

Aus der  
Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik  
im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Direktor:  
Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Analyse des spezifischen Flüssigkeitsgehaltes von  
fetalen Kaninchenlungen mittels Destillation, nach  
praenataler intrapulmonaler Instillation von  
Perfluorooctylbromid

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Florian Gerd Josef Bergmann  
aus  
München

München, den 27.01.2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Vera von Dossow-Hanfstingl

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. med. Holger Till  
Priv. Doz. Dr. med. O. Münsterer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2011

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
2. Kongenitale Zwerchfellhernie	5
2.1. Krankheitsbild	5
2.2. Konventionelle Therapie	6
2.3. Experimentelle Therapie	7
3. Perfluorcarbone	11
3.1. Verwendung von Perfluorcarbonen in der Medizin	12
3.2. Pulmonale Applikation von Perfluorcarbonen	14
4. Untersuchung der fetalen Lunge	16
5. Destillation	17
6. Fragestellung	19
7. Material und Methodik	20
7.1. Praenatale Instillation von Perfluorocetyl bromid	20
7.1.1. Versuchsgruppen	20
7.1.2. Versuchsdurchführung	21
7.1.3. Probenentnahme	22
7.2. Durchführung der Destillation	24
7.2.1. Bestimmung des Lungengesamtgewichtes	24
7.2.2. Destillationsaufbau	25
7.2.3. Ablauf der Destillation	26
7.2.4. Erfassung des Destillates	26
7.2.5. Ermittlung des Lungentrockengewichtes	29
7.2.6. Verlust	29
7.2.7. Aufbereitung der Destillationsapparatur	29
7.3. Kohlendioxyd Messung	30
7.4. Nachrocknung	30
7.5. Messgenauigkeitsuntersuchung	31
8. Auswertung und Ergebnisse	34
8.1. Messergebnisse	34

8.1.1. Untersuchung der fetalen Lungen	34
8.1.1.1. Untersuchte Proben	36
8.1.1.2. Messergebnisse der fetalen Lungen	37
8.1.1.3. Ergebnisse der CO <sub>2</sub> -Messung	42
8.1.1.4. Ergebnisse der Nachtrocknung	43
8.1.2. Ergebnisse der Messgenauigkeitsuntersuchung	43
8.2. Statistik	48
8.2.1. Statistische Methoden	48
8.2.2. Ergebnisse der statistischen Auswertung	49
9. Diskussion	51
9.1. PFOB- und Wasser-Gehalt	51
9.2. Massenverlust	55
10. Schlussfolgerung und Ausblick	59
10.1. Möglichkeiten zur Optimierung	60
10.2. Alternative Methoden	61
Zusammenfassung	64
Literaturverzeichnis	68
Anhang	76

## **1. Einleitung**

Die Lunge nimmt in der Perinatalperiode eine besondere Stellung ein. Als einziges Organ nimmt sie ihre eigentliche Funktion erst unmittelbar mit der Geburt auf. Dabei muss, mit dem Wegfall der Sauerstoff-Versorgung über die Plazenta, die Lunge innerhalb kürzester Zeit den Gasaustausch für den gesamten Organismus übernehmen.

Diese Umstellung von einem sekretorischen auf ein für den Gasaustausch geeignetes Organ beinhaltet den Wechsel hin zu einem parallelen pulmonalen und systemischen Blutkreislauf, die Entfaltung der Alveolen und ihre Füllung mit Luft sowie die Produktion von Surfactant, um ein erneutes Kollabieren der Alveolen zu verhindern. [4]

Der Entwicklungs- und Reifegrad der Pneumozyten ist dabei von entscheidender Bedeutung. Die Unreife der Lunge ist somit ein wesentlicher Faktor der mit einer Frühgeburt assoziierten Morbidität und Mortalität. [3]

Alveoläre Distension, Atemtätigkeit und pulmonaler Blutfluss spielen sowohl bei der Regulation des prae-, als auch des postnatalen Lungenwachstums eine wichtige Rolle. Die Sauerstoffabsorptionskapazität beim Neugeborenen ist dabei sowohl vom Reifegrad, als auch

von der Größe und der damit verbundenen Gasaustauschfläche der Lungen abhängig.

Die Lungenhypoplasie als isoliertes Krankheitsbild ist selten. Meist ist sie sekundär durch Erkrankungen bedingt, welche über eine intrathorakale Raumforderung das Lungenwachstum behindern. Dazu zählen angeborene Fehlbildungen wie die zystisch-adenomatoide Malformation, intrathorakale Zysten und Tumore sowie, in Einzelfällen, Kardiomegalie und Pleuraergüsse.

Auch bei massiven kongenitalen Defekten der Bauchwand oder bei einem ausgeprägten Oligohydramnion kann eine Hypoplasie der Lungen beobachtet werden. Letzteres verdeutlicht die elementare Bedeutung der alveolären Distension für das Lungenwachstum, da ein Verlust der intraalveolären Flüssigkeit in die Amnionhöhle zur Hypoplasie durch ein Absinken des intaalveolären Druckes führt. [7, 21] Zum Oligohydramnion selbst kommt es beispielsweise beim vorzeitigen Blasensprung, bei schwerer Plazentainsuffizienz oder bei der renalen Agenesie (vgl. Potter Syndrom).

Charakteristisch ist die Lungenhypoplasie aufgrund einer kongenitalen Zwerchfellhernie. [3]

## 2. Kongenitale Zwerchfellhernie

### 2.1. Krankheitsbild

Die kongenitale Zwerchfellhernie ist eine komplexe angeborene Fehlbildung. Wird der Pleuroperitonealkanal nicht durch die Pleuroperitonealmembran verschlossen, kommt es zu einer inkompletten Zwerchfellformation, wobei Teile der Intraabdominalorgane in die Thoraxhöhle übertreten können. [23] Das Ausmaß sowie der Zeitpunkt der Herniation sind dabei sehr variabel. Abhängig vom Volumen der in den Thorax übergetretenen Eingeweide, und einem frühen Auftritt der Herniation im Verlauf der Lungenentwicklung kommt es zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Lungenhypoplasie mit Verminderung des gesamten Lungenvolumens und der Bronchial-verzweigungen sowie einer Rarefizierung des pulmonalen Gefäßbettes bei gleichzeitiger Hypertrophie der Muskulatur in der Pulmonalarterienwand. Diese Veränderungen betreffen sowohl die Seite der Hernie, als auch, in geringerem Ausmaß, die kontralaterale Lunge.

Mit einer Inzidenz zwischen 1:2000 und 1:4000 handelt es sich um eine seltene, aber schwerwiegende Erkrankung. [5, 36]

Festgestellt wird die Zwerchfellhernie heutzutage meist in der pränatalen Sonographie. Das mittlere Gestationsalter bei Diagnosestellung liegt dabei um die 24. Schwangerschaftswoche. [15, 39] Aufgrund praediktiver Faktoren wie der Herniation der Leber sowie dem Verhältnis der Lungenfläche der kontralateralen Lunge zum fetalen Kopfumfang, ist auch in dieser Phase bereits eine Aussage über die zu erwartenden Morbidität und Mortalität möglich. [22, 30, 35]

Die Überlebensrate liegt bei natürlichem Verlauf, vorwiegend bedingt durch die Lungenhypoplasie, historisch gesehen, zwischen 20% und 27%. [38] Auch bei Anwendung von speziellen Therapieverfahren liegt die Mortalität dieser Fehlbildung bei den am schwersten betroffenen Patienten noch immer um die 60%. Eine Zahl, die sich trotz der medizinischen Entwicklung in den vergangenen 30 Jahren nicht wesentlich verändert hat. [36]

## 2.2. Konventionelle Therapie

Seit den ersten berichteten chirurgischen Verschlüssen von Zwerchfellhernien in den 40er Jahren galt das Krankheitsbild lange als chirurgischer Notfall. Erst

Mitte der 80er Jahre, als man die Bedeutung der Lungenhypoplasie und der Veränderungen im Lungegefäßbett erkannte, verlagerte sich der Fokus der Therapie auf die respiratorische Stabilisierung der Patienten noch vor dem eigentlichen chirurgischen Defektverschluß. [43]

Eine wesentliche Rolle hierbei spielen seitdem zum einen apparative Therapieoptionen wie die Hochfrequenz-Beatmung, die NO-Beatmung und die extrakorporale Sauerstoffversorgung (Extra-Corporeal Membrane Oxygenation; ECMO), zum anderen stellen die aktuellen Behandlungsregime die Minimierung des Beatmungstraumas beispielsweise durch eine permissive Hyperkapnie in den Vordergrund. Eine wesentliche Verbesserung der Überlebensrate, gerade bei den am schwersten betroffenen Patienten konnte hierdurch jedoch nicht erreicht werden. [19, 36]

### 2.3. Experimentelle Therapie

Der schwere natürliche Verlauf und die schwierige postnatale Behandlung dieser Kinder sowie die Möglichkeit der praenatalen Diagnose und Stratifizierung machen eine fetale Intervention bei diesem Krankheitsbild interessant. Das Ziel hierbei ist

die Induktion von Lungenwachstum bereits vor der Geburt, um die postnatal zur Verfügung stehende Gasaustauschfläche zu vergrößern und die Lungereifung zu verbessern.

1990 wurde erstmals von einem fetal-chirurgischen Eingriff mit dieser Indikation berichtet. [18] Es handelte sich dabei um eine offene Rekonstruktion des Zwerchfell-Defektes. Da sich im Rahmen einer klinischen Studie jedoch kein verbessertes Outcome gegenüber der postnatalen Therapie zeigte und es bei sämtlichen Fällen mit Durchtritt der Leber durch den Defekt bei der Reposition des Organs zu einem Abknicken der Umbilikalvene und damit zum Tod der Feten kam, wurde dieser Therapieansatz wieder verlassen. [38]

Im Verlauf der Erforschung der Pathophysiologie der Zwerchfellhernie wurde in Experimenten entdeckt, dass eine Okklusion der fetalen Trachea das Lungenwachstum beschleunigt und zu einer Lungenhyperplasie führt. [7] Da sich mit dieser Technik im Tiermodell sowohl eine Vergrößerung als auch eine funktionelle Verbesserung der Lungen erreichen ließ, wurde das Verfahren in die fetale Therapie beim Menschen übertragen. Dabei wurde, zunächst über eine Hysterotomie und einen ventralen Zugang zur fetalen

Trachea, diese mit zwei externen Clips bis zur Geburt verschlossen. [13] Da der offene Zugang zur Trachea durch seine Invasivität am graviden Uterus zu einer signifikanten Erhöhung der Frühgeburtlichkeit mit sämtlichen assoziierten Komplikationen führte, wurde die Video-unterstützte fetale Endoskopie (FETENDO) entwickelt. [6, 41] Obwohl sich hierdurch ein verbessertes Lungenwachstum erzielen ließ, erwies sich die externe tracheale Okklusion mit Hilfe von Clips als zu aufwendig und traumatisch für Mutter und Kind. Um den Eingriff zu vereinfachen und gleichzeitig die fetale Trachea zu schonen, bedient sich die praepartale Therapie derzeit eines endoskopisch platzierten Ballons zum Verschluss der Trachea, welcher über einen einzigen Port eingebracht wird. Dieses Verfahren wird aufgrund guter erster Ergebnisse derzeit in einzelnen Zentren durchgeführt und im Rahmen eines, von der Europäischen Gemeinschaft geförderten, Programms (EUROFETUS) weiter untersucht. [20]

Um nach der Geburt eine normale Atmung zu ermöglichen muss die tracheale Okklusion vor dem ersten Atemzug wieder entfernt werden. Hierzu bedient man sich zum einen der so genannten extrauterinen intrapartum Prozedur (Ex Utero Intrapartum Treatment; EXIT bzw. Operating On Placental Support; OOPS):

Unter Belassung der plazentaren Versorgung werden dabei bei einer Sectio caesarea zunächst nur der Kopf und die Schultern entwickelt, die tracheale Okklusion entfernt, das Kind intubiert, Surfactant instilliert und mit der maschinellen Beatmung begonnen. Sobald hierunter die Sauerstoffsättigung ansteigt, wird das Kind vollständig entwickelt und abgenabelt. Da die tracheale Okklusion zwar ein Lungenwachstum induziert, im Gegenzug aber auch die Ausreifung der, für die Surfactantproduktion notwendigen, Typ II Pneumozyten hemmt [24], wird in den aktuellen Protokollen, wenn möglich, eine praenatale Entfernung des eingebrachten Ballons angestrebt. [20]

Die Ergebnisse der EUROFETUS Gruppe zeigen, dass die praenatale Therapie der Zwerchfellhernie durchaus eine weitere Verbesserung der Behandlung dieses Krankheitsbildes darstellt. Die Ballonokklusion erfordert dabei jedoch 2 fetale Eingriffe, mit deutlicher Zunahme der Frühgeburtlichkeit, und auch die Entfernung des Ballons bringt ein nicht unerhebliches Risiko mit sich. [20] Zur weiteren Reduktion der Invasivität muss nach neuen Therapieansätzen gesucht werden. Einen solchen verspricht möglicherweise der Einsatz von Perfluorcarbonen. [12, 29, 31]

### 3. Perfluorcarbone

Fluorcarbone leiten sich aus Kohlenwasserstoffverbindungen durch den Austausch von Wasserstoff mit Fluor ab. Bei Perfluorcarbonen (PFC) sind dabei sämtliche an Kohlenstoff gebundene Wasserstoffatome durch Fluoratome ersetzt. Der Begriff bezeichnet eine ganze Gruppe von gasförmigen, festen und flüssigen Stoffen, von denen der Bekannteste wohl Polytetrafluorethylen (Teflon®) ist.

