

Aus dem Lehrstuhl für Anästhesiologie
Prof. Dr. Bernhard Graf
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Partielle Etablierung eines Blood Air Barrier Model zur Bestimmung der Diffusion
anästhesiologisch relevanter Tracersubstanzen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jakob Hess

2025

Aus dem Lehrstuhl für Anästhesiologie
Prof. Dr. Bernhard Graf
der Fakultät Für Medizin
der Universität Regensburg

Partielle Etablierung eines Blood Air Barrier Model zur Bestimmung der Diffusion
anästhesiologisch relevanter Tracersubstanzen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jakob Hess

2025

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: PD Dr. Martin Kees
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Helmut Schweikl
Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2025

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Covid-19 als Beispiel pulmonaler Diffusionsstörungen.....	7
1.2 Grundlegende Bedeutung der Diffusion durch mehrlagige Zellschichten	8
1.3 Historische Entwicklung der Gesetze der pulmonalen Diffusion.....	9
1.4 Diethylether und Sevofluran – die Entwicklung volatiler Anästhetika	9
1.5 Teiletablierung eines Blood Air Barrier Model	11
1.6 Computersimulation von Diffusionsvorgängen	12
1.7 Entwicklungsprozess des Blood Air Barrier Model	13
1.8 Ablauf einzelner Versuche zur Modelletablierung	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.1 Zellkultur	15
2.1.2 IBIDI-Perfusion.....	16
2.1.3 Gasdiffusion.....	17
2.2 Zusammensetzung der Lösungen für Zellkultur	17
2.3 Software	18
2.4 Chemikalien, Pufferlösungen und Enzyme	19
2.5 Gewinnung und Handhabung der humanen Endothelzellen	20
2.6 Untersuchung des Endothelzellverhaltens unter Flussbedingungen	21
2.6.1 Versuchsansatz	21
2.6.2 Auswertung der Zellausrichtung.....	23
2.7 Entwicklungsbeschreibung des Blood Air Barrier Model	24
2.7.1 Coating der Membran	24
2.7.2 Entwicklung von Anschlüssen an den Luftkanal	25
2.7.3 Druckausgleichskanäle	26

2.7.4	Etablierung der Gaschromatographie	28
2.7.5	Kalibration zur Umrechnung von pAs in ppm.....	29
2.8	Entwickelte Methode	31
2.8.1	Vorbereitung des Membranslides	31
2.8.2	Ablauf eines Diffusionsversuches	32
2.8.3	Auswertung der Diffusionsversuche.....	33
2.9	Pharmakokinetisches Modell und Simulation	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Auswertung der Zellformen unter Perfusion	36
3.2	Auswertung der Tracerdiffusion in einem Membranslide.....	37
3.3	Ergebnisse von pharmakokinetischen Modell und Simulation	42
4	Diskussion.....	46
4.1	Endothelzellkultivierung.....	46
4.2	Zellausrichtung unter Perfusion.....	46
4.3	Umgang mit Glasmembran.....	47
4.4	Entwicklung eines geeigneten Messzyklus.....	50
4.5	Interaktion zwischen Tracern, Membranslide und Schlauchsystem	50
4.5.1	Diffusion der Tracer neben der Glasmembran	50
4.5.2	Tracerdiffusion in Membranslide und Schlauchsystem	51
4.6	Ursachendiskussion des fehlenden Einflusses der Zellen auf die Tracerdiffusion	52
4.6.1	Monolayer aus Endothelzellen nicht ausreichend	52
4.6.2	Einfluss der chemischen Eigenschaften der Tracer	52
4.6.3	Einfluss des Messverfahrens auf Ergebnis	53
4.6.4	Erklärung für stark abweichende Diffusionsmessungen	54
4.7	Pharmakokinetische Simulation	54
4.8	Abgrenzung zu einem Lungenmodell	55

4.9	Mögliche Anpassungen des Versuchsaufbaus	55
4.9.1	Verbesserung der Überwachung der Zellschicht	55
4.9.2	Erhebung von Diffusionsdaten bei unterschiedlicher Zellkonfluenz	56
4.10	Ausblick	56
4.10.1	Erweiterung auf ein zweischichtiges BAB-Model	56
4.10.2	Inversion der etablierten Methode.....	56
5	Zusammenfassung	58
6	Tabellenverzeichnis	59
7	Abbildungsverzeichnis.....	60
8	Literaturverzeichnis	61
9	Danksagung	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ARDS	engl. acute respiratory distress syndrome
BAB-Model	Blood Air Barrier Model
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	engl. chronic obstructive pulmonary disease
dest.	destilliert
DPBS	engl. Dulbecco´s phosphate buffered saline
EC	engl. endothelial cells
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	engl. fetal calf serum
FID	Flammenionisationsdetektor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) -piperazin-1-ethansulfonsäure
HUVEC	engl. human umbilical vein endothelial cells
Membranslide	“µ-Slide Membrane ibiPore Flow”
O ₂	Sauerstoff
pA	Pikoampere
ppm	engl. parts per million
ROS	engl. reactive oxygen species
sog.	sogenannt
SOP	engl. standard operating procedure
Tab.	Tabelle
T _{max}	Zeit der maximalen Tracer-Konzentration
UV-Strahlung	Ultraviolett-Strahlung
WHO	engl. World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zw.	zwischen

1 Einleitung

1.1 Covid-19 als Beispiel pulmonaler Diffusionsstörungen

Ende 2019 wurde zum ersten Mal eine Infektion mit dem Virus SARS-CoV-2 beim Menschen entdeckt. In kürzester Zeit entwickelte sich daraus eine globale Pandemie. Laut WHO haben sich inzwischen über 775 Millionen Menschen infiziert, über 7 Millionen starben daran (Stand 03.07.2024) (1). Inzwischen hat der Anteil der Fälle mit einer schweren Erkrankung deutlich abgenommen. Die sogenannte Omikron-Variante hat sich zunehmend verbreitet und die Bevölkerung ist größtenteils durch Immunisierung geschützt. Die meisten Patienten haben einen leichten Verlauf und nur noch Symptome einer leichten Atemwegsinfektion (Husten, Schnupfen, Halsschmerzen) (2). Bei einem sehr schweren Verlauf hingegen steht in der Akutphase der Erkrankung besonders die eingeschränkte Lungenfunktion im Sinne eines ARDS im Vordergrund (3). Dabei kommt es durch diverse Prozesse (Mikrothromben, Atelektasen, gesteigerte Totraumventilation, Abnahme Lungengcompliance) zu einem Ventilations-Perfusions-Mismatch, welches wiederum den Rechts-Links-Shunt erhöht. Dadurch wird die Oxygenierungsfunktion der Lunge maßgeblich eingeschränkt (4). Physiologisch diffundiert in der Lunge der essenziell benötigte Sauerstoff aus den Alveolen durch die Dreischichtung aus Pneumozyten, Basalmembran und Endothelzellen der Gefäße in das Blut. Das Kohlendioxid wird in gegensätzlicher Richtung aus dem Körper eliminiert. Im Erkrankungsfall werden diese Vorgänge durch eine überschießende Immunreaktion im Bereich der pulmonalen Epithelzellen sowie der Endothelzellen der Lungenstrombahn behindert. Hierin wird ein Hauptfaktor der Mortalität bei COVID-19 gesehen (5). Für Patienten mit einem hohen Risiko für einen schweren Verlauf der Erkrankung gab es deswegen in der aktuellen S3-Leitlinie vom Frühjahr 2024 die Empfehlung zu einer direkt antiviralen Therapie durch neutralisierende Antikörper und Virostatika (Remdesivir, Nirmatrelvir/Ritonavir). Sobald die Applikation von Sauerstoff nötig ist, gab es die Empfehlung auch immunmodulatorische Therapieansätze (Glucocorticoide, Tocilizumab) einzusetzen (2). Diese Therapie sollte vor allem die pulmonale Hyperinflammation limitieren (6).

