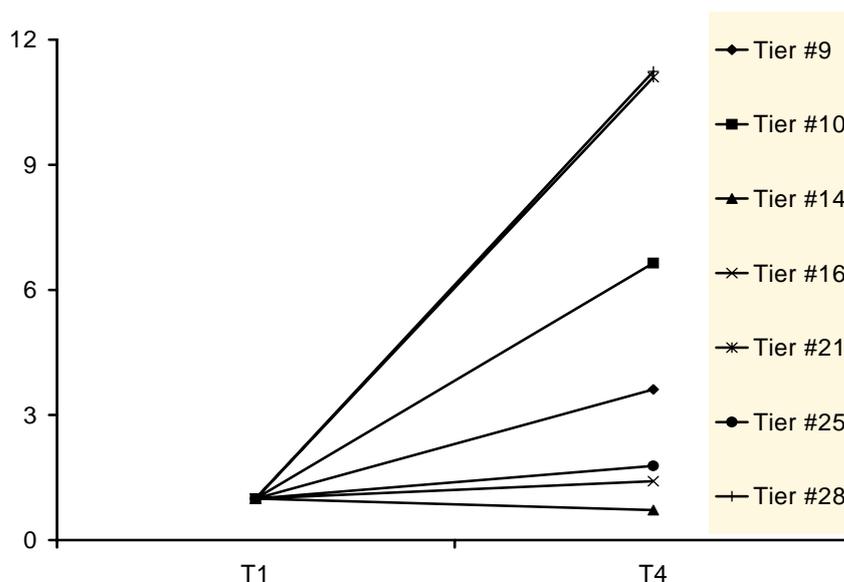
Zum Zeitpunkt T3 waren ebenfalls bei einem Tier der Quotient mit 0,11 erniedrigt und bei allen anderen Tieren von 1,48 bis zu 8,42 mal größer als zum Zeitpunkt T1. Mit einem $P= 0,091$ konnte diese Steigerung allerdings nicht als signifikant angesehen werden.

Abbildung 13: Änderung der Quotienten der Gruppe 2 von T1 zu T3. Mit einem $P=0,091$ wurde hier das geforderte Signifikanzniveau nicht erreicht.



Zum Zeitpunkt T4 lag wiederum der Wert eines Tieres mit 0,72 unter dem Ausgangswert, die Quotienten der anderen Tiere zwischen 1,41fach und 11,24fach höher als bei T1. Hier konnte mit einem $P=0,0180$ eine Signifikanz gezeigt werden.

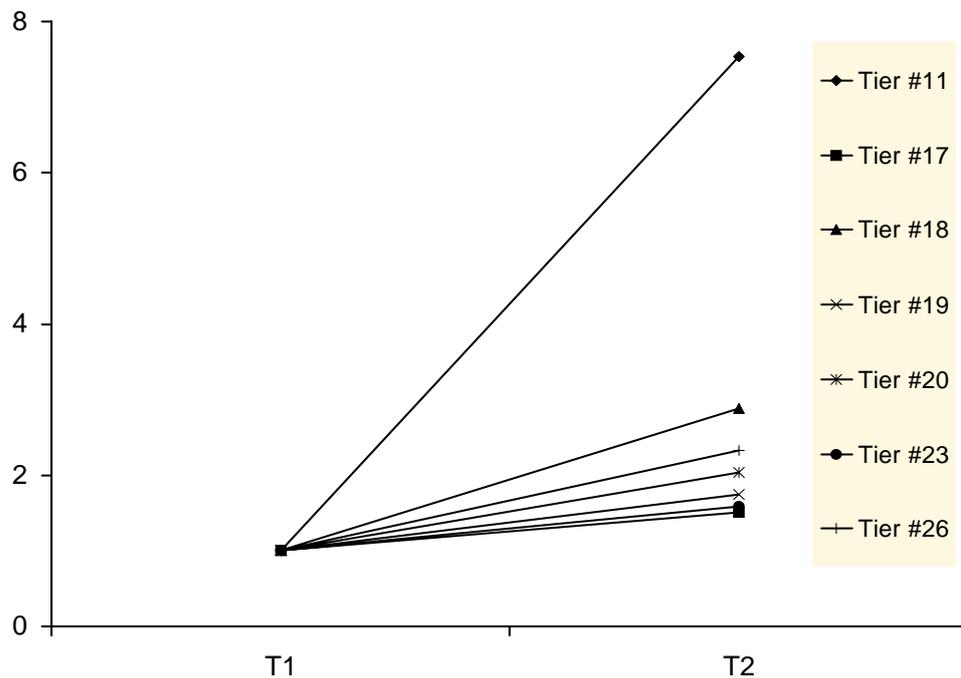
Abbildung 14: Änderung der Quotienten der Gruppe 2 von T1 zu T4. Mit einem $P=0,0180$ ist die Steigerung signifikant.



In der Gruppe 3 lagen die Ergebnisse zum Zeitpunkt T2 alle höher als zum Zeitpunkt T1. Sie lagen im Bereich vom 1,56fachen bis zum

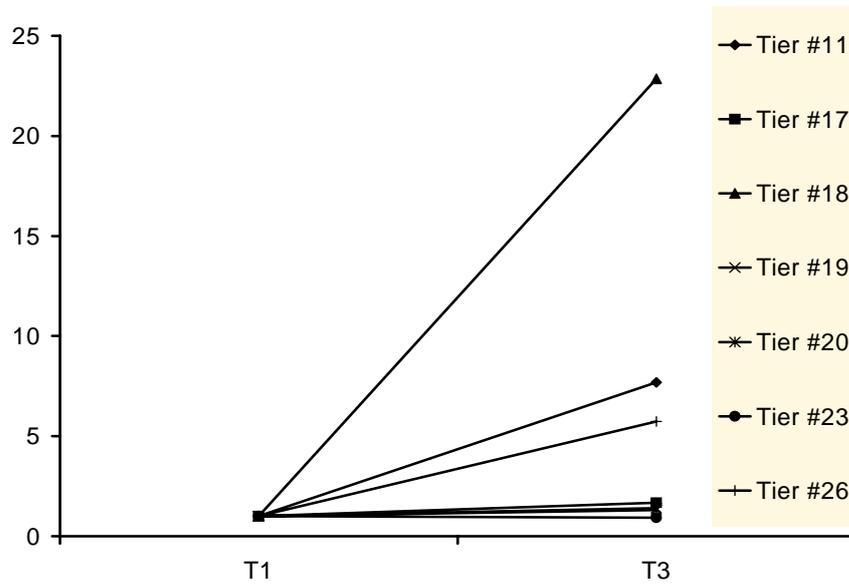
7,53fachen des T1-Wertes, eine Signifikanz war mit einem $P= 0,0180$ gegeben.

Abbildung 15: Änderung der Quotienten der Gruppe 3 von T1 zu T2. Der Anstieg der IL8-Werte ist mit $P=0,180$ signifikant.