Zur eingehenden Erforschung und Entwicklung von industriellen Syntheseverfahren kam es während des 2. Weltkrieges im Rahmen des Manhattan Projects, als man glaubte, die chemische Stabilität und niedrige Löslichkeit dieser Stoffe könnten bei der Uran-Isotopentrennung nützlich sein. [1]

Die hierbei medizinisch interessanten Perfluorcarbone sind vorwiegend klare, farb- und geruchslose Flüssigkeiten. Diese sind physikalisch, chemisch und thermisch sehr stabil. Sie sind inert, praktisch nicht in Wasser und nur in geringem Umfang in Lipiden löslich. Perfluorcarbone haben, in Abhängigkeit von der Anordnung ihrer Kohlenstoff-Fluor-Verbindungen, unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften. [16]

	Perfluor-n-pentan	Perfluor-methylcycl-o-pentan	Perfluor-n-hexan	Perfluor-methylcycl-o-hexan	Perfluor-1,3-dimethyl-cyclohexan	Perfluor-octan	Perfluor-decalin (cis + trans isomere)	Perfluor-perhydrofluorene	Perfluor-perhydrophenantren	Perfluor-octylbromid
Molmasse g/mol	288	300	338	350	400	438	462	574	624	499
Siedepunkt °C	29	48	57	76	102	104	142	194	215	141
Schmelzpunkt °C	-120	-70	-90	-30	-70		trans > 10 cis < -10	-40	-20	
Dichte kg/l	1,604	1,707	1,682	1,788	1,828	1,78	1,917	1,984	2,03	1,928
Brechungsindex (20 °C)	1,2383	1,265	1,2509	1,2781	1,2895	1,27	1,313	1,3289	1,3348	1,305
Viskosität mPas (25 °C)	0,465	1,049	0,656	1,561	1,919	1,4	5,53	9,58	28,4	2,11
Oberflächenspannung g mN/m	9,4	12,6	11,1	15,4	16,6	14	17,6	19,7	19	18,2
Dampfdruck mbar	862	368	294	141	48	43	8,8	< 1	< 1	10,5
CTSH °C			20	8	21	37	22	30	45	-25
O <sub>2</sub> -Löslichkeit vol.-%				57		48 - 52	40 - 44			49

Tabelle 1: Typische Eigenschaften von Perfluorcarbonen [I]

Eine der Besonderheiten dieser Flüssigkeiten liegt in ihrer hohen Lösungskapazität für Atemgase. Perfluorooctylbromid (PFOB), zum Beispiel, besitzt gegenüber Wasser die 18 fache Löslichkeit für Sauerstoff. Für Kohlendioxyd ist es im Vergleich die 4 fache Menge. [16]

Diese Eigenschaft ermöglicht den, 1966 erstmals nachgewiesenen, Gasaustausch in mit flüssigem Perfluorcarbon gefüllten Lungen von Säugetieren. [9]

### 3.1. Verwendung von Perfluorcarbonen in der Medizin

Die intrapulmonale Applikation von PFC konzentrierte sich zunächst auf die Beatmung, um in erster Linie tief liegende, größtenteils atelektatische, Lungenbezirke durch die Flüssigkeit zu eröffnen und somit wieder für den Gasaustausch zu rekrutieren. Bei der 'Total Liquid

Ventilation' (TLV) werden dabei Tidalvolumina von oxygeniertem PFC mittels spezieller Flüssigkeits-Beatmungsgeräte, entsprechend der normalen Atemluft in und aus der Lunge gepumpt. Bei der 1991 erstmals beschriebenen 'Partial Liquid Ventilation' (PLV) wird die Lunge mit PFC angefüllt, die Beatmung, bzw. die Oxygenierung des PFC, erfolgt dann über ein herkömmliches Beatmungsgerät. [14]

Mittlerweile haben sich die Verwendungen für Perfluorcarbone in der Medizin durch weitere intensive Forschung vervielfacht:

Perfluorocetyl bromid (PFOB), welches, aufgrund seines Brom-Atoms, radiologisch darstellbar ist, kann in Lunge und Gastrointestinaltrakt als Kontrastmittel verwendet werden und ist als solches besonders geeignet zur Detailgewinnung in der so genannten 'Virtuellen Endoskopie' mittels Computertomographie. [27] In der Kernspintomographie stellen sich Perfluorcarbone aufgrund der fehlenden Wasserstoffatome dunkel dar. Eine Besonderheit ist hierbei, dass in PFC gelöster Sauerstoff das MRT-Signal verändert und somit regionale Unterschiede bei der O<sub>2</sub>-Verteilung in der Bildgebung darstellbar sind. [40] Bei der Ultraschalluntersuchung finden, in Mikrobläschen eingeschlossene, Perfluorcarbon-Gase als Kontrastmittel

Verwendung. [25] Flüssige Perfluorcarbone werden in der Ophthalmologie als Glaskörperersatz verwendet. [45]

Auch die Verwendung als alternativer, O<sub>2</sub>-transportierender Blut-Ersatzstoff wird untersucht. [16, 33]

In mehreren experimentellen Modellen und in der klinischen Praxis hat sich außerdem ein anti-inflammatorischer Effekt einer Beatmung mit PFC gezeigt, was sich gerade bei der Behandlung der empfindlichen fetalen und neonatologischen Lungen als benefiziell erweisen könnte. [10, 11, 34, 46]

Auch könnte PFC als Trägermedium bei der intrapulmonalen Applikation von Medikamenten oder bei der Gentherapie eine Rolle spielen. [16, 44]

### 3.2. Pulmonale Applikation von Perfluorcarbonen

Einen besonders interessanten Ansatz bieten die Perfluorcarbone bei der postnatalen Therapie der kongenitalen Zwerchfellhernie.

Schon allein die Beatmung unter Anfüllen der Lungen mit PFC (vgl. PLV ; 3.1.) kann eine Verbesserung der Lungenrekrutierung und damit des Gasaustausches bewirken. [16, 31]

Weitaus viel versprechender ist jedoch die Tatsache, dass durch Distension einer hypoplastischen Lunge mit Perfluorcarbonen ein postnatales Lungenwachstum mit normaler Lungenarchitektur induziert werden kann und sich dabei auch Hinweise auf ein verbessertes Outcome ergeben haben. [12, 42] Im Tierversuch hat sich jedoch gezeigt, dass eine solche Induktion des Lungenwachstums auf die Neugeborenen-Lunge beschränkt bleibt und bei adulten Tieren in dieser Form nicht reproduzierbar ist. [29]

Beobachtungen dieser Art, sowie mehrere der oben dargelegten Therapieansätze machen die Perfluorcarbone auch in der fetalen Therapie interessant.

Um die Basis für eine Forschung in dieser Richtung zu legen ist es jedoch zunächst erforderlich, festzustellen, ob und in welchem Umfang eine Einbringung von PFC in fetale Lungen überhaupt möglich ist.

Bei der Auswertung der Effektivität der einzelnen Methoden wird man mit dem Problem konfrontiert, den PFC-Gehalt der natürlicherweise mit Sekret-gefüllten fetalen Lungen bestimmen zu müssen.

#### 4. Untersuchung der fetalen Lunge

Die fetale Lunge ist, im Gegensatz zur postnatalen Lunge, ein sekretorisches Organ. Während der gesamten Schwangerschaft wird in den peripheren Atemwegen eine mit  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{H}^+$  angereicherte Flüssigkeit mit Hilfe einer  $\text{Cl}^-$ -Pumpe produziert. [4] Das gesamte, sich entwickelnde System von Bronchien und Alveolen wird von dieser Flüssigkeit vollständig ausgefüllt.

Wasser stellt dabei, sowohl im Bezug auf das Volumen, als auch auf das Gewicht den größten Anteil der fetalen Lungen dar.

Der Wassergehalt sowie dessen Verteilung im Gewebe sind von großer physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung.

Die einfachste und gebräuchlichste Methode, um den Wassergehalt von Organen oder Geweben genau zu bestimmen, besteht aus dem Wiegen der frischen Probe und dem anschließenden Trocknen. Die Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem nach ausreichender Trocknung ermittelten Gewicht, stellt die Masse der, bei der verwendeten Temperatur sowie dem vorherrschenden Dampfdruck flüchtigen, in der Probe enthaltenen Flüssigkeiten dar.

Zur alleinigen Bestimmung des Wassergehaltes oder der Trockenmasse eines Gewebes ist dieses Verfahren von hoher Genauigkeit und Effizienz.

Bei der Untersuchung von teilweise mit Perfluorcarbonen angefüllten fetalen Lungen sind die Grenzen des einfachen Trocknens jedoch überschritten, da es in diesem Fall gilt, mehrere Flüssigkeiten in ihren jeweiligen Anteilen aus einer Gewebeprobe zu bestimmen.

Um eine solche Trennung bei der Messung des Flüssigkeitsgehalts zu erreichen, muss nach einem anderen Verfahren gesucht werden.

## **5. Destillation**

Der hier dargelegte Ansatz verwendet eines der ältesten bekannten Trennverfahren: Die Destillation.

Die Prinzipien der Destillation waren bereits in der Antike bekannt. Aristoteles (384 - 322 v. Chr.) beschrieb die Verwendung des Verfahrens zur Gewinnung von Trinkwasser aus Meerwasser sowie die Destillation von Wein. Weiterentwickelt wurde das Verfahren im 1. Jahrhundert n. Chr. in Alexandria, Ägypten, zur Herstellung von ätherischen Ölen. [37]

Die Bezeichnung Destillation leitet sich aus dem Lateinischen von "destillare" (herab tropfen [2]) her und bezieht sich auf den, bei den damaligen Apparaten, einzigen sichtbaren Schritt: Das Abtropfen des Kondensats in das Auffanggefäß.

Im 19. und 20. Jahrhundert erfolgte eine rapide Entwicklung dieser Methode durch die Öl- und petrochemische Industrie, in welcher die Destillation das Haupt-Trennverfahren darstellt und als solches der größte Energiekonsument der Branche ist. [37]

Gängigerweise wird das Verfahren zur Trennung homogener flüssiger Mischungen verwendet.

Die Destillation beruht auf dem Prinzip der Bildung eines 2-Phasen-Systems durch Erhitzen und teilweises Verdampfen. Beim engen Kontakt der 2. Phase zur Mischung kommt es zu einem Massentransfer zwischen den Phasen. Dabei werden die thermodynamischen Bedingungen so gewählt, dass hauptsächlich der zu trennende Anteil in die 2. Phase übertritt. Durch Auskondensieren erfolgt schließlich die Trennung der einzelnen Komponenten. [37]

Da sich Perfluorcarbone praktisch nicht in Wasser lösen und somit keine homogene Mischung der beiden Flüssigkeiten erreicht wird, ist es im hier dargelegten Fall nicht notwendig, die Destillationstemperatur genau

an die unterschiedlichen Siedepunkte von Wasser und PFC anzupassen. Die verwendete Temperatur und Dauer der Destillation muss lediglich eine vollständige Verdampfung sämtlicher flüssiger Bestandteile aus der zu untersuchenden Gewebeprobe gewährleisten. Die Trennung zwischen PFC und Wasser erfolgt nach dem Auskondensieren durch den Unterschied in der Dichte zwischen den beiden Flüssigkeiten.