1.2 Grundlegende Bedeutung der Diffusion durch mehrlagige Zellschichten

Im Körper werden unterschiedliche Funktionsbereiche durch Zellschichten voneinander getrennt. Diese werden Grenzschichten genannt, und der Stofftransport über diese ein- oder mehrlagigen Zellschichten ist im Körper nicht nur in der Lunge von elementarer Bedeutung (vgl. Tabelle 1, S. 8).

In Gefäßen haben diese Zellschichten eine besondere Regulationsfunktion und stellen folglich auch in diversen Erkrankungsprozessen eine entscheidende Rolle dar. So behindert eine überschießende Immunreaktion in der Lunge im Rahmen eines ARDS (z.B. durch Infektion mit SARS-CoV-2) den Austausch von Sauerstoff aus der Luft in die Blutbahn (5,7). Hier führt die zunächst physiologische Immunreaktion des Körpers zu einer erheblichen Störung der Permeabilität für Sauerstoff und Kohlendioxid in der Lungenstrombahn. Ähnlich kommt es im Rahmen des septischen Schocks zu einem massiven Austritt von Flüssigkeit („capillary leak“) aus dem Kapillarstromgebiet in den extravasalen Raum. Bei entsprechender Ausdehnung führt dies zu einem relativen Volumenmangelschock (8). Die besondere Bedeutung solcher Blood Brain, Blood Tissue oder Blood Air Barrier wird in Tabelle 1 mit beispielhaften Krankheitsbildern verknüpft.

Tabelle 1: Beispiele diffundierender Substanzen, zugehöriger Grenzschichten und anhängender Pathologien

Ort der Grenzschicht	Diffusionssubstanzen	Pathologien der Grenzschichten
Blut-Hirn-Schranke	Sauerstoff, Glukose etc.	Kernikterus bei Neugeborenen (9)
Darmepithel	Fette, Zucker, etc.	Spontan-bakterielle Peritonitis (10)
Lunge	O ₂ , CO ₂	ARDS(7), SARS-CoV-2 Infektion (5)

1.3 Historische Entwicklung der Gesetze der pulmonalen Diffusion

Durch den deutschen Physiker und Mediziner Adolph Fick (1829 – 1901) wurde erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts ein Diffusionsgesetz aufgestellt, welches später bewiesen werden konnte und bis heute Fick-Diffusionsgesetz heißt (11). Demnach ist die diffundierende Substanzmenge (M) durch eine definierte Fläche (F) mit der Dicke (d) direkt proportional zur wirksamen Konzentrationsdifferenz (ΔC) unter Einbezug des Diffusionskoeffizienten (D) (12):

$$M = D * \frac{F}{d} * \Delta C$$

Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurde wiederholt versucht, die Diffusionseigenschaften von Sauerstoff durch Lungengewebe mit Hilfe von dünnen Gewebeschnitten zu erheben (13,14) und damit den benötigten Diffusionskoeffizienten (D) zu erlangen. Durch die Kombination beider Forschungsleistungen entwickelte die Physiologie später Gleichungen, welche die O_2 -Diffusionskapazität der Lunge berechenbar machten (12). Die isolierte *in vitro* Betrachtung einer solchen Grenzfläche unter experimentellen Bedingungen, wie zum Beispiel im Rahmen der Beeinflussung durch Erkrankungen, war damit jedoch nicht möglich. Dabei wären genau diese Interaktionen von pathophysiologischen Prozessen mit den einzelnen Gewebeschichten von besonderem Interesse für die medizinische Forschung.

1.4 Diethylether und Sevofluran – die Entwicklung volatiler Anästhetika

Über viele Jahrhunderte war das Ausmaß der Schmerzen während einer Operation maßgeblich von der Eingriffsdauer und der Vorgehensweise des Chirurgen abhängig. Nur in begrenztem Maße kamen supportiv bewusstseinsverändernde und schmerzlindernde Substanzen (z.B. alkoholische Getränke, Pflanzen mit Tropanalkaloiden, Schlafmohn, Hanf) zur Anwendung. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts erfolgten erste Versuche mit Lachgas und der Operation mittels Schwefeläthernarkose (historische Bezeichnung für Diethylether) (15). Am 16. Oktober 1846 erfolgte die erste öffentlichen Demonstration einer solchen Narkose. Dieser Tag wird heute als Weltanästhesietag jährlich gefeiert und stellt einen Meilenstein in der modernen Medizin dar. Zu Beginn des Jahres 1847 wurden auch im deutschsprachigen Raum (Erlangen, München, Leipzig, Bern) durch Chirurgen erste

Versuche der „Schmerzunempfindlichmachung“ durchgeführt und in Erlangen von Johann Ferdinand Heyfelder publiziert (15,16).

Ausgehend von Diethylether kam es unter anderem durch Halogenierung und Fluorierung zur Entwicklung weiterer inhalativer Anästhetika wie beispielsweise Isofluran oder Sevofluran. In der nachfolgenden Abbildung 1 kann diese Entwicklung anhand der verkürzten Strukturformeln der jeweiligen Substanzen nachvollzogen werden. In der modernen Anästhesie findet vor allem Sevofluran eine Anwendung. Auch dieses wird trotz seiner Vorteile, wie einer guten Steuerbarkeit und einer hohen therapeutischen Breite (17), zunehmend kritisch gesehen. Begründet ist dies im steigenden Bewusstsein für die klimaschädlichen Effekte der inhalativen Anästhetika, welche deutlich potentere Treibhausgase als CO_2 sind (18–20).

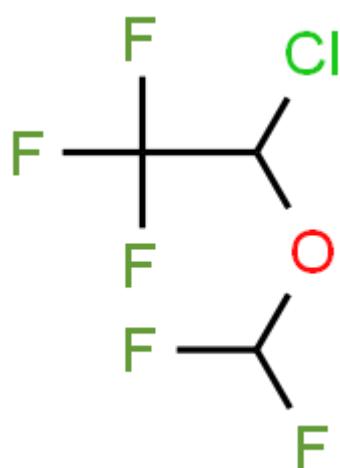
a)



b)



c)



d)

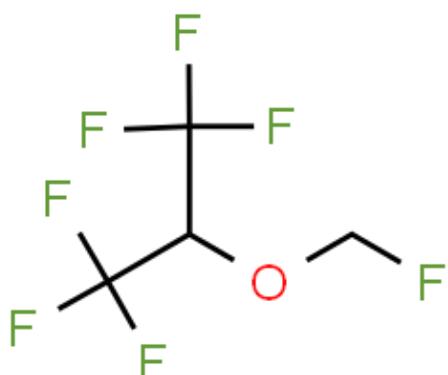


Abbildung 1: verkürzte Strukturformeln von a) Lachgas, b) Diethylether, c) Isofluran und d) Sevofluran (21)