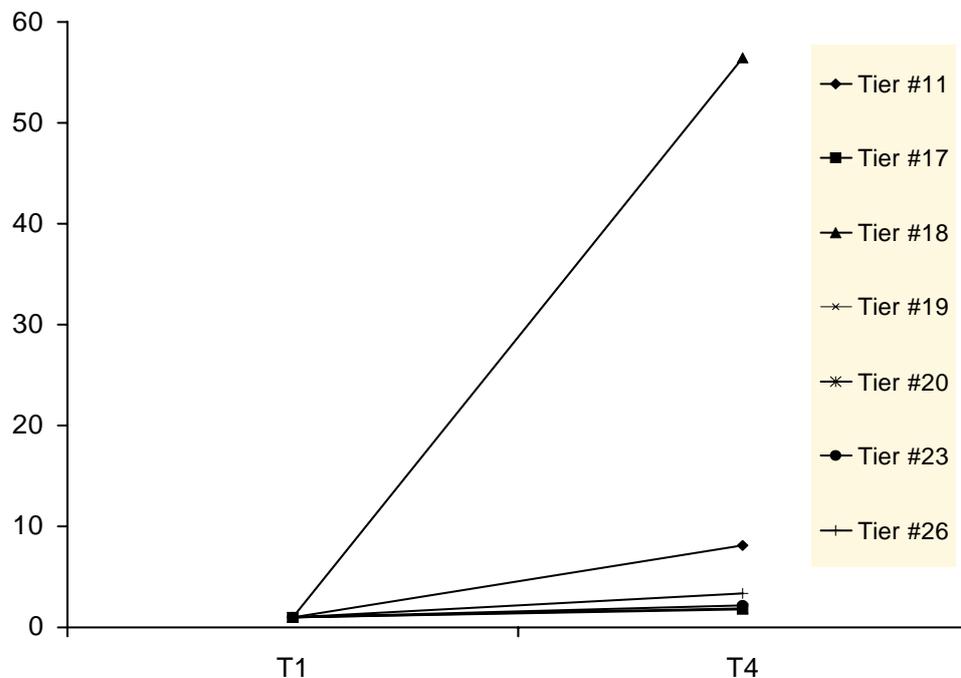
Zum Zeitpunkt T3 lag bei einem Tier mit 0,92 der Quotient unter dem Ausgangswert. Die Werte der anderen Tiere lagen alle zwischen 1,32 und 22,8 und somit höher als zum Zeitpunkt T1. Mit einem $P= 0,0280$ war diese Steigerung signifikant.

Abbildung 16: Änderung der Quotienten der Gruppe 3 von T1 zu T3. Mit einem $P=0,0280$ ist der Anstieg signifikant.



Zum Zeitpunkt T4 lagen bei allen Tieren die IL8-Werte zwischen 1,77 und 56,48 und damit höher als zum Zeitpunkt T1. Mit einem $P= 0,0180$ konnte dieses als signifikant angesehen werden.

Abbildung 17: Änderung der Quotienten der Gruppe 3 von T1 zu T4. Der erkennbare Anstieg ist mit einem $P=0,0180$ signifikant.



Als zweites sollen nun die Versuchsgruppen untereinander verglichen werden.

Zwischen den Gruppen 1 und 2 konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede festgestellt werden. Zum Zeitpunkt T2 war $P=0,1161$, zum Zeitpunkt T3 war $P=0,3173$ und zum Zeitpunkt T4 betrug der Signifikanzwert $0,7751$. Auch zwischen den Gruppen 2 und 3 bestanden keine signifikanten Unterschiede. Die errechneten P- Werte lagen hier für T2 bei $0,9491$, bei T3 bei $0,9491$ und bei T4 bei $0,8480$. Nur beim Vergleich der Gruppen 1 und 3 zum Zeitpunkt T2 konnte mit einem $P=0,0321$ ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dabei lag das Rangmittel der Gruppe 1 mit $9,5$ über dem Rangmittel der Gruppe 3 mit $4,86$. Für die Zeitpunkte T3 mit einem $P=0,5677$ und T4 mit einem $P=0,6682$ konnten wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden.

Abbildung 1: In der Tabelle sind die errechneten Signifikanz-Niveaus der untereinander verglichenen Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten wiedergegeben. Nur in der grau unterlegten Zeile war $P < 0,05$ und damit der Unterschied zwischen den Quotienten der Gruppen signifikant.

Gruppen	Zeitpunkte	P- Werte
Gruppe1 – Gruppe2	T2	0,1161
Gruppe1 – Gruppe2	T3	0,3173
Gruppe1 – Gruppe2	T4	0,7751
Gruppe1 – Gruppe3	T2	0,0321
Gruppe1 – Gruppe3	T3	0,5677
Gruppe1 – Gruppe3	T4	0,6682
Gruppe2 – Gruppe3	T2	0,9491
Gruppe2 – Gruppe3		0,9491
Gruppe2 – Gruppe3	T4	0,8480

3.2 Histologie im Gruppen- und Zeitvergleich

Gruppe 1 (Kontrollgruppe)

Die Gewebeproben zum Zeitpunkt T1 zeigten lichtmikroskopisch überwiegend normales Lungengewebe. Bei zwei Tieren fand sich ein leichtes Emphysem, bei einem waren Dystelektasen zu erkennen. Zum Zeitpunkt T2 war in allen Proben ein Emphysem erkennbar. Eine Probe ließ eine chronische eitrig Bronchitis erkennen. Zum Zeitpunkt T3 waren bei drei Tieren Erythrozyten aus den Kapillaren getreten. In zwei Proben fanden sich Leukozyten interstitiell, in einer weiteren Probe marginalisierend im Gefäßlumen. In den Proben zum Zeitpunkt T4 waren viermal extravasal Leukozyten erkennbar. Eine Probe zeigte lediglich ein Lymphödem, einmal beschränkten sich die Veränderungen auf das Emphysem.

Gruppe 2 (partielle Pulmoplegie)

Die Gewebeproben zum Zeitpunkt T1 waren in der lichtmikroskopischen Befundung in etwa mit denen der Gruppe 1 zum Zeitpunkt T1 vergleichbar. Viermal fanden sich Dystelektasen, dreimal ein leichtes Emphysem. In den Proben zum Zeitpunkt T2 war einmal eine Ansammlung von Leukozyten extravasal erkennbar, in zwei Proben kam es zum Austritt von Erythrozyten aus dem Gefäßbett. Zum Zeitpunkt T3 waren in vier Fällen Leukozyten extravasal zu finden, zweimal von Hämorrhagieen begleitet. Einmal zeigte sich das Bild einer vorbestehenden chronischen eitrig Bronchitis. Zum Zeitpunkt T4 waren zweimal Leukozytenansammlungen außerhalb der Gefäße, einmal marginalisierend in den Kapillaren. Eine Probe zeigte ein alveoläres Ödem. Bei einem Tier ließ sich wieder eine vorbestehende Bronchopneumonie erkennen.

Gruppe 3 (Pulmoplegie)

Zum Zeitpunkt T1 fielen dreimal dystelektatische Bereiche auf, einmal ein interstitielles Ödem, einmal eine leichte Stauung der Gefäße. Zum Zeitpunkt T2 waren in vier Gewebeproben dystelektatische Bereiche erkennbar, viermal emphysematische Bezirke im Lungengewebe. In einer Probe waren wenige Leukozyten zu finden. Die Proben zum Zeitpunkt T3 ließen zweimal leichte Leukozytenansammlungen als Zeichen eines entzündlichen Geschehens erkennen, viermal zeigte sich ein Emphysem. Zum Zeitpunkt T4 lagen in drei Gewebeproben Neutrophile Leukozyten in den Kapillaren marginalisierend vor, einmal waren sie zusätzlich ins Interstitium ausgewandert. Viermal waren emphysematische Bereiche zu sehen.