Dieses Verfahren ist einfach in der Anwendung, kommt mit einem Minimum an apparativer Ausstattung aus, kann die zu untersuchenden Flüssigkeiten voneinander trennen und ist schneller als die herkömmliche Trocknung.

## **6. Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit ist es, eine genaue sowie reproduzierbare Methode zu entwickeln, mit welcher PFOB-gefüllte fetale Kaninchenlungen in ihre festen und flüssigen Bestandteile aufgetrennt, sowie der Flüssigkeitsgehalt der Lungen im Gesamten verlässlich bestimmt werden kann. Gleichzeitig soll dieses Verfahren Flüssigkeiten unterschiedlicher Dichte (insbesondere PFOB und Wasser) voneinander trennen.

Damit wird eine Aussage über den Verbleib von PFOB nach intrapulmonaler Instillation ermöglicht, was indirekt Rückschlüsse auf dessen Verteilung zulässt, um die Basis für die Erforschung der pulmonalen Therapie im oben dargelegten Rahmen zu bilden.

## **7. Material und Methodik**

### 7.1. Praenatale Instillation von Perfluorooctylbromid (PFOB) in fetale Kaninchenlungen

Nach Begutachtung und Genehmigung des Versuchsvorhabens durch das Veterinäramt der Regierung von Oberbayern (AZ 209.1/211-2531-56/1), wurde bei insgesamt 30 trächtigen Weißen Neuseeland Kaninchen am 27. Gestationstag (normale Tragzeit 31 Tage) der Uterus über eine mediane Unterbauch-Laparotomie freigelegt. [28]

#### 7.1.1. Versuchsgruppen

Jeweils 3 vitale Feten eines Muttertieres wurden zu folgenden Eingriffen randomisiert:

- Endotracheale Intubation und Instillation von 1 ml PFOB [I] mit anschließender Ligatur der Trachea (+ Lig).

- Instillation von 1 ml PFOB [I] ohne tracheale Ligatur (- Lig).
- Keine fetale Manipulation (Kontrolle)

Die jeweiligen Muttertiere waren anschließend randomisiert 3 weiteren Gruppen zugeordnet worden:

Entnahme der fetalen Lungen

- direkt nach Instillation (T 0)
- 3 Stunden später (T 3)
- 6 Stunden später (T 6)

### 7.1.2. Versuchsdurchführung

Nach Einleitung der Anästhesie durch eine intramuskuläre Injektion von Medetomidin und Ketamin wurde die Narkose mit Propofol und Ketamin intravenös aufrechterhalten. Zur Tokolyse wurden Atosiban, ein kompetitiver Oxytocin-Rezeptor Antagonist, und Terbutalin als Dauerinfusion verabreicht. Über den gesamten Versuchsverlauf hinweg wurden die Muttertiere kontinuierlich maschinell beatmet und erhielten eine intravenöse Flüssigkeitszufuhr mit NaCl 0,9 % und Glukose 5 %.

Bei den Interventionsgruppen wurde der Uterus auf der antimesenterialen Seite eröffnet und der Kopf der Feten entwickelt. Zur trachealen Ligatur erfolgte der Zugang

über einen ventralen Querschnitt am Hals. Hierüber wurde die Trachea dargestellt und mit einer Ligatur angeschlungen. Die intrapulmonale Instillation von PFOB erfolgte jeweils über eine endotracheale Intubation mit einer 20 G Venenverweilkanüle [Jelco ; VIII]. In der + lig Gruppe wurde diese bei angezogenem Faden zurückgezogen und die Trachea unmittelbar nach Entfernen der Kanüle ligiert.

Nach Instillation wurde der Kopf der Feten in die Amnionhöhle zurückverlagert und der Uterus mittels einer fortlaufenden Naht verschlossen. Die Amnionflüssigkeit wurde mit NaCl 0,9 % ersetzt. Die Vitalität der Feten im weiteren Versuchsverlauf wurde sonographisch kontrolliert.

### 7.1.3. Probenentnahme

Nach Entnahme der Feten entsprechend den randomisierten Zeitintervallen, wurde die PFOB-Verteilung auf Röntgenbildern dokumentiert. (Abbildung 1) Der Großteil der explantierten Lungen war daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und einzeln bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in verschraubten Kunststoffgefäßen aufbewahrt worden, einzelne

Präparate wurden zur histologischen Untersuchung fixiert. [28]

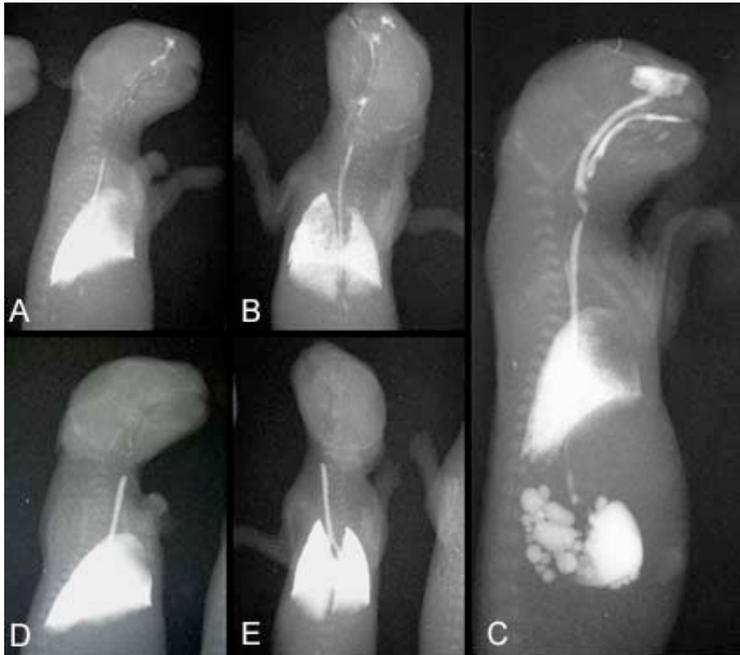


Abbildung 1: PFOB Verteilung ohne (A; B; C) und mit trachealer Okklusion (D; E)

Sowohl das Entnahmeintervall (T 0, T 3, T 6), als auch die Instillation von PFOB und der Ligatur-Status (+ Lig, - Lig, Kontrolle) waren bei Durchführung der Destillation nicht bekannt.

## 7.2. Durchführung der Destillation

Die Destillation wurde an 59 kryo-gelagerten Lungen von fetalen Weißen Neuseeland Kaninchen aus dem unter 7.1. dargelegten Tierversuch durchgeführt.

### 7.2.1. Bestimmung des Lungengesamtgewichtes

Zur Gewichtsbestimmung wurde bei allen Messungen die selbe elektronische Waage [Sartorius Mod. LC 4801 P ; III] verwendet, welche jeweils vor dem Wiegen mittels der angebrachten Libelle nivelliert wurde. Sämtliche ermittelten Werte wurden in Gramm aufgenommen und auf zwei Dezimalstellen genau angegeben.

Die Lungen wurden nach Entnahme aus der Kühlung in das Destillationsgefäß (Abbildung 2 ; A) eingebracht und gewogen. Anschließend wurde vom ermittelten Gewicht das Leergewicht des Destillationsgefäßes subtrahiert, um die Masse der zu destillierenden Lungen zu ermitteln. Die Leergewichte sowohl des Destillationsgefäßes als auch des Auffanggefäßes (Abbildung 2 ; E) wurden vor jeder Messung erneut bestimmt.

## 7.2.2. Destillationsaufbau

Für die Destillation wurde ein Wheaton Micro Kit III (Abbildung 2) verwendet, bestehend aus: Destillationsgefäß (A), Verbindungsadapter (B), wassergekühltem Kondensator (C), Vakuumadapter (D) und Auffanggefäß (E).

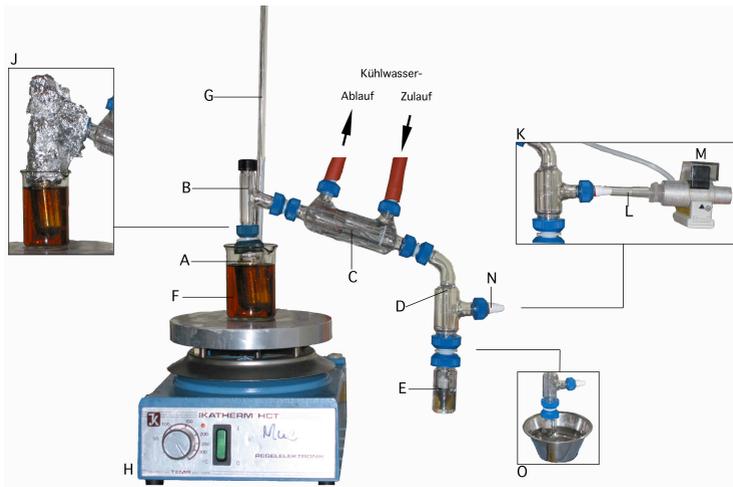


Abbildung 2: Destillationsaufbau

Um ein vorzeitiges Auskondensieren zu vermeiden wurde der Verbindungsadapter zusätzlich mit mehreren Schichten handelsüblicher Aluminiumfolie isoliert (J). Zur Kühlung der Gase im Kondensator wurde kaltes Leitungswasser ( $T = 10,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mit ca. 2 l/min, in dem Gasfluss entgegengesetzter Richtung, durch die äußere Kammer des Kondensators geleitet.

### 7.2.3. Ablauf der Destillation

Um eine möglichst gleichmäßige Erwärmung der Gewebeprobe zu erreichen, wurde das Destillationsgefäß in auf 200 °C erhitztes, hochgereinigtes Silikon-Öl [I] eingetaucht.

Das Silikon-Ölbad wurde mittels einer selbst regelnden elektrischen Heizplatte (Abbildung 2 ; H) [Ikatherm HCT ; IV] auf die erforderliche Temperatur gebracht, welche über den gesamten Verlauf der Destillation konstant gehalten wurde. Die Kontrolle der Temperatur erfolgte mit einem Quecksilber-Thermometer (Abbildung 2 ; G), dessen Reservoir auf Höhe der Gewebeprobe im Silikon-Ölbad fixiert wurde. Das Auffanggefäß wurde in einem Bad aus kaltem Leitungswasser positioniert, (Abbildung 2 ; O) um eine etwaige teilweise Evaporation der bereits herausdestillierten Flüssigkeiten im Verlauf der Messung möglichst gering zu halten.

Die Dauer der Destillation wurde mit jeweils 2 Stunden für eine Probe angesetzt.

### 7.2.4. Erfassung des Destillates

Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Destillationsgefäß aus dem Ölbad genommen und das Auffanggefäß von der Destillationseinrichtung abgeschraubt. Nach

sorgfältigem Abtrocknen des Gefäßäußeren wurde zunächst das Auffanggefäß in vollem Zustand gewogen und das Gesamtgewicht des Destillats wiederum durch Subtraktion des zuvor ermittelten Leergewichts errechnet.

War in der untersuchten Probe PFC enthalten, so wies das Destillat zwei getrennte Phasen auf. (Abbildung 3)



Abbildung 3: Destillat

Zunächst wurde die untere der zwei Flüssigkeitsphasen mittels einer 1 ml Spritze [Plastipak ; V] und einer 24 G Nadel [Microlance 3 ; V] aus dem Auffanggefäß entfernt, das Volumen an der Skala abgelesen und in

Milliliter auf zwei Dezimalstellen genau notiert. Anschließend wurde das Auffanggefäß erneut gewogen und der so gemessene Wert vom zuvor ermittelten Gesamtgewicht des Destillates subtrahiert. Das Ergebnis dieser Rechnung wurde als das Gewicht des destillierten PFOB angenommen, wenn die Werte für Gewicht und Volumen mit der Dichte von PFOB ( $1,9 \text{ gr/cm}^3$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) übereinstimmten.

Anschließend wurde in der oben angeführten Weise auch die zweite Flüssigkeitsphase mit einer weiteren Spritze aus dem Auffanggefäß entfernt. Auch von dieser Phase wurde das Volumen notiert. Dabei wurden für sämtliche Messungen jeweils dieselben Spritzen und Nadeln für PFOB sowie für Wasser verwendet.

Das Leergewicht des Auffanggefäßes wurde erneut bestimmt und von dem nach Entfernung der unteren Phase gemessenen Gewicht abgezogen. Der so ermittelte Wert wurde als das Gewicht des destillierten Wassers angenommen.