1.5 Teiletablierung eines Blood Air Barrier Model

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wird nun begonnen ein *in vitro*-Modell für eine Blood Air Barrier, wie sie in der Lunge existiert, zu etablieren. Dieses soll auf einem Mikroskopierslide, „ μ -Slide Membrane ibiPore Flow“ (im Folgenden als Membranslide abgekürzt), mit zwei kleinen Kanälen aufbauen. Der obere Kanal soll gasgefüllt sein und wird mit Pneumozyten ausgekleidet werden. Der zweite, untere Kanal soll flüssigkeitsgefüllt sein und wird mit Endothelzellen ausgekleidet werden. Nur im Bereich der gelochten Glasplatte („Membrane“), in welchem sich die beiden Kanäle überkreuzen, stehen die Kompartimente miteinander in Kontakt (vgl. Abbildung 2, S. 11). Als Trennung dient hier neben den beiden Zellschichten nur die poröse Glasplatte (vgl. Abbildung 3, S. 12). Diese hat eine Dicke von 300 nm; 5 % der Fläche sind gelocht. Jedes Loch hat einen Durchmesser von 3,0 μ m und ist damit um circa Faktor 10 kleiner als eine Endothelzelle (Länge: 25-50 μ m; Breite: 10-20 μ m) (22). Um in beiden Kanälen unterschiedliche Zellarten (final hier: Endothelzellen und Pneumozyten) kultivieren zu können ist diese Platte essenziell. Durch die Porosität der Platte ist diese sowohl für Flüssigkeiten als auch für Gase permeabel, auf Grund des Verhältnisses zwischen Lochdurchmesser und Zellgröße jedoch nicht für die unterschiedlichen Zellarten.

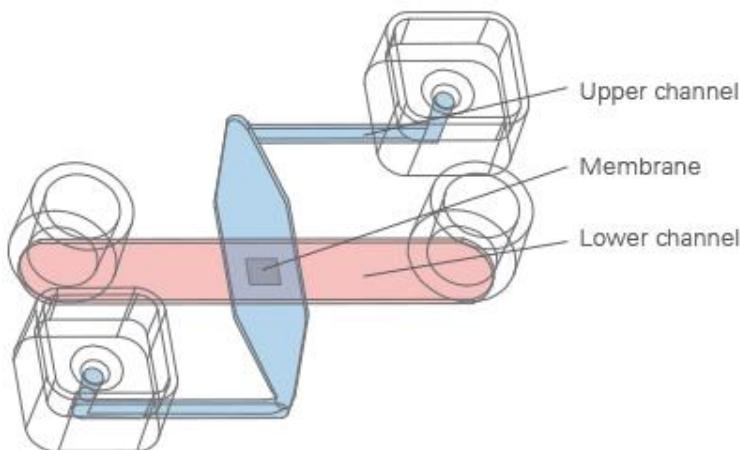


Abbildung 2: schematischer Aufbau des verwendeten Membranslide (23)

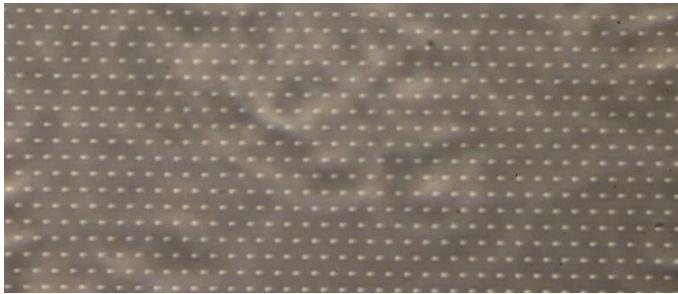


Abbildung 3: gelochte Glasmembran (Membrane) unter dem Mikroskop, Lochdurchmesser je $\sim 3 \mu\text{m}$

Mit Hilfe dieses Aufbaus soll initial die Diffusion von Tracersubstanzen aus einem Gefäß (unterer Kanal) durch eine einschichtige Endothelzellschicht hindurch in eine Gasphase (oberer Kanal) nachvollziehbar werden. Das physiologische sowie das pathophysiologische Verhalten dieser Grenzschicht soll dadurch in einem experimentellen Setting untersuchbar werden. Als Tracersubstanzen kommen zunächst die Substanzen Ether und Sevofluran auf Grund ihrer Diffusionsfähigkeit und der Möglichkeit zur Quantifizierung zur Anwendung. Im weiteren Verlauf sind physiologische Diffusionsgase wie CO_2 oder O_2 von Interesse. Für die Etablierung sollen reproduzierbare Zeit-Werte-Paare der Konzentration der Tracer in ppm im oberen Kanal erhoben werden.

Im weiteren Verlauf der Etablierung, anschließend an diese Forschungsarbeit, muss die zweite Zellschicht aus Pneumozyten implementiert werden. Diese wird das Modell einer Blood Air Barrier vervollständigen.

1.6 Computersimulation von Diffusionsvorgängen

Kollegen des Department Mathematik an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen haben das Ziel unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Neuss-Radu die Diffusionsvorgänge durch Zellschichten als Computersimulationen zu entwickeln. Als Grundlage werden hierfür experimentell erhobene Daten benötigt, welche dieses In-vitro-Modell liefern könnte. Auch mit Hilfe dieser Computersimulationen könnten Vorgänge in Gefäßwänden und den einhergehenden Stofftransporten sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen simuliert werden. So ist es denkbar, nach der Etablierung des BAB-Model die einzelnen Zellschichten vergleichbar mit humanpathologischen Prozessen zu beeinflussen und so den direkten Effekt auf die Diffusion von Tracern zu erheben.

1.7 Entwicklungsprozess des Blood Air Barrier Model

Nachfolgend werden graphisch die einzelnen Abschnitte dieser wissenschaftlichen Arbeit dargestellt.