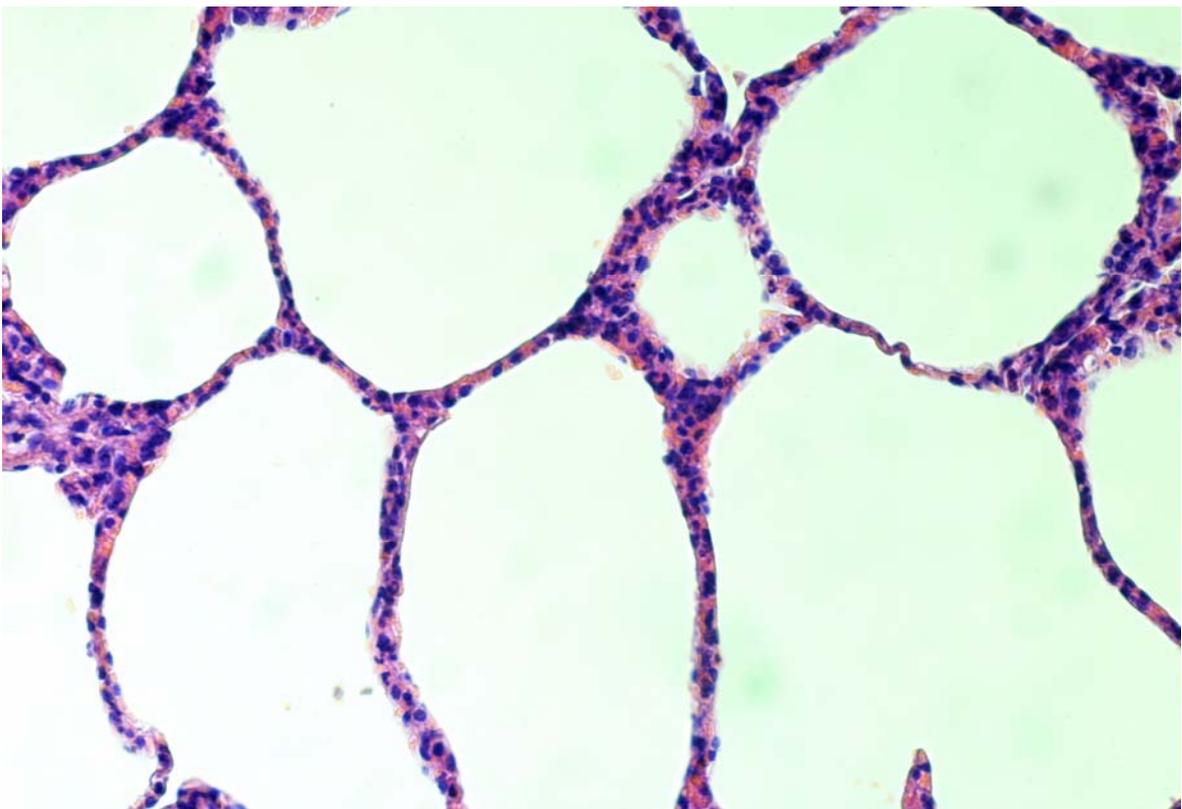


Abbildung 19: Lungengewebe am Beispiel von Tier Nr.9 (Gruppe2) zum Zeitpunkt T2. HE- Färbung, 400fache Vergrößerung. Normales Lungengewebe.

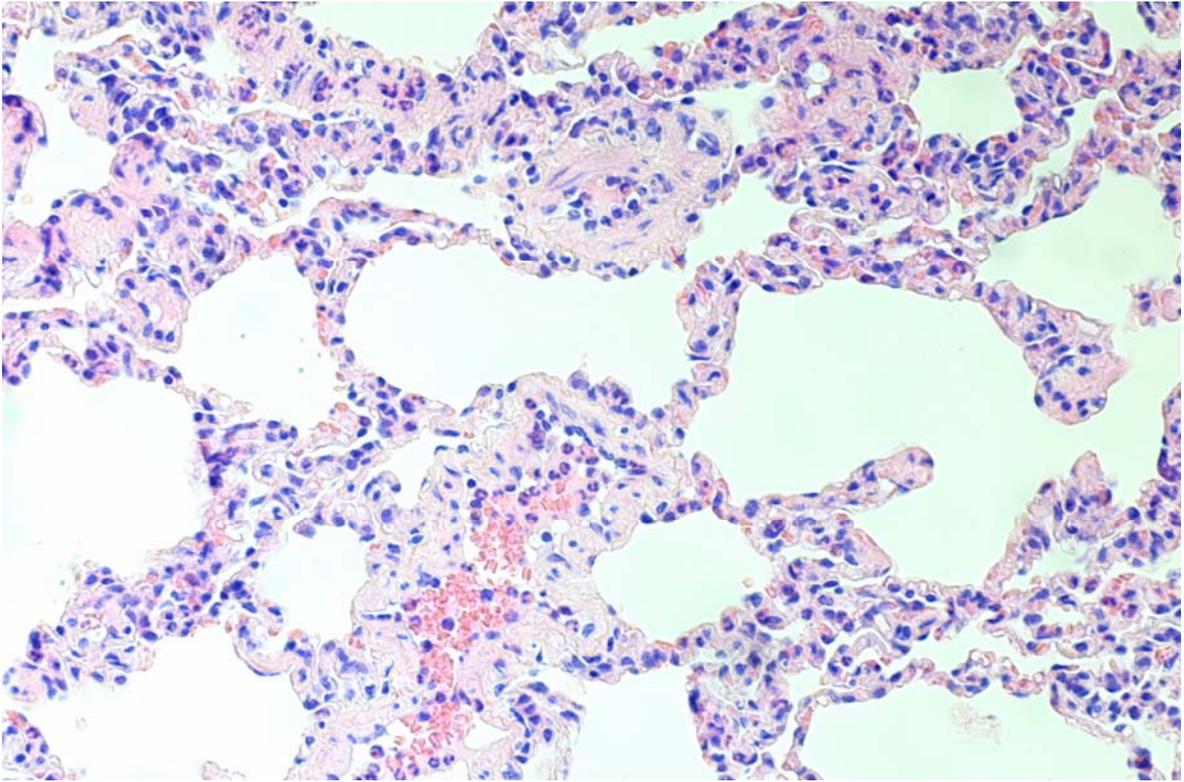


Abbildung 20: Lungengewebe am Beispiel von Tier Nr.10 (Gruppe 2) zum Zeitpunkt T3. HE-Färbung, 400fache Vergrößerung. Marginalisierende neutrophile Granulozyten intravasal.