In den Fällen, in denen sich im Auffanggefäß nur eine einzige Flüssigkeitsphase befand wurde diese mit der Spritze für Wasser entnommen und nach Subtraktion des Leergewichtes vom gemessenen Gesamtgewicht, der errechnete Wert als der von destilliertem Wasser

angenommen, wenn Masse und Volumen der Dichte von Wasser entsprachen ( $0,997 \text{ g/cm}^3$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 7.2.5. Ermittlung des Lungentrockengewichtes

Nach Abschluss der Messung wurde auch das Destillationsgefäß von der Einrichtung abgeschraubt und das an der Außenseite verbliebene Silikon-Öl sorgfältig abgetrocknet. Das Gefäß wurde anschließend samt dem Rest der Gewebeprobe gewogen. Der durch Subtraktion des zuvor ermittelten Leergewichtes errechnete Wert wurde als das Gewicht des Geweberestes notiert.

#### 7.2.6. Verlust

Die Differenz zwischen dem vor der Messung ermittelten Gesamtgewicht der Lungen und der Summe der Gewichte von Rest und gesamtem Destillat wurde als Verlust angegeben.

#### 7.2.7. Aufbereitung der Destillationsapparatur

Abschließend wurden das Innenrohr des Kondensators sowie das Überleitungsrohr mit 2 ml Wasser gespült, um in der aufgefangenen Spülflüssigkeit PFOB, welches

als Niederschlag in der Destillationseinrichtung verblieben war festzustellen.

Nach jeder Messung wurde der gesamte Destillationsaufbau zerlegt und sorgfältig mit Kompressen gereinigt, um ihn von Rückständen zu befreien.

### 7.3. Kohlendioxyd Messung

Um die CO<sub>2</sub> Produktion im Verlauf der Destillation zu bestimmen, wurde bei der Messung von 7 Lungen ein CO<sub>2</sub>-Meßfühler (Abbildung 2 ; M) über einen gekürzten Endotrachealtubus [VI] (Abbildung 2 ; L) an die Druckausgleichsöffnung (Abbildung 2 ; N) des Vakuumadapters angeschlossen. (Abbildung 2 ; K) Die CO<sub>2</sub>-Messung erfolgte kontinuierlich mittels eines Monitors [Sirecust 404 - 1 A ; VII] mit Kapnometrie-Einschub [VII] über den gesamten Verlauf der Destillation. Der Messwert des Monitors wurde alle 5 Minuten notiert.

### 7.4. Nachtrocknung

Um einen eventuellen Verbleib von Flüssigkeit im Lungengewebe nach Beendigung der Destillation auszuschließen, wurden die Reste von insgesamt

6 Gewebeproben nach Abschluss der Messung nachgetrocknet.

Dazu wurde der Rest, noch im abgeschraubten Destillationsgefäß, in eine Schale aus Metall gelegt, welche auf einen Heizkörper gestellt wurde. Die Temperatur in der Schale lag dabei, mit einem beigelegten Quecksilber-Thermometer gemessen, während der Trocknung bei etwa 30 °C.

Von den ausgewählten Gewebeproben wurden drei jeweils über 24 h getrocknet, zwei über 48 h und eine über 12 Tage. Anschließend wurde das Destillationsgefäß samt Rest erneut gewogen und das Gewicht mit dem auf die gleiche Weise zuvor ermittelten Wert verglichen.

#### 7.5. Messgenauigkeitsuntersuchung

Die Sensitivität sowie die Genauigkeit der Destillation beim Nachweis von PFOB aus Gewebeproben wurden durch eine zweite Messreihe überprüft.

Dazu wurden aus einer adulten Rinderlunge 44 etwa gleich große Proben entnommen. Die Gewichte der einzelnen Stücke wurden dabei so gewählt, dass sie mit den zuvor untersuchten fetalen Kaninchenlungen vergleichbar waren.

Die Gewebeproben wurden in beschriftete und leer gewogene Kunststoffgefäße eingebracht. In diesen wurden sie mit Hilfe einer 1 ml Spritze [Plastipak ; VI] und einer 24 G Nadel [Microlance 3 ; VI] mit einer definierten Menge an PFOB beimpft. (Abbildung 4) Dabei wurden die Mengen 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml und 0,3 ml jeweils einer Gruppe von vier Proben zugegeben. Die Behälter wurden daraufhin verschraubt, erneut gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte auch hier bei - 20 °C.



Abbildung 4: Probenpräparation zur Bestimmung der Messgenauigkeit

Sowohl vor dem Einlagern, als auch direkt nach der Entnahme wurden die Gefäße gewogen, um etwaige Verluste, über die Dauer der Lagerung hinweg, feststellen zu können.

Mit zunehmendem PFOB-Volumen kam es bei der Beimpfung zum Austritt von PFOB aus der Lungenprobe und damit zu einem teilweisen Verbleib des Perflourcarbons in den Probengefäßen. Deshalb

wurde für die PFOB-Mengen über 0,3 ml den schockgefrorenen und bei - 20 °C gelagerten Rinderlungenproben das PFOB erst im Destillationsgefäß zugegeben und danach das Gesamtgewicht bestimmt. Auf diese Weise wurden die Mengen 0,4 ml, 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml sowie 1,0 ml PFOB wiederum jeweils vier Lungenproben zugegeben. Die Destillation wurde in der oben dargelegten Weise durchgeführt.

## **8. Auswertung und Ergebnisse**

### **8.1. Messergebnisse**

#### **8.1.1. Untersuchung der fetalen Lungen**

Das Einbringen des Destillationsgefäßes mit der frisch aus der Kühlung entnommenen Probe führt im vor geheizten Ölbad zu einem Absinken der, über das Quecksilber-Thermometer gemessenen, Temperatur um bis zu 10 °C.

Bereits unmittelbar nach dem Eintauchen in das aufgeheizte Silikon-Öl kann an der im Destillationsgefäß befindlichen Probe ein Ausschwitzen von Flüssigkeit beobachtet werden. Diese beginnt sofort zu sieden. Die in dieser frühen Phase aufsteigenden Dämpfe

kondensieren noch auf dem Weg nach oben durch den Verbindungsadapter aus und tropfen in das Auffanggefäß zurück, wo sie abermals verdampfen.

Die Gewebeprobe nimmt zunächst an Volumen zu und verliert die durch das Probengefäß beim Einfrieren angenommene Form. Außerdem verfärbt sich das Gewebe bräunlich, beginnend mit den exponierten bzw. randständigen Arealen. Die Probe wird zunehmend dunkler, bis am Ende nur noch ein verkohlter Rest zurück bleibt.

Bereits nach etwa 5 Minuten nimmt das Rücktropfen aus dem Verbindungsadapter mit dessen Erwärmung ab und am proximalen Ende des Kondensators bildet sich ein leichter Niederschlag. Im weiteren Verlauf der Messung nimmt das Zurücktropfen weiter ab und der Niederschlag im Kondensator zu. Dabei lassen sich teilweise im Lumen des Kondensators Dämpfe beobachten. Nach ca. 10 Minuten kommt es zum ersten Abtropfen von Destillat in das Auffanggefäß. Fünfzehn Minuten nach Beginn der Destillation hat sich, bei Vorhandensein von PFOB in der Probe, bereits ein Spiegel im Auffanggefäß gebildet und die Temperatur im Silikon-Ölbad ist wieder auf den Ausgangswert von 200 °C gestiegen.

Das Abtropfen der Flüssigkeit nimmt mit fortschreitender Messdauer ab und sistiert in der zweiten Stunde der Destillation.

Der zeitliche Ablauf dieser Ereignisse variiert dabei mit der Größe der untersuchten Gewebeprobe.

#### 8.1.1.1. Untersuchte Proben

Insgesamt wurden 59 Lungen mit dem oben dargelegten Verfahren untersucht.

Nicht gewertet wurde die mit 0,18 Gramm kleinste Probe BIY7 Fet 5 (Kontrolle ; T 6). Hier konnte kein Destillat im Auffanggefäß gesammelt werden. Da sich im Kondensator ein geringer Niederschlag zeigte, wurde dieser nach der Messung gewogen, anschließend in der üblichen Weise gespült, mit Kompressen abgetrocknet und erneut gewogen. Es ergab sich eine Differenz von 0,05 gr, die als destilliertes Wasser angenommen wurde, nachdem sich in der Spülflüssigkeit kein Hinweis auf PFOB fand.

Da dieser Wert auf eine von den Anderen abweichende Weise bestimmt wurde, geht das Ergebnis dieser Messung nicht in die folgende Auswertung mit ein.

Die Auswertung umfasst somit 58 fetale Lungen, davon 23 mit PFOB-Instillation und Trachea-Ligatur (+ Lig), 28

mit PFOB Instillation ohne Trachea-Ligatur (- Lig) und 7 Kontrollen. Die Verteilung der Gruppengrößen nach den Explantationszeitpunkten geht aus Tabelle 2 hervor.

	+ Lig	- Lig	Kontrolle
T0	6	7	3
T3	6	7	2
T6	11	14	2
<b>Gesamt</b>	<b>23</b>	<b>28</b>	<b>7</b>

Tabelle 2: Gruppenstärken

#### 8.1.1.2. Messergebnisse der fetalen Lungen

Das Gewicht der ausgewerteten fetalen Lungenproben vor der Destillation betrug zwischen 0,39 gr und 2,09 gr (Mittelwert: 1,07 gr).

Im Bezug auf den zeitlichen Verlauf innerhalb der einzelnen Gruppen ist bei allen Gruppen eine Abnahme des durchschnittlichen Lungengewichtes über die Zeit zu beobachten (Tabelle 3).

	+ Lig	- Lig	Kontrolle
T0	1,66 gr	1,11 gr	1,17 gr
T3	1,07 gr	1,05 gr	0,86 gr
T6	0,84 gr	0,84 gr	0,49 gr

Tabelle 3: Mittelwerte der Einwaage

Die gemessenen Werte sind einzeln in Tabelle 4 aufgeführt:

Probe	Gruppe	Ligatur	Destillat	PFC	H <sub>2</sub> O	Verlust	Rest
BKG9 Fet 7	T 0	Keine Lig.	0,54	0,07	0,47	0,19	0,07
BKG9 Fet 3	T 0	Keine Lig.	0,61	0,03	0,58	0,25	0,1
BJV4 Fet 3	T 0	Keine Lig.	0,88	0,08	0,8	0,23	0,12
BJV4 Fet 1	T 0	Keine Lig.	1,36	0,49	0,87	0,25	0,12
BJV4 Fet 6	T 0	Keine Lig.	0,65	0,23	0,42	0,23	0,07
BIG2 Fet 1	T 0	Keine Lig.	0,87	0,24	0,63	0,21	0,1
BIG2 Fet 5	T 0	Keine Lig.	0,61	0,13	0,48	0,23	0,07
BLX6 Fet 9	T 3	Keine Lig.	1,21	0,69	0,52	0,22	0,08
BLX6 Fet 10	T 3	Keine Lig.	1,12	0,55	0,57	0,18	0,09
BIJ3 Fet 8	T 3	Keine Lig.	0,37	0,06	0,31	0,2	0,09
BLX6 Fet 3	T 3	Keine Lig.	0,62	0,16	0,46	0,22	0,09
BIN3 Fet 1	T 3	Keine Lig.	0,37	0,04	0,33	0,24	0,06
BIJ3 Fet 3	T 3	Keine Lig.	0,74	0,26	0,48	0,24	0,09
BIC2 Fet 2	T 3	Keine Lig.	0,82	0,07	0,75	0,2	0,1
OPCH Fet 10	T 6	Keine Lig.	0,29	0,02	0,27	0,24	0,12
OPCH Fet 1	T 6	Keine Lig.	0,47	0,15	0,32	0,29	0,07
OPCH Fet 6	T 6	Keine Lig.	0,84	0,4	0,44	0,19	0,06
OPCI Fet 8	T 6	Keine Lig.	0,88	0,06	0,72	0,28	0,1
BUA9 5	T 6	Keine Lig.	0,48	0,12	0,36	0,2	0,07
BUA9 6	T 6	Keine Lig.	0,52	0	0,52	0,11	0,11
OPCH Fet 4	T 6	Keine Lig.	0,59	0,16	0,43	0,23	0,07
AHX1 Fet 8	T 6	Keine Lig.	0,32	0,09	0,23	0,23	0,07
OLXF Fet 9	T 6	Keine Lig.	0,57	0,26	0,31	0,21	0,09