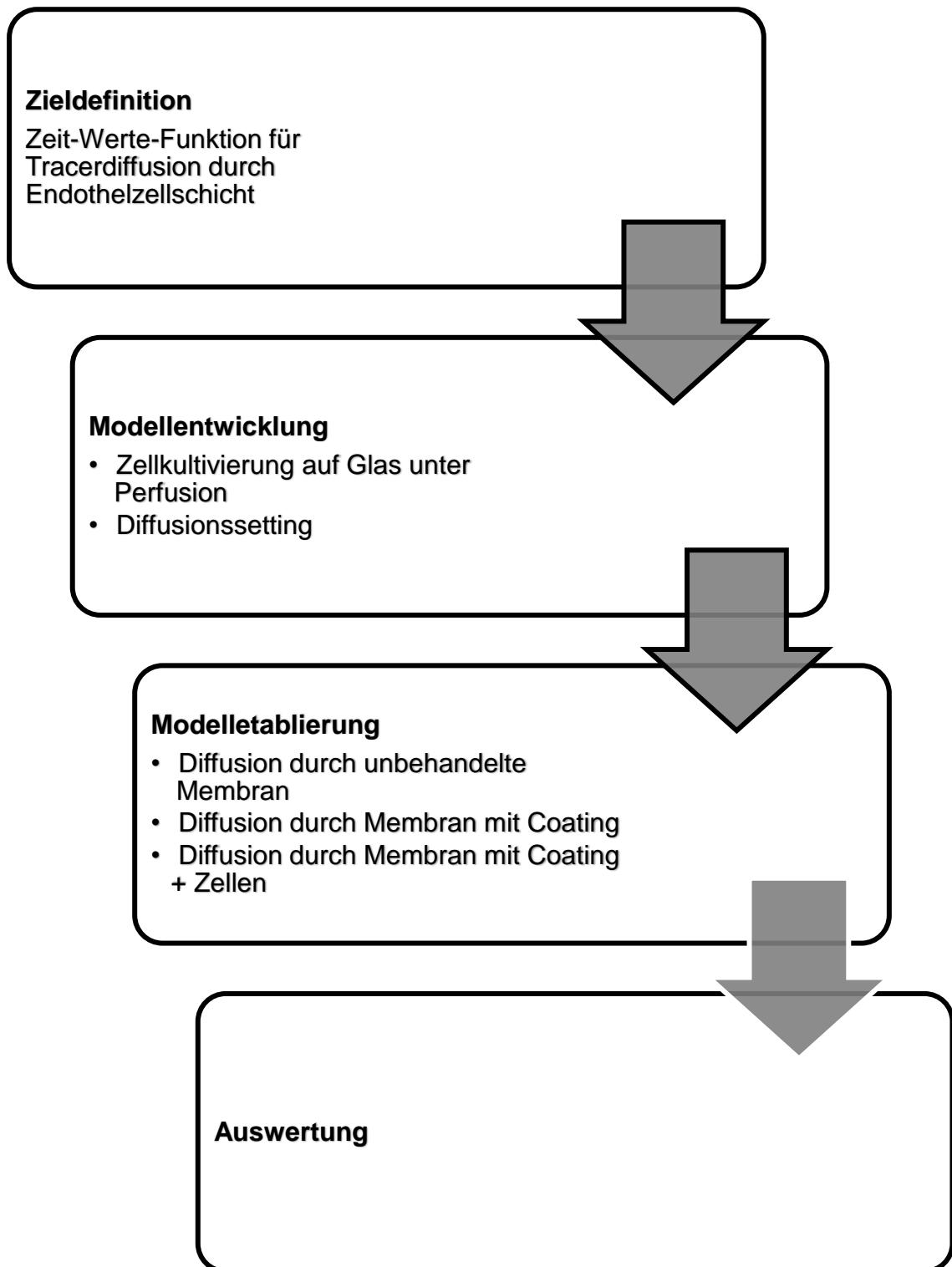


Abbildung 4: Entwicklungsprozess des Blood Air Barrier Model

1.8 Ablauf einzelner Versuche zur Modelletablierung

In der folgenden Graphik ist der Ablauf jedes einzelnen Diffusionsversuchs visualisiert.

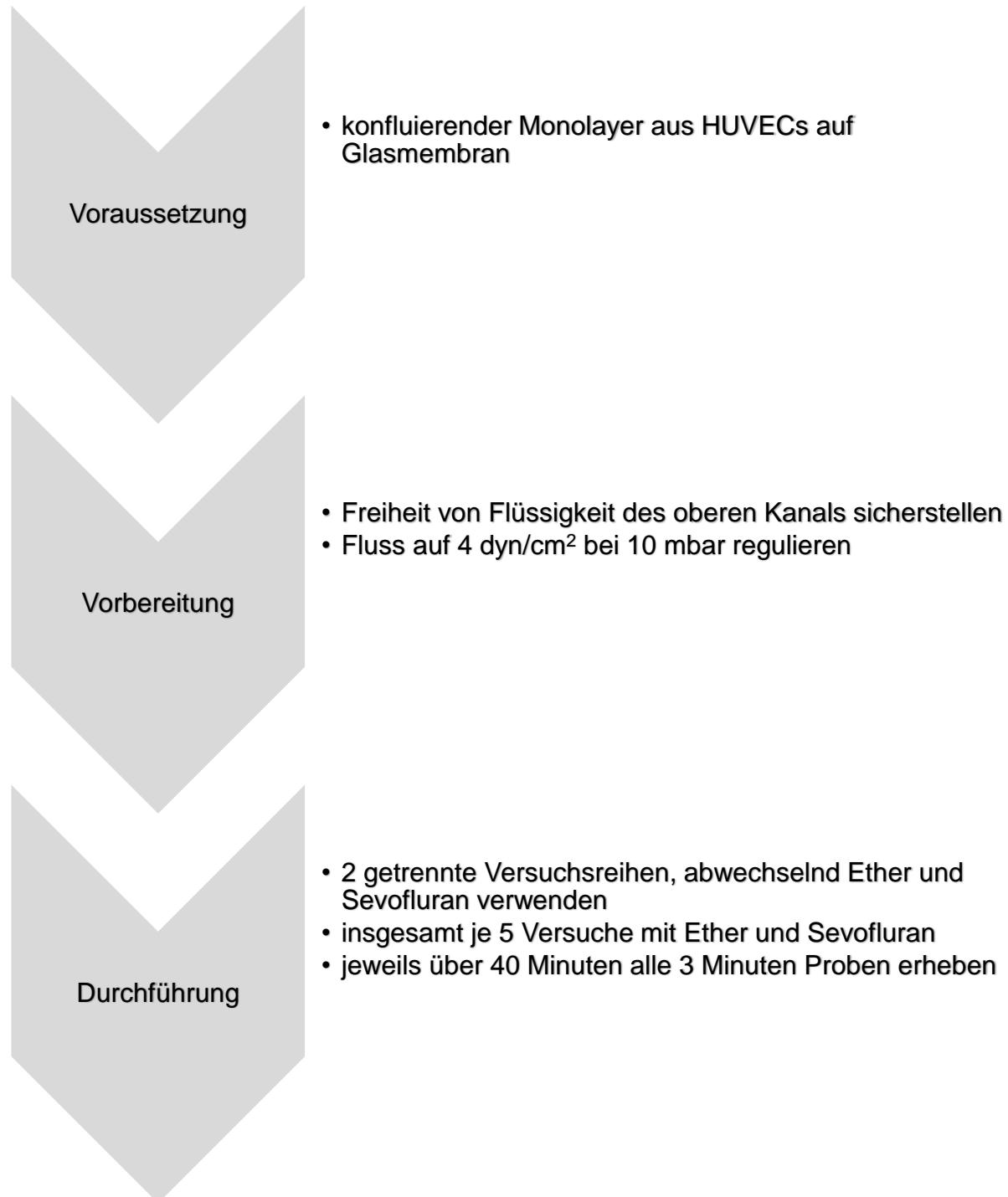


Abbildung 5: Ablauf einzelner Versuche zur Modelletablierung

2 Material und Methoden

In den nachfolgenden Kapiteln 2.1 bis 2.4 werden die in den einzelnen Bereichen verwendeten Geräte, Materialien, Lösungen und Computerprogramme aufgelistet. Anschließend werden die angewandten Methoden ausgeführt.