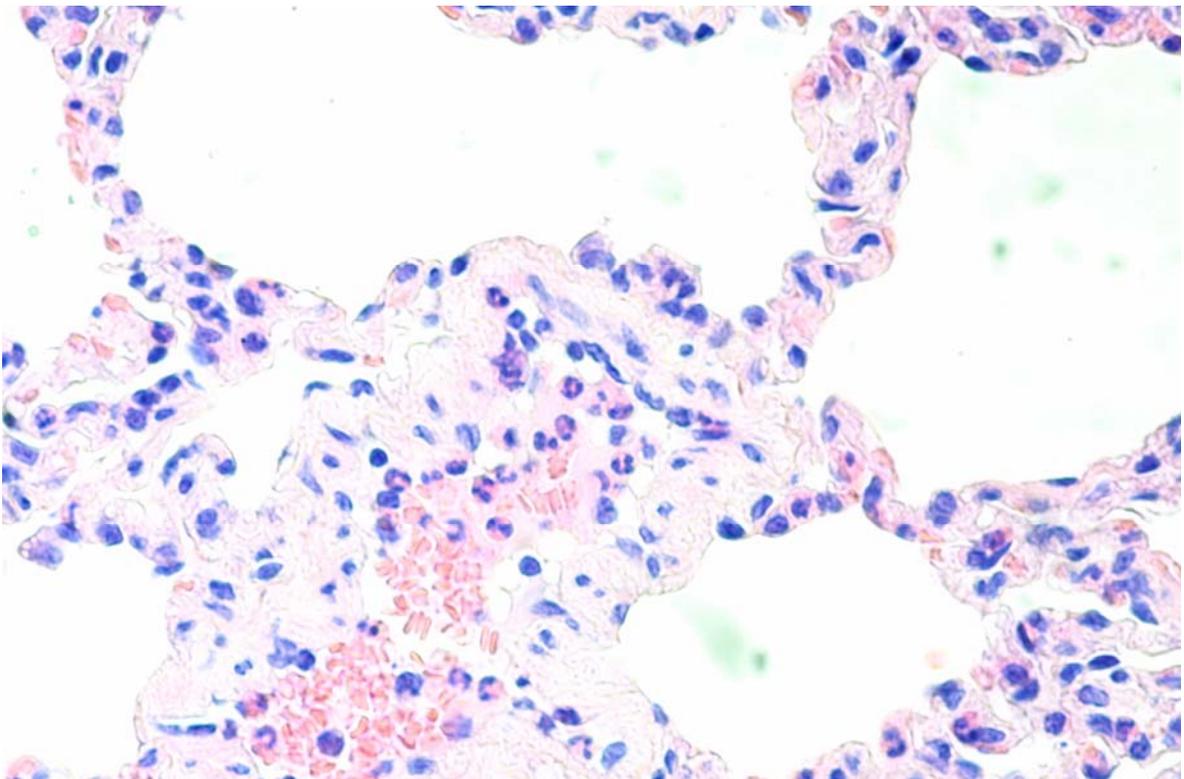


Abbildung 20a: Detailvergrößerung 800fach von Abbildung 10.

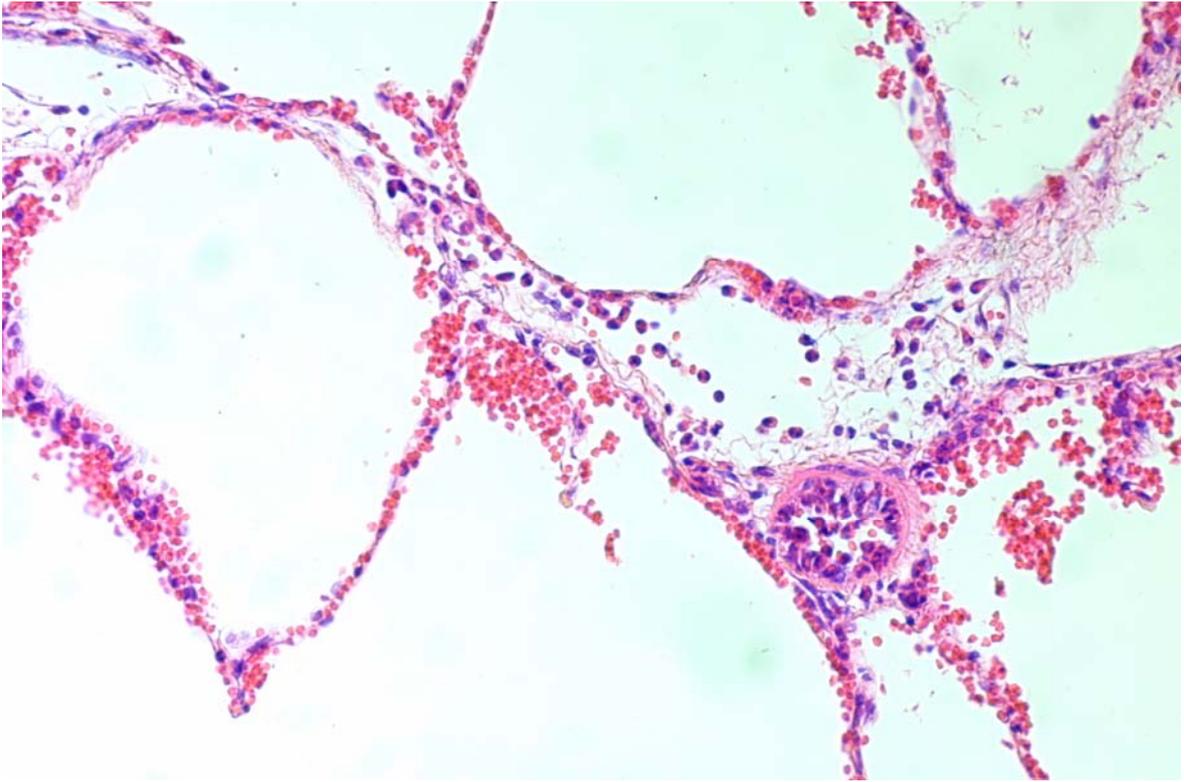


Abbildung 21: Lungengewebe am Beispiel von Tier Nr.17 (Gruppe1) zum Zeitpunkt T3. HE-Färbung, 400fache Vergrößerung. Neutrophile Granulozyten im Interstitium.

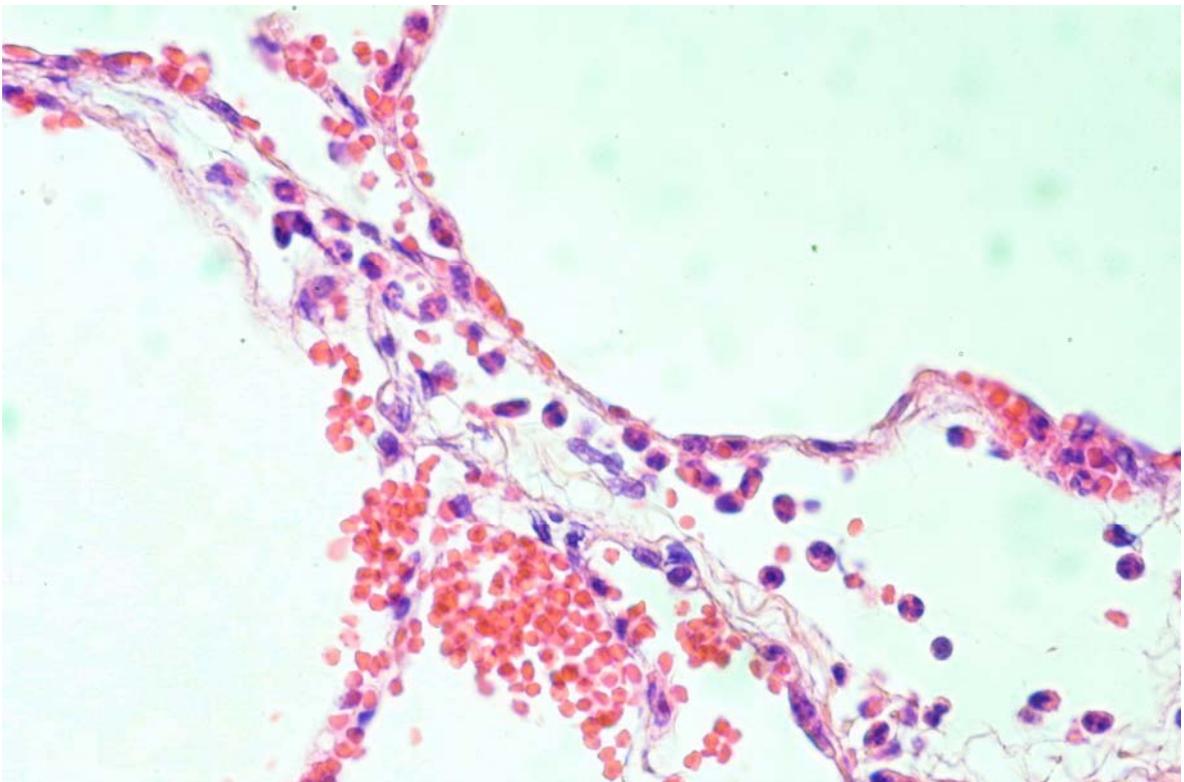


Abbildung 21a: 800fache Detailvergrößerung von Abbildung 11.