Probe	Gruppe	Ligatur	Destillat	PFC	H <sub>2</sub> O	Verlust	Rest
BIY7 Fet 1	T 6	Keine Lig.	0,35	0,08	0,27	0,24	0,08
BIY7 Fet 4	T 6	Keine Lig.	0,44	0,09	0,35	0,21	0,07
OPCI Fet 5	T 6	Keine Lig.	0,73	0,4	0,33	0,28	0,07
AHX1 Fet 7	T 6	Keine Lig.	0,41	0,16	0,25	0,3	0,05
OPCI Fet 4	T 6	Keine Lig.	0,58	0,36	0,22	0,24	0,07
BJV4 Fet 2	T 0	Ligatur	1,46	0,5	0,96	0,23	0,14
BJV4 Fet 4?	T 0	Ligatur	1,32	0,67	0,65	0,25	0,1
BKG9 Fet 5	T 0	Ligatur	0,7	0,3	0,4	0,22	0,07
BIG2 Fet 3	T 0	Ligatur	1,7	0,87	0,83	0,23	0,1
BIG2 Fet 4	T 0	Ligatur	1,69	0,86	0,83	0,28	0,12
BKG9 Fet 4	T 0	Ligatur	0,96	0,46	0,5	0,31	0,09
BLX6 Fet 6	T 3	Ligatur	0,56	0,33	0,23	0,19	0,05
BLX6 Fet 4	T 3	Ligatur	0,87	0,5	0,37	0,25	0,07
BIJ3 Fet 4	T 3	Ligatur	0,74	0,32	0,42	0,23	0,1
BIJ3 Fet 1	T 3	Ligatur	0,71	0,23	0,48	0,36	0,1
BIN3 Fet 2	T 3	Ligatur	0,48	0,21	0,27	0,25	0,06
BIC2 Fet 1	T 3	Ligatur	1,03	0,47	0,56	0,25	0,09
OPCH Fet 9	T 6	Ligatur	0,97	0,62	0,35	0,23	0,08
OPCH Fet 7	T 6	Ligatur	1,2	0,83	0,37	0,19	0,05
BUA9 4	T 6	Ligatur	1,12	0,62	0,5	0,19	0,1
BUA9 3	T 6	Ligatur	0,86	0,43	0,43	0,23	0,09
OLXF Fet 8	T 6	Ligatur	0,85	0,42	0,43	0,23	0,08
BIY7 Fet 2	T 6	Ligatur	0,33	0,1	0,23	0,28	0,06
AHX1 Fet 9	T 6	Ligatur	0,46	0,13	0,33	0,28	0,09
AHX1 Fet 4	T 6	Ligatur	0,52	0,24	0,28	0,24	0,07
OPCI Fet 6	T 6	Ligatur	1,16	0,79	0,37	0,26	0,07
OPCI Fet 9	T 6	Ligatur	0,79	0,35	0,44	0,28	0,1

Probe	Gruppe	Ligatur	Destillat	PFC	H <sub>2</sub> O	Verlust	Rest
OPCI Fet 7	T 6	Ligatur	1,18	0,45	0,73	0,22	0,11
BJV4 Fet 10	T 0	Kontrolle	0,93	0	0,93	0,12	0,13
BIG2 Fet 2	T 0	Kontrolle	0,83	0	0,83	0,12	0,11
BIG2 Fet 6	T 0	Kontrolle	1	0	1	0,14	0,12
BLX6 Fet 8	T 3	Kontrolle	0,64	0	0,64	0,18	0,11
BIC2 Fet 3	T 3	Kontrolle	0,54	0	0,54	0,17	0,08
OLXF Fet 10	T 6	Kontrolle	0,4	0	0,4	0,11	0,08
AHX1 Fet 6	T 6	Kontrolle	0,17	0	0,17	0,17	0,05

Tabelle 4: Messwerte (in Gramm)

Aus diesen Werten ergibt sich die in Abbildung 5 dargestellte durchschnittliche Zusammensetzung der einzelnen Versuchsgruppen.

In Abbildung 6 werden die Mittelwerte über den zeitlichen Verlauf dargestellt.

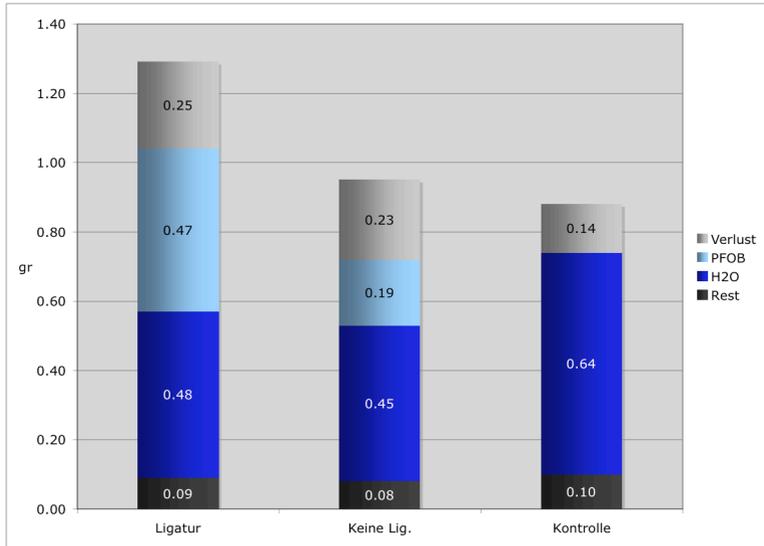


Abbildung 5: Zusammensetzung der Versuchsgruppen

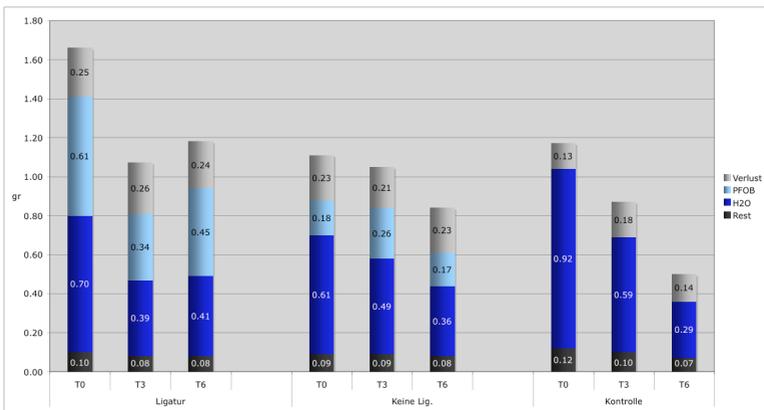


Abbildung 6: Zusammensetzung der Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf

Eine Spiegelbildung im aufgefangenen Destillat war nur in den beiden Interventionsgruppen zu beobachten. Lediglich bei einer Probe aus diesen Gruppen (BUA9 Fet 6 ; - Lig ; T 6) konnte kein PFC im Destillat nachgewiesen werden.

Mit einer Ausnahme wurden in der abschließenden Spülung der Destillationseinrichtung keine Restmengen von PFOB gefunden. Nur bei der Destillation von BLX6 Fet 10 (- Lig ; T 3) enthielt die Spülflüssigkeit eine messbare Menge von 0,03 ml (0,05 gr) PFOB.

Bei sämtlichen Messungen war nach der Destillation ein Massenverlust zwischen 0,11 gr und 0,36 gr zu verzeichnen.

#### 8.1.1.3. Ergebnisse der CO<sub>2</sub>-Messung

Eine Kapnometrie wurde bei der Destillation von 7 Proben durchgeführt: AHX1 Fet 7 (- Lig ; T 6), OPCI Fet 4 (- Lig ; T 6), BIC2 Fet 1 (+ Lig ; T 3), BKG9 Fet 4 (+ Lig ; T 3), OPCI Fet 6 (+ Lig ; T 6), OPCI Fet 7 (+ Lig ; T 6) und OPCI Fet 9 (+ Lig ; T 6) Die Messungen konnten dabei bei keiner Untersuchung nachweisbare CO<sub>2</sub>-Konzentrationen darstellen.

#### 8.1.1.4. Ergebnisse der Nachtrocknung

Beim Nachtrocknen der Reste von BIJ3 Fet 3 (- Lig ; T 3), BIN3 Fet 1 (- Lig ; T 3) und BIG2 Fet 2 (Kontrolle ; T 0) über 24 h ergab sich keine Differenz zwischen dem unmittelbar nach der Destillation als Rest bestimmten Wert und dem Gewicht nach der zusätzlichen Trocknung. Auch das Nachtrocknen der Proben BJV4 Fet 3 (- Lig ; T 0) und BJV4 Fet 2 (+ Lig ; T 0) über 48 h sowie BJV4 Fet 4 (+ Lig ; T 0) über 12 Tage ergab keinen Unterschied dieser Werte.

#### 8.1.2. Ergebnisse der Messgenauigkeitsuntersuchung

Die zur Überprüfung der Messgenauigkeit untersuchten Proben hatten ein Ausgangsgewicht vor der Destillation zwischen 1,12 gr und 3,49 gr (Mittelwert: 2,43 gr).

Die Ergebnisse der Messgenauigkeitsuntersuchung sind einzeln in Tabelle 5 aufgeführt. Abbildung 7 stellt die durch die Destillation bestimmten Mittelwerte der einzelnen Gruppen für PFOB, Wasser, Geweberest und Verlust graphisch unter der Angabe der Standardabweichung dar.

<b>PFOB Zugabe</b>	<b>Gesamt</b>	<b>Destillat</b>	<b>PFC</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Rest</b>	<b>Verlust</b>
0,05 ml	1,95	1,31	0	1,31	0,42	0,22
0,05 ml	1,54	0,89	0,04	0,85	0,33	0,32
0,05 ml	1,92	1,22	0,05	1,17	0,39	0,31
0,05 ml	1,12	0,69	0,02	0,67	0,23	0,2
0,1 ml	1,9	1,25	0,07	1,18	0,41	0,24
0,1 ml	1,5	0,91	0,11	0,8	0,3	0,29
0,1 ml	1,79	1,08	0,07	1,01	0,37	0,34
0,1 ml	2	1,37	0,13	1,24	0,41	0,22
0,2 ml	2,05	1,39	0,13	1,26	0,42	0,24
0,2 ml	2,12	1,45	0,25	1,2	0,4	0,27
0,2 ml	1,92	1,29	0,21	1,08	0,36	0,27
0,2 ml	1,75	1,22	0,23	0,99	0,34	0,19
0,3 ml	2,08	1,48	0,2	1,28	0,38	0,22
0,3 ml	2,14	1,5	0,39	1,11	0,36	0,28
0,3 ml	2,23	1,6	0,32	1,28	0,39	0,24
0,3 ml	2,18	1,53	0,38	1,15	0,4	0,25
0,4 ml	2,04	1,5	0,66	0,84	0,26	0,28
0,4 ml	2,51	1,84	0,68	1,16	0,36	0,31
0,4 ml	2,02	1,49	0,74	0,75	0,25	0,28
0,4 ml	2,56	1,94	0,7	1,24	0,37	0,25
0,5 ml	2,4	1,76	0,87	0,89	0,29	0,35
0,5 ml	2,13	1,62	0,87	0,75	0,25	0,26
0,5 ml	2,35	1,83	0,89	0,94	0,28	0,24
0,5 ml	2,29	1,72	0,87	0,85	0,27	0,3
0,6 ml	2,09	1,63	1,04	0,59	0,19	0,27
0,6 ml	2,19	1,7	1,07	0,63	0,21	0,28
0,6 ml	2,54	1,99	1,1	0,89	0,29	0,26
0,6 ml	2,7	2,08	1,08	1	0,33	0,29
0,7 ml	2,55	1,95	1,22	0,73	0,25	0,35
0,7 ml	2,91	2,21	1,23	0,98	0,33	0,37
0,7 ml	2,64	2,09	1,26	0,83	0,26	0,29

<b>PFOB Zugabe</b>	<b>Gesamt</b>	<b>Destillat</b>	<b>PFC</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Rest</b>	<b>Verlust</b>
0,7 ml	2,81	2,19	1,25	0,94	0,3	0,32
0,8 ml	3,13	2,56	1,46	1,1	0,33	0,24
0,8 ml	3,07	2,48	1,47	1,01	0,34	0,25
0,8 ml	2,95	2,31	1,39	0,92	0,28	0,36
0,8 ml	3,2	2,58	1,46	1,12	0,34	0,28
0,9 ml	3,29	2,67	1,6	1,08	0,32	0,3
0,9 ml	3,29	2,62	1,62	1	0,32	0,35
0,9 ml	3,18	2,6	1,65	0,95	0,3	0,28
0,9 ml	2,87	2,36	1,67	0,69	0,24	0,27
1,0 ml	3,26	2,71	1,84	0,87	0,27	0,28
1,0 ml	3,49	2,88	1,82	1,06	0,33	0,28
1,0 ml	3,13	2,52	1,79	0,73	0,26	0,35
1,0 ml	3,33	2,76	1,84	0,92	0,29	0,28