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Zellkultur

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	Hera cell 150	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Leica DM IRB	Leica Microsystems
Lichtmikroskop	Leica DMi8 automated	Leica Microsystems
Sterilsicherheitswerkbank	Herasafe KS 18	Thermo Electron LED GmbH
Vakuumpumpe	Membran Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH + Co
Warmwasserbad	Thermostatic Water Bath – WBS	Fried Electric
Zählkammer	Neubauer improved	Brand GmbH & Co. KG
Zentrifuge	MegaFuge 1.0R	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	BioFuge Stratos	Heraeus Instruments

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cellstar Tubes Zentrifugenröhrchen 50 mL	Greiner bio-one
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell GmbH
Falcon® 25 cm ² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vented Cap	Corning Inc. Life Sciences
Falcon® 75 cm ² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vented Cap	Corning Inc. Life Sciences
SupplementPack Endothelial Cell GM	PromoCell GmbH
Combi-Stopper blau	B. Braun Petzold

2.1.2 IBIDI-Perfusion

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Digitalkamera	EOS 500D	Canon
Hebebühne	Swiss Boy 116	Rudolf Grauer AG
Heizplatte	PZ 35	Harry Gestigkeit GmbH
Inhalations-Narkosegerät	Trajan 808	Dräger
Inkubationsschüttler	Lab-Therm	Kühner Switzerland
Laptop	Dell Vostro 3550	Dell Inc.
Narkosegasmonitor	Vamos plus	Dräger
Narkosegasmonitor	Capnomac Ultima	Datex Engstrom
Perfusionspumpe	ibidi Pump System	ibidi GmbH
Rollenpumpe	Reglo Analog MS-2/8	ISMATEC; Cole-Parmer GmbH

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Universal
BD Discardit II 10mL Spritze	Becton Dickinson S.A., Ctra. Mequinenza
BD Discardit II 20 mL Spritze	Becton Dickinson S.A., Ctra. Mequinenza
BD Microlance 3 Aufziehkanüle	Becton Dickinson S.A., Ctra. Mequinenza
BD R 87 RLS	Becton Dickinson Infusion Therapy AB
ES-Kompressen 10cm x 10cm	Paul Hartmann AG
Omnifix-F Luer Solo 1mL Spritze	B. Braun Melsungen AG
Perfusion Set Yellow-and-Green, 3 St.	ibidi GmbH
Schlauchsystem Rollenpumpe	Saint-Gobain Performance Plastics
tapira Plus Kosmetiktücher	GVS-Grossverbraucherspezialisten eG
µ-Slide Membrane ibiPore 3.0µm/5% Flow	ibidi GmbH
µ-Slide VI 0.5 Glass Bottom	ibidi GmbH
Infusionssysteme	Becton Dickinson Infusion Therapy AB

2.1.3 Gasdiffusion

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Gaschromatograph	7820A	Agilent Technologies
Spritzenpumpe (Basis)	Orchestra Base A	Fresenius Kabi AG
Spritzenpumpe (Modul)	Module DPS	Fresenius Kabi AG

Verbrauchsmaterial	Hersteller
2-Komponentenkleber	Carl Roth GmbH & Co KG
BD Connecta Verlängerungsschlauch	Becton Dickinson GmbH
BD Perfusion 50mL Syringe Perfusorspritze	Becton Dickinson S.A.
CS-Fused Silica-Kapillarsäule	CS-Chromatographie Service GmbH
DB-624 Columns	Agilent Technologies
Naturstein Silikon	Sievert Baustoffe GmbH & Co. KG
SGE Autosampler Syringe	Merck KGaA

2.2 Zusammensetzung der Lösungen für Zellkultur

Tabelle 2: EC-Medium für Endothelzellkultivierung

EC-Medium	Menge für 540 mL
Endothelial Cell Basal Medium	500 mL
(Promocell GmbH)	
SupplementPack Endothelial Cell GM	
(Promocell GmbH)	
FCS	40 mL

Tabelle 3: EC-Medium für Perfusionsversuche

EC-Medium für Perfusion	Menge für 30 mL
EC-Medium für Endothelzellisolation und -kultivierung	30 mL
Penicillin/Streptomycin	300 µL

Tabelle 4: Coating-Lösung für Endothelzellkultivierung

Coating-Lösung	Menge für 100 mL
Gelatine	0,2 g
in Aqua dest. bei 40°C lösen, 100 mL autoklavieren	
Gentamicin 10 mg/mL	10 µL

Tabelle 5: Coating-Lösung I für HUVEC im „µ-Slide Membrane ibiPore Flow“

Coating-Lösung	Menge für 1 mL
HBSS	870 µL
Kollagen Typ IV (C6745; Merck KgaA)	130 µL

Tabelle 6: Coating-Lösung II für HUVEC im „µ-Slide Membrane ibiPore Flow“

Coating-Lösung	Menge für 1 mL
0,05 M HCl	1 mL
Kollagen Typ IV (354233; Corning Inc.)	40 µg

Tabelle 7: Trypsin-EDTA für Zellkultur

Trypsin-EDTA	Menge für 100 mL
Trypsin-EDTA Solution	40 mL
DPBS	60 mL

2.3 Software

Software	Versionsnummer	Hersteller
Excel	2008	Microsoft
ibidi Pump Control Software	1.5.4	ibidi GmbH
IBM SPSS Statistics 26	26.0.0.0	IBM
Imaris x64	9.0.2	Oxford Instruments plc.
Phoenix 64	8.1.0.3530	Certara L.P.

2.4 Chemikalien, Pufferlösungen und Enzyme

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
DPBS modified	D8537-500ML	Sigma-Aldrich
Diethylether	309966-100ML	Sigma-Aldrich
Collagenase A	10103578001	Roche
DMSO	D5879-500ML	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum	F7524	Sigma Aldrich, Merck KGaA
Gelatine aus Rinderhaut	G9391	Sigma Aldrich
Gibco Gentamicin (10 mg/mL)	11500506	Fisher scientific
Hanks' Balanced Salt Solution	H8264-500ML	Sigma Aldrich, Merck KGaA
HEPES solution	H0887-100ML	Sigma Aldrich; Merck KGaA
Isopropanol 70 %		
Kollagen Typ IV	C6745	Sigma Aldrich, Merck KGaA
Kollagen Typ IV	354233	Corning Inc.
Penicillin-Streptomycin	P4333	Sigma Aldrich, Merck KGaA
Sevofluran	4456	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG
Tischreinigungsmittel	230131	Schülke & Mayr GmbH
Trypsin-EDTA Solution	SLCC7608	Sigma Life Science

2.5 Gewinnung und Handhabung der humanen Endothelzellen

Für die Arbeiten mit Zellkulturen und die Vorbereitung der Perfusionsversuche wurde eine Sterilsicherheitswerkbank verwendet. Alle benötigten Flüssigkeiten wurden mit Hilfe eines Warmwasserbads auf 37 °C angewärmt. Für die Auftrennung einer Zellsuspension in Zellen und Flüssigkeit wurde eine Tischzentrifuge bei 272 g verwendet.

Auf Basis des positiven Ethikvotums (21-2206-101; Forschungsvorhaben „Exchange of gases between Air and Blood Flow controlled by Epithelial-Endothelial Layers – Modeling, Simulation and in vitro Experiments“) der Ethikkommission der Universität Regensburg wurden Endothelzellen (HUVEC) durch die routinierten technischen Mitarbeiter des Labors gemäß interner SOP gewonnen und für diese Forschungsarbeit zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der Zellen erfolgte im Stickstofftank. Die Anzucht der „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVEC) wurden in mit Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen durchgeführt. Diese Gelatinelösung war mit Gentamicin versetzt (vgl. Tabelle 4, S. 18), um das Risiko einer Infektion mit Bakterien während der Kultivierung zu minimieren. Das weitere Verfahren folgte der laborinternen SOP. Jedes Mal, wenn die Zellen mittels Trypsins gelöst und transferiert wurden, erhöhte sich ihre Passagezahl um 1. Für die Erhebung von Daten zur Tracerdiffusion wurden aus Qualitätsgründen nur Zellchargen mit einer Passagezahl zwischen 2 und 5 verwendet. Für die benötigten Vorversuche wurden auch höhere Passagezahlen toleriert, solange die Zellen sich über die Zeit vital und keine lichtmikroskopischen Auffälligkeiten zeigten. Vor allem für die Arbeit mit Endothelzellen in den Perfusionsversuchen im Membranslide (vgl. Kapitel 2.8, S. 31) war ein streng aseptisches Vorgehen sehr wichtig, auf Grund der hohen Gefahr einer Kontamination mit Bakterien.