4. Diskussion

4.1 IL8

Als proinflammatorisches Zytokin spielt IL8 eine wichtige Rolle in der Entstehung entzündlicher Prozesse. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits einen Zusammenhang zwischen KPB und IL8 zeigen (Finn et al. 1993, Kalfin et al. 1993, Burns et al. 1995, Brix-Christensen et al. 2001, Hayashi et al. 2001, Tassani et al. 2002a,b). IL8 führt zur Auswanderung neutrophiler Granulozyten aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe und zur Ausstoßung der Granula (Wachtfogel et al. 1987, Huber et al. 1991, Sham et al. 1993, Rajarathnam et al. 1994, Baggiolini et al. 1997, Drost et al. 2002). Einige Studien zeigen auch quantitative Zusammenhänge zwischen IL8 und der Schwere der dadurch induzierten Reaktion im Gewebe (Donnelly et al. 1993, Kawamura et al. 1993). Die Steigerung der IL8 Freisetzung kann sowohl im peripheren Blut als auch in bronchoalveolärer Lavage nach KPB beobachtet werden. Zellen, die nach KPB vermehrt IL8 bilden, sind neutrophile Granulozyten, Alveolarmakrophagen und Monozyten, aber auch Herz- und Skelettmuskelzellen (Kalfin et al. 1993, Burns et al. 1995, Kotani et al. 2000 a).

Auf welchem Wege Operationen mit KPB letztendlich zur Lungenschädigung führen, wird nach wie vor diskutiert. Als auslösende Ereignisse kommen das Operationstrauma, der unphysiologische Kontakt des Blutes mit den Oberflächen des Schlauchsystems der HLM (Horton et al. 1999), die Ischämiezeit des Gewebes (Serraf et al. 1997, De Perrot et al. 2001) und die Reperfusion des Gewebes am Ende des KPB (De Perrot et al. 2001, Kuratani et al. 1992) in Frage.

Dementsprechend vielfältig sind auch die Ansatzpunkte, über die eine Schädigung der Lunge zu verhindern versucht werden kann. Eine Möglichkeit besteht darin, über Ultrafiltration des Blutes die humorale Entzündungskaskade zu stoppen und so eine Lungenschädigung zu verhindern (Millar et al. 1993, Onoe et al. 2000). In ähnlicher Weise

kann versucht werden, durch Filtration gezielt die Leukozyten zu entfernen (Bando et al. 1990). Auch die Gabe von Cortison vor Beginn des Bypasses wird in der Literatur beschrieben (El Azab et al. 2003). Weitere Möglichkeiten sind die Modifikation von Bypassstemperatur (Tassani et al. 2002 b, Chiang et al. 1999) oder der Schlauchoberflächen der HLM (Horton et al. 1999, Kazaz et al. 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Ischämie der Lunge während des KPB zu verhindern. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die alleinige Perfusion der Bronchialarterien keine ausreichende Sauerstoffversorgung des Lungengewebes gewährleistet und es so erst zu einer Ischämie und damit einer Lungengewebsschädigung kommen kann.

Die IL8-Expression im Lungengewebe diente dabei für die zu erwartende Entzündungsreaktion als Indikator, ebenso wurden die histologischen Veränderungen im Gewebe beobachtet.

Für IL8 konnte eine deutliche Expressionssteigerung nach KPB nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stellt eine Ergänzung zu den bereits oben genannten Untersuchungen von Brix-Christensen, Tassani und Burns. Während dort allerdings ein IL8- Anstieg im peripheren Blut, im Skelettmuskel oder Herzmuskel beschrieben wurde, konnte hier die direkte Expression im Lungengewebe nachgewiesen werden. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen von Kotani. Kotani zeigte in seiner Studie nach KPB eine größere IL8- Expression in Alveolarmakrophagen als in den Monozyten des peripheren Blutes (Kotani et al. 2000a).

Somit lässt sich der erste Teil der Fragestellung positiv beantworten: KPB führt in Lungengewebe zu einer Steigerung der IL8- Expression.

Im zweiten Teil der Fragestellung dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch eine kontinuierliche oder intermittierende Perfusion der Pulmonalisstrombahn diese IL8- Expression beeinflusst werden kann.

Sievers und Mitarbeiter untersuchten den Effekt von einmaliger kurzzeitiger Durchblutung der Pulmonalarterien zu Beginn des KPB mit

gekühltem, oxygeniertem Blut auf die postoperative Lungenfunktion an 24 Patienten. Es zeigte sich, dass sich die kurzzeitige Durchblutung kombiniert mit Ultrafiltration des Blutes den postoperativen alveolär-arteriellen Sauerstoffgradienten deutlich verbesserte (Sievers et al. 2002).

Einen solchen positiven Effekt im Sinne einer geringeren IL8-Expression konnte in der hier vorliegenden Arbeit nur zum Zeitpunkt T2 im Vergleich zwischen den Tieren ohne- und mit kontinuierlicher Pulmoplegie nachweisen. Nur hier waren die Werte der Gruppen im Vergleich statistisch signifikant. Zu den anderen Zeitpunkten gab es keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Ob dieser Unterschied letztendlich auch mit einer Verbesserung der Lungenfunktion nach KPB gleichzusetzen ist, bleibt zu hinterfragen. Hier wären weitere klinische Untersuchungen der Lungenfunktion während des Versuches sinnvoll.