Tabelle 5: Werte der Meßgenauigkeitsuntersuchung (in Gramm)

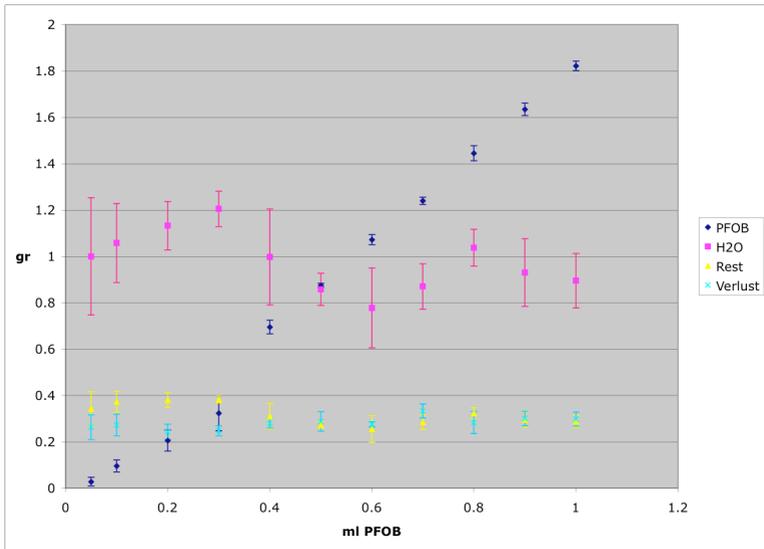


Abbildung 7: Durchschnittliche Verteilung der Destillations-  
ergebnisse für die Messgenauigkeitsuntersuchung

Mit Ausnahme einer einzigen Probe, welcher 0,05 ml PFOB vor dem Einfrieren zugegeben worden war, wurde aus allen untersuchten Proben PFOB herausdestilliert.

Die Aufbereitung der Destillationsapparatur ergab bei keiner der Proben einen messbaren PFOB Rest.

Mit steigender PFOB-Zugabe kam es zu einem linearen Anstieg in der Menge des herausdestillierten PFOB. Die übrigen Destillationsprodukte blieben über sämtliche durchgeführten Messungen hinweg konstant, wobei der

Wassergehalt der Proben noch die größte Variabilität aufwies.

Da im Fall der Messgenauigkeitsuntersuchung die absolut der Probe zugegebene Menge an PFOB bekannt war, konnte diese mit dem Gesamtverlust korreliert werden (Abbildung 8).

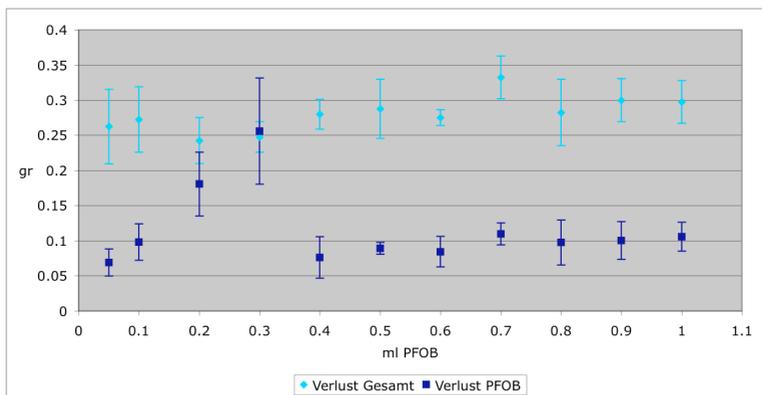


Abbildung 8: Gesamtverlust nach Destillation gegenüber PFOB-Verlust

Mit Ausnahme der Werte, die nach der Zugabe von 0,2 und 0,3 ml PFOB ermittelt wurden, bleibt der Verlust an PFOB über alle Messungen konstant. Auch der Gesamtverlust bewegt sich, wie bereits bei den Versuchsproben, um einen konstanten Wert.

Beim Vergleich der vor dem Einfrieren ermittelten Gewichtswerte der Lungen mit den zu Beginn der Messung bestimmten Werten zeigte sich ein durchschnittlicher Gewichtsverlust von 0,21 gr über die Dauer der Lagerung.

## 8.2. Statistik

### 8.2.1. Statistische Methoden

Da es sich bei den ermittelten Werten um unverbundene Stichproben handelt und bei den individuellen Gewichten der untersuchten Lungen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde der U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon verwendet. [26]

Dazu wurden sämtliche Werte aus den jeweils zu vergleichenden Gruppen in aufsteigender Reihenfolge sortiert und mit Rangnummern versehen. Bei identischen Werten wurde das arithmetische Mittel der entsprechenden Rangnummern verwendet. Anschließend wurden für jede der beiden Gruppen die entsprechenden Rangzahlen addiert und die Summen als  $R_1$  und  $R_2$  bezeichnet. Hieraus wurde für jede Zahlenreihe eine Testgröße  $U$  berechnet, wobei  $n_1$  und

$n_2$  die Anzahl der einer Gruppe zugehörigen Werte darstellen.

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1 \cdot (n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2 \cdot (n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Für den Test wurde jeweils der kleinere der beiden U-Werte verwendet.  $U = \min(U_1, U_2)$  wurde mit den, aus der maßgeblichen Tabelle entnommenen, kritischen Werten für ( $p = 0,05$ ) verglichen. War U kleiner oder gleich dem kritischen Wert galt der Unterschied als statistisch signifikant. [8, 17]

### 8.2.2. Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Gruppenstärken (s. Tabelle 2) von + Lig, - Lig sowie der Kontrollgruppe im Ganzen sind ausreichend um statistisch signifikante Unterschiede zu detektieren. Die Größe der, vom Explantationszeitpunkt abhängigen, Untergruppen der beiden Interventionsgruppen sind ebenfalls ausreichend um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf innerhalb der einzelnen Gruppen treffen zu können. Lediglich der Umfang der Kontrollgruppe erlaubt keine Aussage über die Zeitabhängigkeit innerhalb dieser Gruppe

Im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander lag das durchschnittliche Gewicht der mit PFOB und einer Ligatur versorgten Lungen (Mittelwert: 1,28 gr) signifikant ( $p \leq 0,02$ ) über dem Durchschnittsgewicht der nicht ligierten Lungen (Mittelwert: 0,96 gr) sowie der Kontrollen (Mittelwert: 0,89 gr). Die beiden zuletzt genannten Gruppen weisen keine signifikante Differenz im Gesamtgewicht vor der Destillation auf.

Die Abnahme des Ausgangsgewichtes in Abhängigkeit vom Explantationsszeitpunkt erreicht für die beiden Interventionsgruppen ebenfalls ein statistisch signifikantes Niveau ( $p \leq 0,03$ ). Bei der Kontrollgruppe ist zwar ein entsprechender Trend zu beobachten, aufgrund der geringen Gruppenstärke bleibt dieser jedoch statistisch nicht signifikant.

Der herausdestillierte Wasseranteil der Proben unterscheidet sich im Durchschnitt nicht signifikant zwischen den einzelnen Gruppen. Analog zur Abnahme des Ausgangsgewichtes ist jedoch in beiden Interventionsgruppen ein signifikanter Rückgang des Wassergehaltes von T 0 nach T 6 festzustellen ( $p \leq 0,007$ ). Dieser Trend wird auch in der Kontrollgruppe deutlich (s. Abbildung 6).

PFOB wurde nur aus den Gruppen + lig und - lig herausdestilliert, wobei die mit einer Ligatur

versehene Proben im Durchschnitt einen signifikant höheren PFOB-Gehalt aufwiesen, als die Lungen ohne Ligatur ( $p < 0,001$ ). In keiner Kontrollprobe war PFOB nachweisbar.

Das durchschnittliche Gewicht des Geweberestes nach der Destillation unterschied sich weder zwischen den einzelnen Gruppen, noch aufgeschlüsselt nach dem Explantationszeitpunkt.

Der verzeichnete Verlust in den beiden Interventionsgruppen war signifikant höher als der in der Kontrollgruppe berechnete. Im Vergleich untereinander ergab sich kein Unterschied zwischen dem Verlust bei + lig und – lig. Über den zeitlichen Verlauf hinweg kam es ebenfalls zu keiner Veränderung des ermittelten Masseverlustes.

## **9. Diskussion**

### **9.1. PFOB- und Wasser-Gehalt**

Die Tatsache dass aus nahezu allen mit PFOB behandelten Lungen PFC herausdestilliert wurde zeigt, dass die Destillation geeignet ist, PFOB in fetalen Kaninchenlungen nachzuweisen.

Auch zur quantitativen Bestimmung von PFOB und Wasser in fetalen Lungen scheint die Destillation ein

probates Mittel zu sein. Dies geht aus dem Unterschied im PFC-Gehalt zwischen den einzelnen Gruppen hervor (Abbildung 6): Die nach der Instillation mit einer trachealen Ligatur versehenen Proben enthalten signifikant mehr PFOB als die nicht Ligierten. Diese Messergebnisse werden durch die angefertigten Röntgenaufnahmen unterstützt: Bei Fehlen der trachealen Ligatur kommt es, wie in Abbildung 1 deutlich zu erkennen ist, bei den nicht ligierten Fetten zu einem Übertritt von PFOB in den Gastrointestinaltrakt. Hierzu muß es zunächst zu einem Austritt des intrapulmonal instillierten PFOB aus der Lunge gekommen sein. In der Folge wurde das PFC dann mit dem Fruchtwasser geschluckt. Der in der Amnionhöhle verbliebene Anteil ist dabei unbekannt, der in der nicht ligierten Gruppe gemessene niedrigere PFC-Gehalt jedoch erklärt.

Dieser Verlusteffekt scheint unmittelbar nach der Instillation aufzutreten, da es, zumindest im beobachteten Zeitraum zu keiner wesentlichen Veränderung mehr kommt.

Auch in der Messgenauigkeitsuntersuchung zeigt sich der herausdestillierte PFC-Anteil linear mit der, den Proben zugegebenen, PFOB-Mengen korreliert (Abbildung 9).

Sowohl in der Versuchsgruppe, als auch bei der Messgenauigkeitsuntersuchung fand sich jeweils eine Probe, die PFOB hätte enthalten müssen, bei der jedoch kein PFC im Destillat nachzuweisen war. Die betreffende Probe der Versuchsreihe (BUA9 Fet 6) gehörte der nicht ligierten Gruppe an, und war 6 Stunden nach PFOB-Instillation explantiert worden. Das Gewicht der Einwaage lag im unteren  $\frac{1}{5}$  der Gesamtgewichtsverteilung, so dass insgesamt von einem niedrigen absoluten PFOB-Gehalt ausgegangen werden kann. Der entsprechenden Probe der Messgenauigkeitsuntersuchung war die kleinste untersuchte Menge (0,05 ml) PFOB zugegeben worden. Diese Beobachtung weist auf das Vorliegen einer unteren Nachweisgrenze bei der Destillation von PFOB hin, was auch in der Auswertung der Messgenauigkeitsuntersuchung zur Darstellung kommt: Wird eine Trendlinie durch die ermittelten PFC-Mengen gelegt, so schneidet diese die x-Achse nicht im Nullpunkt, sondern etwa bei 0,05 (Abbildung 9). Die untere Nachweisgrenze liegt somit wohl in diesem Bereich. Das zustande kommen dieser Einschränkung wird im Folgenden bei der Diskussion des Massenverlustes weiter erörtert.