2.6 Untersuchung des Endothelzellverhaltens unter Flussbedingungen

2.6.1 Versuchsansatz

Hierfür wurde das „μ-Slide VI 0.5 Glass Bottom“ (ibidi GmbH) verwendet. Der Versuchsansatz orientierte sich dabei an den Herstellerinformationen seitens der ibidi GmbH. Zunächst wurden alle benötigten Schläuche und das Slide in einem Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C) für 24 h akklimatisiert. Danach wurden die Kanäle des „μ-Slide VI 0.5 Glass Bottom“ gemäß Gebrauchsanweisungen mit einer Coating-Lösung auf der Basis von Gelatine (vgl. Tabelle 2, S. 17) beschichtet. Nach 30 Minuten wurde die überstehende Lösung abgesaugt und 40 µL der Zellsuspension eingebracht. Die Konzentration der Zellen wurde mit einer Zählkammer bestimmt. Angesetzt wurden die Versuche als Vergleich zwischen der initial eingebrachten Zellkonzentration von 0,8 und 1,5 Millionen Zellen pro µL. Um das Absetzen der Zellen und Anhaften auf der Gelatineschicht gewährleisten zu können, wurde das Slide in einer verschlossenen Zellkulturschale für 2 h in den Brutschrank gegeben. Zur Aufrechterhaltung des feuchten Milieus in der Zellkulturschale wurde ein feuchtes Zellstofftuch dazugelegt. Die Verwendung und Perfusion des Slides erfolgte als „serial connection“ gemäß Application Note 31 der ibidi GmbH, wobei mit Hilfe von medizinischen Infusionssystemen das Schlauchsystem um circa 70 cm verlängert wurde. Als Antrieb fungierte eine Rollenpumpe. Diese zog aus einem sterilen verschlossenen Glasbehälter das Perfusionsmedium an (vgl. Tabelle 3, S. 17) und pumpte dieses unidirektional an den Zellen vorbei. Auf Grund der Mechanik der Rollenpumpe erfolgte dies mit leicht oszillierendem Fluss. Nach Durchlaufen des Versuchsaufbaus wurde das Medium in das ca. 50 mL fassende Reservoir zurückgegeben. Die Atmosphäre über dem Endothelzellmedium wurde mit Hilfe eines Narkosegerätes auf 5-6 % CO₂ angereichert. Überwacht wurde dies mit Hilfe eines Kapnometers (beide Geräte vgl. Kapitel 2.1.2, S. 16). Vor der Zuleitung in das Reservoir wurde die Luft mit Hilfe einer Wasserfalle mit Feuchtigkeit angereichert. Um die Temperatur des Mediums über den ganzen Versuch konstant zu halten, wurde der Versuchsaufbau auf der Heizplatte (37 °C) realisiert. Das Slide selbst befand sich dort in einer geschlossenen Klimakammer. Diese wurde mit Styropor und Alufolie (vgl. Abbildung 6, S. 22) umgebaut, um den Einbau als „serial connection“ (vgl. Abbildung 7, S. 22) realisieren zu können.



Abbildung 6: μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom als „serial connection“ in der umgebauten Klimakammer

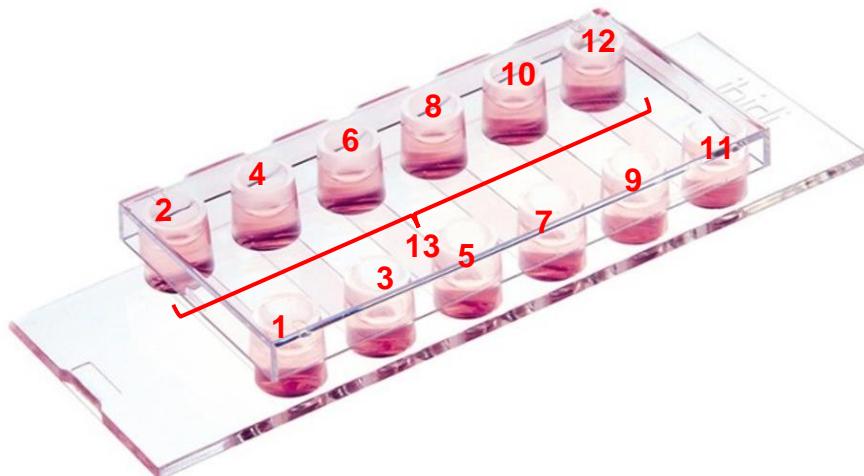


Abbildung 7: schematischer Aufbau Experiment mit μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom als „serial connection“ (24)

1: Zuleitung Perfusionslösung zu Kanal 1; Schlauchverbindung 2 → 3; 4 → 5; fortlaufend; 12: Ableitung Perfusionslösung aus Kanal 6; 13: Kanäle 1-6

In diesen Versuchen wurde aus Ressourcengründen nicht für jeden Ansatz ein steriles Schlauchsystem verwendet werden. Um eine ausreichende Keimreduzierung gewährleisten zu können, wurden diese zunächst für 1 h mit 70 %-Isopropanol durchspült. Anschließend wurden sie für je 15 min mit sterilem, destilliertem Wasser sowie DPBS perfundiert, bevor das eigentliche Perfusionsmedium verwendet wurde.

Beim Anschluss des Schlauchsystems wurde der Einschluss von Luftblasen minimiert. Eine gänzliche Vermeidung von Luftblasen war nicht möglich, da durch die Temperaturunterschiede im Verlauf des Schlauchsystems kontinuierlich neue Luftblasen entstanden. Nach Start der Rollenpumpe wurde die in den Kanälen vorherrschende Scherkraft gemäß Herstellerempfehlungen (25) auf 10 dyn/cm^2 reguliert. Im Versuchsverlauf wurde das Perfusionsmedium alle zwei Tage gewechselt.

2.6.2 Auswertung der Zellausrichtung

Regelmäßig wurde während laufender Perfusion der Zustand der Zellen mittels Mikroskops beobachtet und mit einer Digitalkamera dokumentiert. Auf Basis der Fotoaufnahmen wurde mit der Software „Imaris“ die horizontale Ausrichtung der Zellen analysiert. Jede Zelle wurde hierbei durch ein Ellipsoid dargestellt, dessen Ausmaße durch Vektoren beschrieben wurden. Dieser Vorgang wurde durch den Anwender verifiziert. Der Vektor C (vgl. Abbildung 8, S. 24) bezeichnete die lange und Vektor A die kurze Achse des Ellipsoids. Beide wurden jeweils durch einen X- als auch Y-Wert (jeweils dimensionslose Einheit von 0 bis 1) definiert und zusätzlich durch ihre Länge charakterisiert. Die Parameter wurden für jede einzelne Zelle erhoben und anschließend ein Median gebildet. Eine Veränderung des Vektors C würde eine Ausrichtung der Mehrzahl an Zellen bedeuten. So würde zum Beispiel eine Annäherung an einen X-Wert von 1 gemäß Abbildung 8 auf Seite 24 eine Ausrichtung in Flussrichtung bedeuten. Das Experiment wurde für die statistische Analyse zeitlich in eine frühe (0 h – 53 h) und eine späte (54 h – 93 h) Phase eingeteilt. Die Daten wurden in eine Excel-Tabelle transferiert und in SPSS mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Damit konnten die beiden initialen Zellkonzentrationen und die beiden Zeitfenster untereinander verglichen werden. Ziel war hierbei, die Zusammenhänge zwischen initialer Zellkonzentration und Ausrichtung der Endothelzellen im Fluss beurteilen zu können.