4.2 Histologie

Neutrophile Granulozyten wandern bei entzündlichen Reizen im Lungengewebe aus den Kapillaren zunächst in die interalveolären Septen aus und erscheinen nach etwa 60 Minuten auch in den Alveolen (Downey et al. 1993). Vergleichbar hierzu waren auch in einigen der Lungengewebsproben vermehrt neutrophile Granulozyten zu finden. Die ersten Ansammlungen ließen sich in einem Präparat der Gruppe 2 zum Zeitpunkt T2 erkennen, direkt nach Beendigung beziehungsweise 60 Minuten nach Beginn des Bypasses. Zu den späteren Biopsieentnahmezeiten fanden sich in mehreren Proben aller drei Versuchsgruppen immer wieder neutrophile Granulozyten, sowohl marginalisierend in den Gefäßen als auch im Interstitium. Eine ähnliche Beobachtung machten Braude und Mitarbeiter in einer Untersuchung an Hunden. Sie beschrieben eine Ansammlung neutrophiler Granulozyten in den Kapillaren der Lunge nach KPB. In der Kontrollgruppe, in der die

Hunde lediglich eine Thorakotomie erhielten, kam es zu keinen lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen des Lungengewebes, so dass sie diese Granulozytenansammlungen als Reaktion auf den Bypass und nicht auf das chirurgische Trauma werteten (Braude et al. 1986). In einem Tiermodell untersuchten Sekido und Mitarbeiter an Kaninchen die Auswirkungen der Reperfusion des Gefäßbettes nach Ischämie auf Lungengewebe von Kaninchen. Es fanden sich zwei Stunden nach Reperfusion Infiltrate aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mit fokalen Fibrinablagerungen in den Alveolen, nach drei Stunden Neutrophilenansammlungen in den interalveolären Septen und in den Alveolen sowie neutrophile Aggregationen in den Gefäßen. Zusätzlich ließ sich ein deutliches Lungenödem und eine Zerstörung der Lungenstruktur beobachten (Sekido et al. 1993). Kim und Mitarbeiter untersuchten lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Veränderungen im Lungengewebe von Schafen nach KPB. Als Veränderungen beschrieben sie ein interstitielles Ödem, Schwellung der Endothelzellen und einen Übertritt von Erythrozyten aus dem Gefäßbett in den Alveolarraum (Kim et al. 2001). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in der hier vorliegenden Arbeit gemacht werden. Es kam neben den schon oben beschriebenen Ansammlungen neutrophiler Granulozyten auch vereinzelt zur Ausbildung eines Ödems sowie zum Übertritt von Erythrozyten in die Alveolen. In den Alveolen waren allerdings in keinem Fall neutrophile Granulozyten zu finden. Als Problem erwies es sich, dass sich im Lungengewebe der Minischweine auch Bereiche mit chronischen Entzündungsherden finden ließen, während Gewebeproben von anderen Bereichen der Lunge des selben Tieres durchaus völlig normales Lungengewebe zeigten. Offensichtlich ist es demnach durchaus möglich, in einigen Biopsieen pathologische Befunde auf dem Boden schon vorher stattgefundenener schädigender Ereignisse zu entdecken. Wie von M. Rinke beschrieben, sind gerade die Lungen der Minischweine empfänglich für Infektionskrankheiten (Rinke 1997). Bedingt durch die nötige Größe der Biopsien in diesem Versuch

war es allerdings nicht möglich, jedes Mal von der selben Stelle der Lungen eine Gewebeprobe zu entnehmen, was für eine bessere Vergleichbarkeit der Gewebeproben in der Auswertung von Vorteil gewesen wäre.

Dennoch stimmen die hier gewonnenen Beobachtungen pathologischer Veränderungen gut mit den schon oben beschriebenen anderer Studien überein, so dass sie mit großer Wahrscheinlichkeit auf den KPB zurückzuführen sind. Unterstützt wird dieses dadurch, dass zum Zeitpunkt T1, also vor dem Bypass, in keinem Fall Entzündungszellen marginalisierend oder interstitiell zu finden waren. Die Dystelektasen sowie emphysematischen Veränderungen lassen sich durch die Beatmung der Tiere erklären.

Schlensak und Mitarbeiter untersuchten in einem Tierversuch an Ferkeln die Auswirkungen der Perfusion der Bronchialarterien während KPB auf das Lungengewebe. In ihren Ergebnissen beschreiben sie eine Verdickung der alveolären Septen sowie eine Anreicherung von Leukozyten, Albumin, Elastase und Laktatdehydrogenase in Bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit nach KPB. Durch die Durchblutung der Pulmonalarterien erreichten sie eine deutliche Reduktion dieser Effekte (Schlensak et al. 2002).

Dem gegenüber konnten Unterschiede im histologischen Bild zwischen den drei Versuchsgruppen zu den selben Zeitpunkten in der hier vorliegenden Untersuchung nicht gezeigt werden. Daraus folgt, dass mit einer Schädigung der Lunge während des KPB unabhängig von den drei hier benutzten Verfahren gerechnet werden muß.

4.3 Beantwortung der Fragestellung

Die in der Einleitung gestellten Fragen lassen sich demnach wie folgt detailliert beantworten:

1. KPB führt direkt zu einer Steigerung der IL8- Genexpression im Lungengewebe. Dieses konnte durch die vorliegende Arbeit eindeutig gezeigt werden.
2. Durch kontinuierliche Perfusion der Pulmonalisstrombahn während des KPB lässt sich direkt nach Ende des Bypasses die IL8- Expression im Lungengewebe verringern. Dieser Effekt ist bei späteren Messungen allerdings nicht mehr nachweisbar, die klinische Relevanz dieses Ergebnisses wäre durch weitergehende Untersuchungen zu überprüfen. Intermittierende Perfusion der Pulmonalisstrombahn bringt keine Veränderung der IL8- Expression im Vergleich zum herkömmlichen Verfahren.
3. Als Folge des KPB finden sich lichtmikroskopische Veränderungen im Sinne von Ansammlungen neutrophiler Granulozyten in den Kapillaren, die im Verlauf ins Interstitium auswandern.
4. Unterschiede im lichtmikroskopischen Bild des Lungengewebes waren durch Modulation der Pulmonalen Perfusion während des KPB nicht erkennbar.

Zusammenfassend betrachtet stellt die Pulmonalisperfusion während KPB einen sinnvollen Ansatz zur Lungenprotektion dar. Dieses wird durch die schon oben erwähnten Untersuchungen von Sievers (Sievers et al. 2002) und Schlensak (Schlensak et al. 2002) unterstützt. Da Sievers und Mitarbeiter aber während den Operationen zusätzlich eine Ultrafiltration des Blutes vornahmen, bleibt auch hier letztendlich ungeklärt, ob die positiven Effekte alleine auf die Perfusion der Pulmonalisstrombahn zurückzuführen sind. Schlensak und Mitarbeiter untersuchten nur die mikroskopischen Veränderungen im Gewebe, die klinischen Veränderungen wurden nicht weiter berücksichtigt. Somit sind weiterführende Untersuchungen über die klinische Relevanz der Pulmonalisperfusion sicher sinnvoll.

5. Zusammenfassung

Operationen unter Nutzung des KPB führen häufig zu Lungenschädigungen, die in der stärksten Ausprägung als ARDS in Erscheinung treten können. Diese Lungenschädigungen werden unter anderem durch IL8, einem bedeutenden Botenstoff in der Entwicklung einer akuten Entzündung, charakterisiert. Ein IL8- Anstieg nach KPB konnte schon in peripherem Blut, Herzmuskelzellen und Bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch direkt im Lungengewebe die IL8- Freisetzung gesteigert wird. Ebenso sollte durch Perfusion der Lungenstrombahn während des Bypasses der Versuch unternommen werden, eine Protektion der Lunge im Sinne einer geringeren IL8- Freisetzung zu erreichen.

Hierzu wurden 20 Minischweine für eine Stunde einem KPB unterzogen. Dabei erhielten 6 Tiere während der Bypassphase keine (Gruppe 1, Kontrollgruppe), 7 Tiere zusätzlich eine intermittierende (Gruppe 2) und 7 Tiere eine kontinuierliche Durchblutung der Pulmonalarterien (Gruppe 3). Lungengewebsproben wurden vor, direkt nach, eine Stunde und drei Stunden nach dem Bypass entnommen. Durch rt-PCR wurde die IL8- Genexpression bestimmt und eine histologische Begutachtung der Gewebsproben durchgeführt.