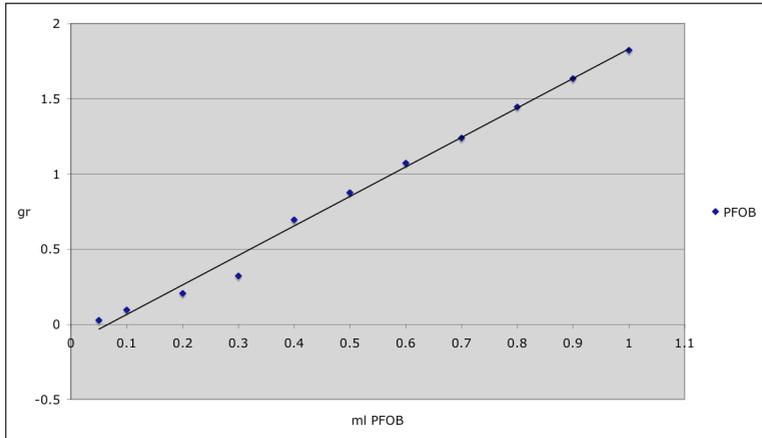


Abbildung 9: Lineare Verteilung des PFOB bei der Messgenauigkeitsuntersuchung

Der Wassergehalt der Lungenproben zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Über den zeitlichen Verlauf von T 0 nach T 6 ist jedoch über alle Gruppen, einschließlich Kontrollen, eine deutliche Abnahme festzustellen (Abbildung 6). Während kein anderes Destillationsprodukt eine vergleichbare Änderung aufweist, ist diese Entwicklung bereits bei der Gesamtgewichtsverteilung der Proben vor der Destillation zu beobachten. Es handelt sich somit nicht um einen Effekt der Destillation sondern ist vielmehr auf den vorangegangenen Versuchsablauf zurück zu führen und am ehesten Ausdruck einer zunehmenden

Dehydratation im Verlauf der praenatalen Intervention im hier dargelegten Versuchsaufbau.

Ein Verbleib von Wasser oder PFOB im destillierten Gewebe ist nach den Ergebnissen der Nachtrocknung auszuschließen. In dieser Hinsicht ist die Destillation als gleichwertig mit der wesentlich zeitaufwendigeren herkömmlichen Trocknung anzusehen.

Die Massen der Gewebereste nach der Destillation unterscheiden sich weder zwischen den einzelnen Gruppen noch ist eine Änderung von T 0 nach T 6 zu beobachten. Da dieser Wert ein Ausdruck des vorhandenen Lungengewebes ist, wäre eine Differenz nur durch eine Veränderung im Lungenwachstum zu erklären. Auch wenn ein solcher Effekt das ultimative Ziel der durchgeführten Interventionen ist, so ist der gewählte Beobachtungszeitraum sicher zu kurz um ihn zu detektieren.

## 9.2. Massenverlust

Einen unbefriedigenden Faktor bei diesem Verfahren stellt die Tatsache dar, dass bei jeder Messung ein Massenverlust zu verzeichnen ist.

Sowohl bei der Messgenauigkeitsüberprüfung, als auch in den Versuchsmessungen zeigt sich ein konstanter

absoluter Wert für den Massenverlust was am Ehesten auf einen verfahrensbedingten Faktor schließen lässt. Ein signifikanter Unterschied besteht dabei nur zwischen den mit PFOB behandelten Lungen (+ Lig / - Lig) und der Kontrollgruppe. Diese Tatsache und der weitestgehend parallele Kurvenverlauf in Abbildung weisen auf einen anteiligen Beitrag von PFOB am Gesamtverlust hin.

Die in diesem Diagramm abweichenden PFOB-Verlustwerte für 0,2 und 0,3 ml zugegebenes PFOB haben ihren Ursprung jedoch nicht in der Destillation selbst, sondern sind durch die Vorbereitung der einzelnen Proben bedingt, was durch die homogene Kurve des Gesamtverlustes bestätigt wird. Wie oben bereits dargelegt wurde bis zu einer Zugabe von 0,3 ml das PFOB noch vor dem Einfrieren direkt in die Lungenproben injiziert. Erst bei der Zugabe von 0,4 ml war der Austritt des PFC deutlich sichtbar geworden und hatte zu einer Änderung des Vorgehens geführt. Die abweichenden Werte sind somit am ehesten Ausdruck eines PFOB-Verbleibs im Lagerungsgefäß. Der Gewichtsverlust bereits über den Zeitraum der Lagerung hinweg deutet auf einen vorwiegenden Anteil von leicht flüchtigen Bestandteilen am Gesamtdefizit hin.

In seiner Gesamtheit ist der Masseverlust eine Summe mehrerer, verfahrensbedingter Faktoren:

Einen Anteil stellt die Russproduktion im Verlauf der Erhitzung der Lungen dar. Dies wird an den Verbindungsstücken zwischen den einzelnen Komponenten des Destillationsaufbaus deutlich. (Abbildung 10)

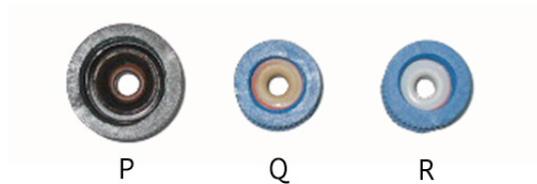


Abbildung 10: Rußablagerungen an den Verbindungsstücken des Destillationsaufbaus (Aufsicht in Dampfstromrichtung)

Dem Gasstrom folgend nehmen diese Auflagerungen mit zunehmender Entfernung zum Destillationsgefäß ab. So sind die über die gesamte Messreihe akkumulierten Ablagerungen am stärksten im Verbindungsstück zwischen Destillationsgefäß und Verbindungsadapter (Abbildung 10, P). Die Überleitung zwischen Verbindungsadapter und Kondensator (Abbildung 10, Q) weist bereits eine deutlich geringere Verfärbung auf und am Übergang von Kondensator zum

Vakuumadapter (Abbildung 10, R) sind keine Ablagerungen mehr sichtbar.

Auch das Entweichen von noch nicht auskondensierten Dämpfen über die Druckausgleichsöffnung könnte eine zusätzliche Verlustquelle darstellen.

Die CO<sub>2</sub>-Produktion im Verlauf der Messung sollte ebenfalls zum Masseverlust beitragen. Auch wenn die Kapnometrie im hier durchgeführten Rahmen keine messbaren CO<sub>2</sub>-Werte ergab, ist eine solche bei der zu beobachtenden Verkohlung des Geweberestes und der oben dargelegten Russproduktion anzunehmen. Insgesamt dürfte sie jedoch eine untergeordnete Rolle spielen.

Der Großteil des Verlustes ist am wahrscheinlichsten auf im Destillationsaufbau auskondensierte und nicht abgeleitete Dämpfe zurück zu führen. Dabei geht die Menge an Dämpfen verloren, welche notwendig ist, um sämtliche angeströmte Oberflächen der Destillationseinrichtung zu benetzen. Erst ein darüber hinausgehendes Auskondensieren führt schließlich zu einem Abtropfen der Flüssigkeit und damit zur Ableitung in das Auffanggefäß.

Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen bei den Messungen von BLX6 Fet 10 (- Lig ; T 3) und der nicht mit in die Auswertung aufgenommenen Probe BIY7

Fet 5 (Kontrolle ; T 6 ;) gestützt: In beiden Fällen fanden sich nicht in das Auffanggefäß abgeleitete Niederschläge bei der abschließenden Aufbereitung der Destillationsapparatur.

Da die zu benetzende Oberfläche bei jeder Messung dieselbe ist, würde dies auch den gleichmäßigen Verlauf der Verlust-Kurve und das Vorliegen einer unteren Nachweisgrenze, als Maß der Absättigung, erklären. Dieser Verlustanteil geht hauptsächlich zu Lasten des Wassergehaltes, da Wasser noch vor PFOB bei der Destillation verdampft und somit als erstes die Oberflächen absättigt.

## **10. Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Destillation stellt eine effiziente und einfache Methode mit hoher Spezifität und Sensitivität zur Bestimmung des Wasser- und PFOB- Gehaltes in entsprechend vorbehandelten fetalen Kaninchenlungen dar.

Ihre Nachteile bei der Untersuchung von fetalen Lungen liegen im Unvermögen zwischen intra- bzw. extrazellulärer Flüssigkeit und intrabronchialer bzw. intraalveolärer Flüssigkeit zu unterscheiden sowie in

dem über alle Messungen konstanten Masseverlust und der damit einhergehenden Mindestprobengröße.

### 10.1. Möglichkeiten zur Optimierung

Eine genauere Aussage über den intrabronchialen bzw. intraalveolären Wassergehalt könnte getroffen werden, indem vergleichende Untersuchungen an Lungen von neonatalen Kaninchen durchgeführt werden, welche bereits über einen Zeitraum geatmet haben, der eine vollständige Resorption der intrapulmonalen Flüssigkeit und deren Abtransport aus dem interstitiellen Lungengewebe gewährleistet. Auch könnten bereits vorhandene Werte aus der Literatur zum Vergleich herangezogen werden.

Was den auftretenden Verlust betrifft, so könnte der Anteil nicht auskondensierter durch eine stärkere Kühlung verringert werden. Um die CO<sub>2</sub>- sowie die Rußproduktion zu minimieren wäre es möglich, die Destillationstemperatur herabzusetzen. Dabei wäre die Vakuumdestillation der sinnvollste Ansatz. Da hierbei über die Verringerung des Dampfdruckes auch der Siedepunkt herabgesetzt ist, müssten keine längeren Destillationszeiten in Kauf genommen werden um eine komplette Verdampfung zu gewährleisten. Außerdem

entfällt in dem dafür notwendigen abgeschlossenen System ein etwaiger Verlust von Dämpfen an die Umgebungsatmosphäre.

Weiterhin könnte das Abdampfen von bereits herausdestillierten Fraktionen über den Verlauf der Messung durch eine Optimierung der Messdauer erreicht werden. Um dabei eine unvollständige Verdampfung aus der zu untersuchenden Probe zu vermeiden, wäre auch hier eine ausführliche weitere Messreihe mit entsprechender Nachrocknung erforderlich.

Eine Verringerung der von den Dämpfen angeströmten Oberflächen und damit auch des nicht abgeleiteten Niederschlags, könnte durch eine weitere Reduzierung der Bauteile vor und hinter dem Kondensator erreicht werden.

Außerdem könnte, zur Absättigung der Oberflächen, vor der eigentlichen Messung, eine definierte Menge Wasser destilliert und der Vorlauf verworfen werden.

## 10.2. Alternative Methoden

Betrachtet man die alternativen Verfahren zur Bestimmung von PFOB im Gewebe, so kommt zunächst einmal die gas-chromatographische Untersuchung in

Betracht. [32] Die hierbei zur Messung verwendeten Gewebemengen sind jedoch sehr gering. Um somit eine Aussage über den PFOB Gehalt eines gesamten Organs aus einigen Stichproben zu treffen, müsste eine einigermaßen homogene Verteilung von PFOB in den zu untersuchenden Proben zugrunde gelegt werden. Dies ist durch eine endotracheale Instillation in wassergefüllte, atelektatische fetale Lungen sicherlich nicht zu erreichen. Auch eine Homogenisierung der Lunge mit anschließender Probeentnahme zur gaschromatographischen Bestimmung würde an der Unvermischbarkeit von Wasser und PFC scheitern.

Lediglich die Homogenisierung der gesamten Lunge mit anschließender Zentrifugation zur Abtrennung der Gewebereste und der übrigen festen Bestandteile könnte eine ähnliche Trennung wie bei der Destillation herbeiführen. Berücksichtigt man jedoch den hohen Dampfdruck von PFOB und die notwendigen Schritte vor der eigentlichen Bestimmung (Auftauen, Homogenisierung), bleibt dahingestellt ob sich auf diese Weise der Massenverlust reduzieren lässt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß die Destillation in dieser Form der Verwendung eine Reihe von Vorteilen bietet und ab einer Mindest-Probengröße

reproduzierbare und genaue Ergebnisse liefert. Weitere Versuche und Vergleiche mit anderen Techniken, wie abschließend besprochen, sollten für die Zukunft angestrebt werden.

## **Zusammenfassung**

Eine pulmonale Hypoplasie, wie sie im Rahmen einer angeborenen Zwerchfellhernie, vorkommt, trägt wesentlich zur neonatalen Morbidität und Mortalität bei. Die aufwendige und invasive Behandlung der betroffenen Neugeborenen macht die pränatale therapeutische Intervention interessant. Hierdurch könnte die Lungenentwicklung in ihrer eigentlichen Ausreifungsphase beeinflusst werden, ohne dass diese bereits für den Gasaustausch zur Verfügung stehen muss. Neben dem, bereits in der Anwendung am menschlichen Fetus befindlichen, Verfahren der trachealen Okklusion soll dabei die Instillation von Perfluorcarbon in fetale Lungen im Tiermodell untersucht werden.