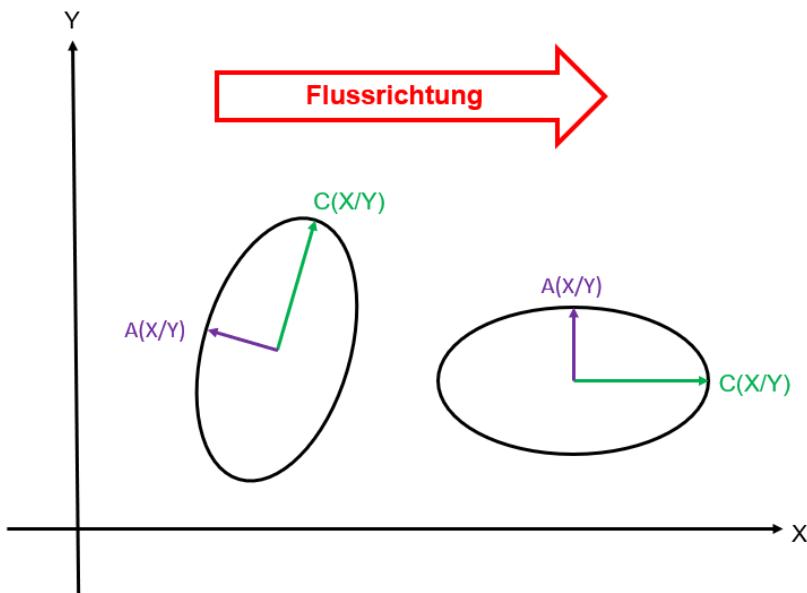


Abbildung 8: Analyse der Zellausrichtung durch "IMARIS" mittels durch Vektoren definiertem Ellipsoid

2.7 Entwicklungsbeschreibung des Blood Air Barrier Model

2.7.1 Coating der Membran

Die direkte Übertragung der Methode der HUVEC-Kultivierung von dem verwendeten „ μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom“ zum Membranslide war nicht möglich. Die Anzucht der Zellen auf Gelatine scheiterte im Membranslide wiederholt. Eine testweise Verlängerung der Zeit zum Anwachsen der Zellen (von 2h auf 6h) ermöglichte zwar visuell das vitale Anwachsen der HUVEC (vgl. Abbildung 9, S. 25), verhinderte jedoch nicht deren Verlust bei Start der Perfusion. Erst die Verwendung von Kollagen IV ermöglichte die Anhaftung der Zellen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Produkte getestet und die Anzucht orientierte sich an den inzwischen erneuerten Anweisungen des Herstellers (27). Das Produkt von Sigma-Aldrich (C6745) stammte aus humaner Zellkultur, das Produkt von Corning (354233) stammte von Mäusen. Nur bei Verwendung des Kollagen IV aus humaner Zellkultur konnte eine suffiziente Anhaftung der HUVEC an der Glasplatte erreicht werden. Diese hatte auch bei Perfusion Bestand.

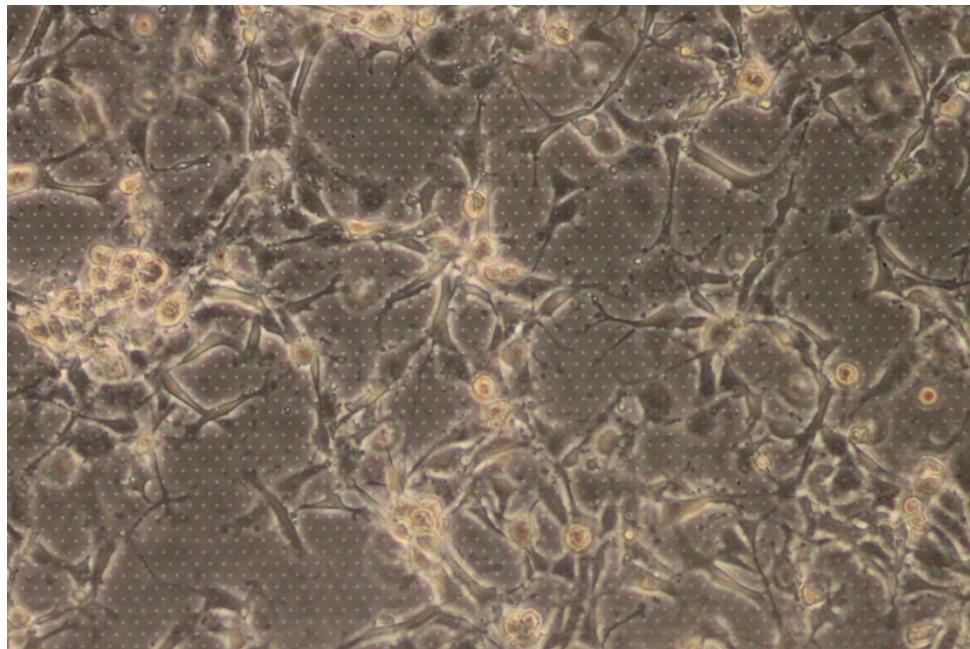


Abbildung 9: Mikroskopaufnahme von HUVEC auf Membran nach 6h Inkubation, 10fach vergrößert

2.7.2 Entwicklung von Anschlüssen an den Luftkanal

Der obere Kanal fasste laut Herstellerangaben circa 55 μL Volumen und endete in zwei würfelförmigen Reservoirs (26). Um die Tracerdiffusion aus der flüssigen Phase durch die Zellschicht hindurch in den Luftkanal zu messen, war es elementar, dort gasdicht Proben entnehmen zu können. Dafür wurde eine Glaskapillare („capillary tubing“, vgl. Tabelle 8, S. 29), welche auch im Gaschromatographen zur Anwendung kam, verwendet. Die Glaskapillare wurde auf eine Länge von 60 cm (abführende Seite) bzw. 20 cm (zuführende Seite) zugeschnitten. Zur Fixierung der Kapillare in der Öffnung des Luftkanals wurden zunächst Pipettenspitzen eingedreht. Diese waren spitz (nicht die vom Hersteller empfohlenen „bevelled tips“) und wurden zuvor in ihrer Länge halbiert. Anschließend wurde die Kapillarsäule in die Pipettenspitze eingeschoben. Durch einen 2-Komponentenkleber auf Epoxidharzbasis wurde die Kapillare in der Pipettenspitze und die Pipettenspitze im Reservoir des Membranslides verankert. Nach circa 30 Minuten war der Kleber ausreichend ausgehärtet (vgl. Abbildung 10, S.26). Die Luftproben (je Probe 50 μL) wurden immer mit 100 μL -Gasspritzen entnommen und in den on-column-Injektor des Gaschromatographen injiziert.