Es zeigte sich in allen drei Gruppen eine IL8- Expressionssteigerung nach KPB. Direkt nach Beendigung des Bypasses war die IL8- Expressionssteigerung bei den Tieren der Gruppe 3 geringer als bei den Tieren der Gruppe 1. Zu den späteren Zeitpunkten waren keine Unterschiede mehr feststellbar.

Mikroskopisch waren nach Ende des Bypasses bei einigen Tieren aller drei Gruppen Leukozytenansammlungen in den Gefäßen, später auch im Interstitium zu erkennen. Weiter konnte in vielen Proben ein Emphysem beobachtet werden. Zwischen den drei Versuchsgruppen fielen histologisch keine kontinuierlich nachweisbaren Unterschiede auf.

In dieser Untersuchung konnte direkt im Lungengewebe eine IL8-Expressionssteigerung nach KPB gezeigt werden. Dieses wird durch zahlreiche andere Studien unterstützt, die IL8 nach KPB vermehrt fanden; der direkte Nachweis der Expressionssteigerung im Lungengewebe wurde bisher nicht beschrieben. Ob die geringere Expression direkt am Bypassende der Gruppe 3 auch mit einer klinisch nachweisbaren Verbesserung der Lungenfunktion einhergeht, sollte weiter untersucht werden. Studien, die dieses ohne weitere Einflußgrößen betrachten, liegen zur Zeit noch nicht vor.

Die beobachteten Leukozytenansammlungen sprechen für die Entstehung eines akuten entzündlichen Geschehens durch den KPB und decken sich mit ähnlichen Ergebnissen anderer Studien. Die emphysematischen Veränderungen sind sicher auf die maschinelle Beatmung der Tiere während des Versuches zurückzuführen.

6. Literaturverzeichnis

Asimakopoulos G, Smith PL, Ratnatunga CP, Taylor KM: Lung injury and acute respiratory distress syndrome after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999 68: 1107-1115

Asimakopoulos G, Taylor KM, Smith PL, Ratnatunga CP: Prevalence of acute respiratory distress syndrome after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 117: 620-621

Baggiolini M, Dewald B, Moser B: Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997 15: 675-705

Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989 84: 1045-1049

Bando K, Pillai R, Cameron DE, Brawn JD, Winkelstein JA, Hutchins GM, Reitz BA, Baumgartner WA: Leukocyte depletion ameliorates free radical-mediated lung injury after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990 99: 873-877

Burns SA, Newsburger JW, Xiao M, Mayer JE, Walsh AZ, Neufeld JN: Induction of interleukin-8 messenger RNA in heart and skeletal muscle during pediatric cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1995 92 suppl II:315-321

Butler J, Rocker GM, Westaby S: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993 55: 552-559

Braude S, Nolop KB, Fleming JS, Krausz T, Taylor KM, Royston D: Increased pulmonary transvascular protein flux after canine

cardiopulmonary bypass. Association with lung neutrophil sequestration and tissue peroxidation. *Am Rev Respir Dis* 1986 134: 867-872

Brix-Christensen V, Petersen TK, Ravn HB, Hjortdal VE, Andersen NT, Toennesen E: Cardiopulmonary bypass elicits a pro- and anti-inflammatory cytokine response and impaired neutrophil chemotaxis in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001 45:407-413

Cave AC, Manche A, Derias NW, Hearse DJ: Thromboxane A2 mediates pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in the rabbit. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 106(6): 959-67

Chiang CH, Wu K, Yu CP, Yan HC, Perng WC: Cytokine up-regulation in ischaemic / reperfused lungs perfused with University of Wisconsin solution and normal saline. *Clin Sci* 2001 101: 285-94

Christenson JT, Aeberhard JM, Badel P, Pepcak F, Maurice J, Simonet F, Velebit V, Schmuziger M: Adult respiratory distress syndrome after cardiac surgery. *Cardiovasc Surg* 1996 4:15-21

Davies SW, Duffy JP, Wickens DG, Underwood SM, Hill A, Alladine MF, Feneck RO, Dormandy DL, Walesby RK: Time-course of free radical activity during coronary artery operations with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993 105:979-87

Demling RH: The modern version of adult respiratory distress syndrome. *Annu Rev Med* 1995 46: 193-202

Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, Grant IS, Pollok AJ, Haslett C: Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993 13: 643-647

Downey GP, Worthen GS, Henson PM, Hyde DM: Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum. *Am Rev Respir Dis* 1993 147: 168-176

Downing SW, Edmunds LH: Release of vasoactive substances during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992 54: 1236-1243

Drost EM, MacNee W: Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF- α in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol* 2002 32: 393-403

ElAzab SR, Rosseel PMJ, deLange JJ Groeneveld ABJ, van Strik R, van Wijk EM, Scheffer GJ: Dexamethasone decreases the pro- to anti-inflammatory cytokine ratio during cardiac surgery. *Br J Anaesth* 2002 88:496-501

Finn A, Naik S, Klein N, Levinsky RJ, Strobel S, Elliot M: Interleukin-8 and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Surg* 1993 105: 234-241

Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM: Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Ann Intern Med* 1983 98: 593-597

Gibbon JH Jr.: Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 1954 37:171

Goodman ER, Kleinstein E, Fusco AM, Quinlan DP, Lavery R, Livingston DH, Deitch EA, Hauser CJ: Role of interleukin 8 in the genesis of acute

respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis: Arch Surg 1998 133: 1234-1239

Gott JP, Cooper WA, Schmidt FE Jr., Brown WM 3rd, Wright CE, Merlino JD, Fortenberry JD, Clark WS, Guyton RA: Modifying risk for extracorporeal circulation: trial of four antiinflammatory strategies. Ann Thorac Surg 1998;66:747-53

Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H: Inducible nitric oxide production is an adaptation to cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response. Ann Thorac Surg 2001 72: 149-155

Horton SB, Butt WW, Mullaly RJ, Thuys CA, O'Connor EB, Byron K, Cochrane AD, Brizard CP, Karl TR: Il-6 and Il-8 levels after cardiopulmonary bypass are not affected by surface coating. An Thorac Surg 1999 68: 1751-1755

Howard RJ, Crain C, Franzini DA, Hood CI, Hugli TE: Effects of cardiopulmonary bypass on pulmonary leukostasis and complement activation. Arch Surg 1988 123: 1496-1501

Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. Science 1991 254: 99-102

Kalfin RE, Engelman RM, Rousou J, Flack JE, Deaton DW, Kreutzer DL, Das DK: Induction of interleukin-8 expression during cardiopulmonary bypass. Circulation 1993 88: 401-406

Kawamura T, Wakusawa R, Okada K, Inada S: Elevation of cytokines during open heart surgery with cardiopulmonary bypass: participation of

interleukin 8 and 6 in reperfusion injury. *Can J Anaesth* 1993 40: 1016-1021

Kazaz H, Oto O, Sariosmanoglu N, Hazan E: The effects of heparin coated circuits on pulmonary injury. A clinical study. *J Cardiovasc Surg* 2003 44: 611-5

Kim WG, Lee BH, Seo JW: Light and microscopic analyses for ischaemia- reperfusion lung injury in an ovine cardiopulmonary bypass model. *Perfusion* 2001 16: 207-214

Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI Muraoka M, Wang JS, OConnor F, Matsuki A: Cardiopulmonary bypass produces greater pulmonary than systemic proinflammatory cytokines. *Anaesth Analg* 2000 a 90: 1039-1045