Perfluorcarbone sind aus Kohlen-Wasserstoffen abgeleitete Verbindungen, bei denen sämtlicher, an Kohlenstoff gebundener, Wasserstoff durch Fluoratome ersetzt wird. Diese Verbindungen zeichnen sich durch ihre hohe chemische Stabilität und Löslichkeit für Atemgase aus. Soll eine pränatale Therapie mit diesen Substanzen erfolgen, muss zunächst untersucht

werden, in welchem Umfang intrapulmonal instilliertes Perfluorcarbon auch in der fetalen Lunge verbleibt.

Um eine quantitative Bestimmung aus den natürlicherweise mit Flüssigkeit gefüllten fetalen Lungen zu ermöglichen wird in dieser Dissertation die Gewebedestillation eingeführt und erörtert. Dabei wurden fetale Lungen von weißen Neuseelandkaninchen untersucht, welche zu drei Interventionsgruppen randomisiert worden waren: Instillation von Perfluorocetyl bromid mit anschließender Ligatur der Trachea, Instillation von Perfluorocetyl bromid ohne Ligatur und Kontrollen ohne Intervention. Die Proben der jeweiligen Gruppen waren, nach erneuter Randomisierung, direkt nach der Instillation, drei Stunden oder 6 Stunden später entnommen, schockgefroren und bei - 20 °C aufbewahrt worden.

Zur Bestimmung der Messgenauigkeit wurden außerdem Proben einer adulten Rinderlunge untersucht, denen jeweils definierten Mengen an Perfluorocetyl bromid zugegeben wurden.

Nach der Bestimmung des Gesamtgewichts der zu untersuchenden Probe im Destillationsgefäß wurde die Destillation jeweils über 2 Stunden bei 200 °C durchgeführt. Enthielt die Probe Perfluorocetyl bromid

wies das dabei gewonnene Destillat zwei getrennte Phasen auf. Gewicht und Volumen wurde für beide Phasen separat bestimmt und abschließend der, im Destillationsgefäß verbliebene, verkohlte Geweberest gewogen. Sechs Gewebereste wurden anschließend über mehrere Stunden bis Tage nachgetrocknet und danach erneut gewogen, um einen nicht herausdestillierten Verbleib von PFOB oder Wasser auszuschließen. Bei sieben Messungen wurde parallel zur Messung eine Kapnometrie durchgeführt, um die CO<sub>2</sub>-Produktion bei der Destillation zu quantifizieren.

Die Auswertung zeigt, dass die Destillation in der hier dargelegten Form geeignet ist, um Perfluorooctylbromid- und Wassergehalt fetaler Lungen getrennt sowie reproduzierbar und genau zu bestimmen. Die Methode kann dabei jedoch nicht für beliebig kleine Proben verwendet werden, da es bei sämtlichen Messungen zu einem Massenverlust von konstanter Größe kommt. Dieser ist am ehesten auf in der Destillationsapparatur auskondensierte, jedoch nicht abgeleitete Dämpfe und eine Rußproduktion zurück zu führen.

Als alternative Methode käme am ehesten die Homogenisierung der Proben mit anschließender Zentrifugation in Betracht. Die systemimmanenten Verluste der Destillation könnten durch die

Verwendung einer noch kompakteren Destillationsapparatur sowie einer Vakuumdestillation bei niedrigerer Temperatur minimiert werden. Hierfür sind weitere Versuchsreihen notwendig.

## Literaturverzeichnis

1. *Chemical thermodynamics*, in *Chapter 5: Mixtures Containing a Fluorocarbon*, F.L. Swinton, Editor. 1978, The Chemical Society.: London,, p. 147 - 148.
2. *Oxford Latin Dictionary*, ed. P.G.W. Glare. 1982: Oxford University Press.
3. *Pediatric Respiratory Medicine*, L.M. Taussig and L.I. Landau, Editors. 1999, Mosby: St. Louis.
4. *Nelson Textbook of Pediatrics, 16th Edition*, R.E. Behrman, R.M. Kliegman, and H.B. Jenson, Editors. 2000, Saunders: Philadelphia.
5. Abdullah, F., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: outcome review of 2,173 surgical repairs in US infants*. *Pediatr Surg Int*, 2009. **25**(12): p. 1059-64.
6. Albanese, C.T., et al., *Endoscopic Fetal Tracheal Occlusion: Evolution of Techniques*. *Pediatric Endosurgery & Innovative Techniques*, 1998. **2**(2): p. 47 - 53.
7. Alcorn, D., et al., *Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the*

- fetal lamb lung*. J Anat, 1977. **123**(Pt 3): p. 649-60.
8. Bortz, J. and G.A. Lienert, *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung ein Leitfaden für die Analyse kleiner Stichproben*. 1998, Berlin <etc.>: Springer-Verlag. X, 405 S.
  9. Clark, L.C., Jr. and F. Gollan, *Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure*. Science, 1966. **152**(730): p. 1755-6.
  10. Colton, D.M., et al., *Neutrophil accumulation is reduced during partial liquid ventilation*. Crit Care Med, 1998. **26**(10): p. 1716-24.
  11. Croce, M.A., et al., *Partial liquid ventilation decreases the inflammatory response in the alveolar environment of trauma patients*. J Trauma, 1998. **45**(2): p. 273-80; discussion 280-2.
  12. Fauza, D.O., R.B. Hirschl, and J.M. Wilson, *Continuous intrapulmonary distension with perfluorocarbon accelerates lung growth in infants with congenital diaphragmatic hernia: initial experience*. J Pediatr Surg, 2001. **36**(8): p. 1237-40.

13. Flake, A.W., et al., *Treatment of severe congenital diaphragmatic hernia by fetal tracheal occlusion: clinical experience with fifteen cases*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(5): p. 1059-66.
14. Fuhrman, B.P., P.R. Paczan, and M. DeFrancis, *Perfluorocarbon-associated gas exchange*. Crit Care Med, 1991. **19**(5): p. 712-22.
15. Graham, G. and P.C. Devine, *Antenatal diagnosis of congenital diaphragmatic hernia*. Semin Perinatol, 2005. **29**(2): p. 69-76.
16. Greenspan, J.S., M.R. Wolfson, and T.H. Shaffer, *Liquid ventilation*. Semin Perinatol, 2000. **24**(6): p. 396-405.
17. Guggenmoos-Holzmann, I. and K.-D. Wernecke, *Medizinische Statistik*. 1995, Berlin <etc.>: Blackwell Wissenschaft. XI, 220 S.
18. Harrison, M.R., et al., *Successful repair in utero of a fetal diaphragmatic hernia after removal of herniated viscera from the left thorax*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1582-4.
19. Ivascu, F.A. and R.B. Hirschl, *New approaches to managing congenital diaphragmatic hernia*. Semin Perinatol, 2004. **28**(3): p. 185-98.

20. Jani, J.C., et al., *Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2009. **34**(3): p. 304-10.
21. Kizilcan, F., et al., *The effect of low amniotic pressure without oligohydramnios on fetal lung development in a rabbit model*. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. **173**(1): p. 36-41.
22. Knox, E., et al., *Prenatal detection of pulmonary hypoplasia in fetuses with congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis of diagnostic studies*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2010. **23**(7): p. 579-88.
23. Langman, J., *Medizinische Embryologie*. 8 ed. 1989, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
24. Luks, F.I., et al., *Effect of lung fluid composition on type II cellular activity after tracheal occlusion in the fetal lamb*. *J Pediatr Surg*, 2001. **36**(1): p. 196-201.
25. Main, M.L. and P.A. Grayburn, *Clinical applications of transpulmonary contrast echocardiography*. *Am Heart J*, 1999. **137**(1): p. 144-53.
26. Mann, H.B. and D.R. Whitney, *On a Test of Whether one of Two Random Variables is*

- Stochastically Larger than the Other*. The Annals of Mathematical Statistics, 1947. **18**(1): p. 50 - 60.
27. Milestone, B.N., et al., *Virtual bronchoscopy with perfluorinated hydrocarbon enhancement*. Acad Radiol, 1997. **4**(8): p. 583-6.
  28. Muensterer, O.J., et al., *Intrapulmonary perfluorooctyl bromide instillation in fetal rabbits*. J Pediatr Surg, 2005. **40**(7): p. 1094-9.
  29. Nobuhara, K.K., et al., *Continuous intrapulmonary distension with perfluorocarbon accelerates neonatal (but not adult) lung growth*. J Pediatr Surg, 1998. **33**(2): p. 292-8.
  30. Odibo, A.O., et al., *Predictors of the need for extracorporeal membrane oxygenation and survival in congenital diaphragmatic hernia: a center's 10-year experience*. Prenat Diagn, 2010. **30**(6): p. 518-21.
  31. Pranikoff, T., P.G. Gauger, and R.B. Hirschl, *Partial liquid ventilation in newborn patients with congenital diaphragmatic hernia*. J Pediatr Surg, 1996. **31**(5): p. 613-8.
  32. Reickert, C., et al., *The pulmonary and systemic distribution and elimination of perflubron from*

- adult patients treated with partial liquid ventilation.* Chest, 2001. **119**(2): p. 515-22.
33. Riess, J.G. and M.P. Krafft, *Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery.* Biomaterials, 1998. **19**(16): p. 1529-39.
  34. Rotta, A.T., et al., *Partial liquid ventilation with perflubron attenuates in vivo oxidative damage to proteins and lipids.* Crit Care Med, 2000. **28**(1): p. 202-8.
  35. Sinha, C.K., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: prognostic indices in the fetal endoluminal tracheal occlusion era.* J Pediatr Surg, 2009. **44**(2): p. 312-6.
  36. Stege, G., A. Fenton, and B. Jaffray, *Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia.* Pediatrics, 2003. **112**(3 Pt 1): p. 532-5.
  37. Stichlmair, J.G. and J.R. Fair, *Distillation: Principles and Practice.* 1998, Wiley VCH. p. 1-5.
  38. Sydorak, R.M. and M.R. Harrison, *Congenital diaphragmatic hernia: advances in prenatal therapy.* World J Surg, 2003. **27**(1): p. 68-76.

39. Taylor, G.A., O.M. Atalabi, and J.A. Estroff, *Imaging of congenital diaphragmatic hernias*. *Pediatr Radiol*, 2009. **39**(1): p. 1-16.
40. Thomas, S.R., et al., *MR imaging of the lung using liquid perfluorocarbons*. *J Comput Assist Tomogr*, 1986. **10**(1): p. 1-9.
41. VanderWall, K.J., et al., *Fetendo-clip: a fetal endoscopic tracheal clip procedure in a human fetus*. *J Pediatr Surg*, 1997. **32**(7): p. 970-2.
42. Walker, G.M., et al., *Early perfluorodecalin lung distension in infants with congenital diaphragmatic hernia*. *J Pediatr Surg*, 2003. **38**(1): p. 17-20; discussion 17-20.
43. Weber, T.R., et al., *Improved survival in congenital diaphragmatic hernia with evolving therapeutic strategies*. *Arch Surg*, 1998. **133**(5): p. 498-502; discussion 502-3.
44. Weiss, D.J., et al., *Perfluorochemical liquid-enhanced adenoviral vector distribution and expression in lungs of spontaneously breathing rodents*. *Exp Lung Res*, 1999. **25**(4): p. 317-33.
45. Wong, D. and N. Lois, *Perfluorocarbons and semifluorinated alkanes*. *Semin Ophthalmol*, 2000. **15**(1): p. 25-35.

46. Woods, C.M., et al., *Perflubron attenuates neutrophil adhesion to activated endothelial cells in vitro*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **278**(5): p. L1008-17.

## **Anhang**

- I      **Pharmpur GmbH**  
Holzweg 27, D-86156 Augsburg, Deutschland
- II     **Wheaton Industries Inc.**  
1501 North 10<sup>th</sup> Street, Millville, NJ 08332, USA
- III    **Sartorius AG**  
Weender Landstrasse 94-108, D-37075  
Göttingen, Deutschland
- IV    **IKA® Werke**  
Janke & Kunkel Strasse 10, D-79219 Staufen,  
Deutschland
- V     **Becton Dickinson GmbH**  
Tullastrasse 8-12, D-69126 Heidelberg,  
Deutschland
- VI    **Willy Rüsçh GmbH**  
Willy-Rüsçh-Strasse 4-10, D-71394 Kernen i.R.,  
Deutschland
- VII   **Siemens Medizintechnik**  
Henkestr.127, D-09131 Erlangen, Deutschland
- VIII  **Smiths Medical Deutschland GmbH**  
Bretonischer Ring 3, D-85630 Grasbrunn,  
Deutschland

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Vera von Dossow-Hanfstingl

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. med. Holger Till  
Priv. Doz. Dr. med. O. Münsterer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2011