Kotani N, Hashimoto H, Sessler DI Muraoka M, Wang JS, OConnor F, Matsuki A: Neutrophil number and interleukin-8 and elastase concentrations in bronchoalveolar lavage fluid correlate with decreased arterial oxygenation after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 2000 b 90: 1046-1051

Kuratani T, Matsuda H, Sawa Y, Kaneko M, Nakano S, Kawashima Y: Experimental study in a rabbit model of ischemia-reperfusion lung injury during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992 103: 564-8

Larson DF, Bowers M, Schechner HW: Neutrophil activation during cardiopulmonary bypass in paediatric and adult patients. *Perfusion* 1996 11: 21-27

MacNaughton PD, Braude S, Hunter DN, Nenison DM, Evans TW: Changes in lung function and pulmonary capillary permeability after cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 1992 20: 1289-1294

Messent M, Sullivan K, Keogh BF, Morgan CJ, Evans TW: Adult respiratory distress syndrome following cardiopulmonary bypass: incidence and prediction. *Anaesthesia* 1992 47:267-8

Millar AB, Armstrong L, van der Linden J, Moat N, Ekroth R, Westwick J, Scallan M, Lincoln C: Cytokine production and hemofiltration in children undergoing cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993 56: 1499-1502

Onoe M, Magara T, Yamamoto Y, Nojima T: Modified ultrafiltration removes serum interleukin-8 in adult cardiac surgery. *Perfusion* 2000 16:37-42

Perrot M de, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, Wigle DA, Keshavjee S: Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 165:211-215

Prasad K, Kalra J, Bharadwaj B, Chaudhary AK: Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery. *Am Heart J* 1992; 123:37-45

Rajaratnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, Baggiolini M, Clark-Lewis I: Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 1994 264: 90-92

Rinke M: How clean is a mini-pig? –Impressions and suggestions of a pathologist working in the field of toxicology. *Pharmacol Toxicol* 1997 80 Suppl 2: 16-22

Ruvolo G, Greco E, Speziale G, Tritapepe L, Marino B, Mollace V, Nistico G: Nitric oxide formation during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1994 57:1055-7

Schlensak C, Doenst T, Preusser S, Wunderlich M, Kleinschmidt M, Beyersdorf F: Cardiopulmonary bypass reduction of bronchial blood flow: a potential mechanism for lung injury in a neonatal pig model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 123:119-1205

Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K: Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993 365: 654-657

Serraf A, Robotin M, Bonnet N, Detruit H, Baudet B, Mazmanian MG, Herve P, Planche C: Alteration of the neonatal pulmonary physiology after total cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997 114: 1061-9

Sham RL, Phatak PD, Ihne TP, Abboud CN, Packman CH: Signal pathway regulation of interleukin-8-induced actin polymerization in neutrophils. *Blood* 1993 82: 2546-2551

Sievers HH, Freund-Kaas C, Eleftheriadis S, Fischer T, Kuppe H, Kraatz EG, Bechtel JFM: Lung protection during total cardiopulmonary bypass by isolated lung perfusion: preliminary results of a novel perfusion strategy. *Ann Thorac Surg* 2002 74: 1167-1172

Takatsuka H, Takemoto Y, Mori A, Okamoto T, Kanamaru A, Kakishita E: Common features in the onset of ARDS after administration of granulocyte colony stimulating factor. *Chest* 2002 121:1716-1720

Tassani P, Schad H, Winkler C, Bernhard A, Ettner U, Braun SL, Eising GP, Kochs E, Lange R, Richter JA: Capillary leak syndrome after cardiopulmonary bypass in elective, uncomplicated coronary artery bypass grafting operations: Does it exist? *J Thorac Cardiovasc Surgery* 2002(a) 123: 735-741

Tassani P, Barankay A, Haas F, Paek SU, Heilmaier M, Hess J, Lange R, Richter JA: Cardiac surgery with deep hypothermic circulatory arrest produces less systemic inflammatory response than low-flow cardiopulmonary bypass in newborns. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 2002(b) 123:648-654

Wachtfogel YT, Kucich U, Greenplate J, Gluszko P, Abrams W, Weinbaum G, Wenger RK, Rucinski B, Niewiarowski S, Edmunds LH Jr: Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation. *Blood* 1987 69: 324-330

Wan S, LeClerk JL, Vincent JL: Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg* 1997 (a) 63: 269-276

Wan S, LeClerc JL, Vincent JL: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 1997 (b) 112: 676-692

Westaby S: Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med* 1987 13: 89-95

Zehr KJ, Poston RS, Lee PC, Uthoff K, Kumar P, Cho PW, Gillinov AM, Redmond JM, Winkelstein JA, Herskowitz A et al.: Platelet activating factor inhibition reduces lung injury after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995 59:328-35

Zhu ZG, Wang MS, Jiang ZB, Jiang Z, Xu SX, Ren CY, Shi MX: The dynamic change of plasma endothelin-1 during the perioperative period in patients with rheumatic valvular disease and secondary pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994 108:960-8

7. Abkürzungsverzeichnis

ACT	Activated- clotting- time
ARDS	Adult-Respiratory-Distress-Syndrome
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLM	Herz-Lungenmaschine
IE	Internationale Einheit
IL8	Interleukin 8
KG	Körpergewicht
KPB	Kardiopulmonaler Bypass
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transskription

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. E. Vollmer, für die Überlassung des Arbeitsplatzes, die Bereitstellung der Materialien, für das Thema dieser Arbeit und die Ratschläge und Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank meinem Betreuer, Herrn Dr. T. Goldmann, für seine konstruktive Kritik, Hilfen und Anregungen für diese Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt dem Laborteam der Pathologie Borstel, insbesondere Frau H. Kühl für die Einführung in die labortechnischen Arbeitstechniken, Frau W. Martens für die Anfertigung der histologischen Präparate und Frau Dr. E. Richter vom Referenzzentrum für Mykobakteriologie, die freundlicherweise die Sequenzierung der PCR_Produkte übernahm.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Galle, der mich bei der Begutachtung der histologischen Präparate unterstützte.

Herrn Prof. Dr. H.H. Sievers, Klinik für Herzchirurgie, Uniklinik Lübeck, danke ich für die Ermöglichung des tierexperimentellen Teils. Herrn Dr. R. Leyh und Herrn Dr. M. Bechtel für die chirurgische Durchführung der Operationen. Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Anaesthesie und der Abteilung für Kardiotechnik für ihre Teilnahme an den Versuchsreihen.

Lebenslauf

Joachim Mosel

21.07.1974	geboren in Celle
1981	Einschulung
1994	Schulabschluß mit dem Abitur am Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium Celle
1994-1995	Zivildienst beim paritätischen Wohlfahrtsverband Celle
1995	Immatrikulation an der Medizinischen Universität zu Lübeck
1999	1.Staatsexamen
2001	2.Staatsexamen
2002	3.Staatsexamen
2001-2002	Praktisches Jahr
1. Tertial	Chirurgie, Uniklinikum Lübeck
2. Tertial	Orthopädie, Uniklinikum Lübeck
3. Tertial	Innere Medizin, Ostholstein Kliniken, Eutin
2002-2004	Arzt im Praktikum Klinikum Neustadt, Orthopädie
2004	Vollapprobation erteilt
seit 2004	Assistenzarzt im Klinikum Neustadt, Orthopädie