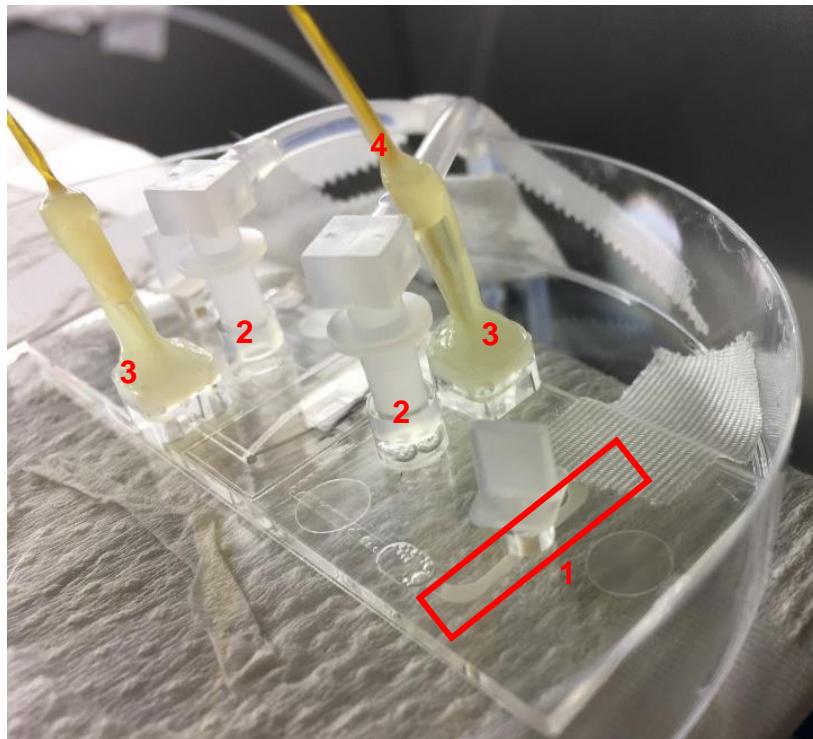


Abbildung 10: Membranslide; verschlossene Druckausgleichskanäle; vgl. Abbildung 2; S. 11

1: verschlossener Druckausgleichskanal; 2: Anschluss unterer Kanal; 3: Verankerung Pipettenspitze in Anschluss oberer Kanal; 4: Verankerung Glaskapillare in Pipettenspitze

2.7.3 Druckausgleichskanäle

Bei Durchführung der ersten Versuche mit dem Membranslide fielen zusätzlich zu den zwei Hauptkanälen zwei weitere schmale Kanäle auf. Diese verliefen jeweils zwischen dem oberen und dem unteren Kanal. In der Mitte des Kanalverlaufs befand sich jeweils ein Zugang zu diesen kleinen Kanälen (vgl. Nr. 2 in Abbildung 11, S. 27). Dieser wird während des vom Hersteller empfohlenen Aufbaus dauerhaft mit einem Stopfen verschlossen. In der Produktbeschreibung wurden diese Kanäle als Druckausgleichskanäle charakterisiert (26). Gleichzeitig wurde jedoch betont, dass die beiden Hauptkanäle nur über die gelochte Glasmembran in Verbindung stehen; die Integration dieser Druckausgleichkanäle in den übrigen Aufbau war nicht näher dokumentiert. Um die Funktion dieser beiden Druckausgleichskanäle genauer zu evaluieren, wurde das Membranslide mit einer blau gefärbten Wasserlösung perfundiert. Hierbei zeigte sich, dass die Flüssigkeit sofort vom unteren Kanal aus auch die beiden Druckausgleichskanäle perfundiert (vgl. Abbildung 11, S.27). Ebenso wurde deutlich, dass die Stopfen der Zugänge der Druckausgleichskanäle diese nur nach extern verschließen. Eine Unterbrechung der Druckausgleichskanäle fand durch das

Einbringen der Stopfen nicht statt. In der Rücksprache mit dem Hersteller ibidi GmbH bestätigten sich diese Erkenntnisse. Folglich lag sowohl ein Kontakt der beiden Kanäle über die Glasmembran als auch zusätzlich über die beiden Druckausgleichskanäle vor. Die Integration dieser zusätzlichen Druckausgleichskanäle erfolgte durch den Hersteller auf Grund der starken Anfälligkeit der Glasmembran für Druckschwankungen und daraus resultierenden Brüchen der Glasmembran.

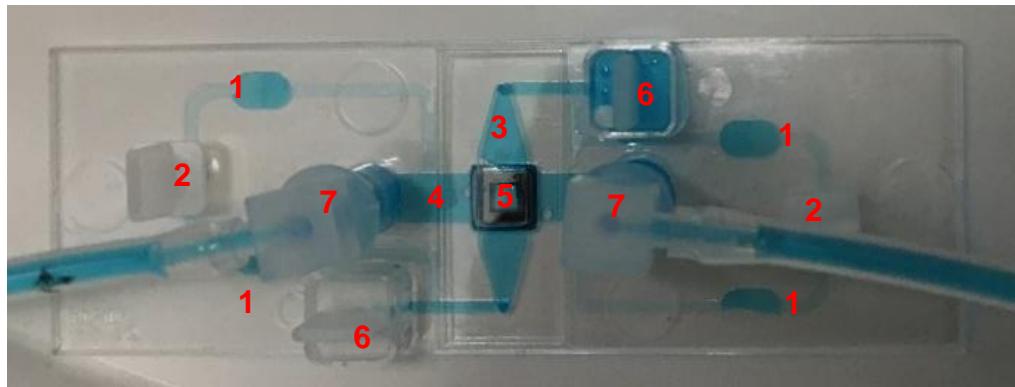


Abbildung 11: Membranslide; Draufsicht; Kanäle blau gefärbt

1: Druckausgleichskanäle; 2: Zugang zu Druckausgleichskanal (mit Stopfen verschlossen); 3: oberer Kanal; 4: unterer Kanal; 5: Membran (von schwarzer Fassung umrandet); 6: Zugang zu oberem Kanal; 7: Zugang zu unterem Kanal

Die Trennung der beiden großen Kanäle war jedoch essenziell für die Messung der Diffusion eines Tracers aus dem unteren in den oberen Kanal durch die Zellschicht. Somit galt es, die Druckausgleichskanäle im Experimentverlauf zu verschließen. Als praktikabel erwies sich hierbei die Verwendung von handelsüblichem Baustoffsilikon (vgl. Kapitel 2.1.3, S. 17 und Abbildung 10, S. 26). Am Tag des Diffusionsversuchs, üblicherweise dem 1. oder 2. Tag nach Aussaat der Zellen, wurde die Pumpe gestoppt. Anschließend wurden die Perfusionsschläuche mit einer Plastikklemme abgeklemmt, die Pumpe diskonnectiert und beides unter die Sterilsicherheitswerkbank transferiert. Die Stopfen der Zugänge der Druckausgleichskanäle wurden entfernt. Eine spezielle, an der Spitze abgerundete Pipettenspitze, sog. „bevelled tip“ gemäß der Empfehlung der Herstellerfirma ibidi GmbH, wurde an der großen Öffnung um circa 1 cm in der Länge gekürzt und mit Silikon gefüllt. Dann wurde eine 1 mL Spritze mit Luft gefüllt und auf die Pipettenspitze aufgesetzt. Durch Druck auf den Kolben konnte das Silikon bis zur spitzen Öffnung gedrückt werden. Nun wurde die Pipettenspitze auf den Zugang der Druckausgleichskanäle aufgesetzt. Durch fortgesetzten Kolbendruck

wurde das Silikon gleichmäßig in beide Richtungen der Kanäle gedrückt. Mit Erreichen der ersten Kurve wurde dies beendet. Nach Abschluss wurden die Stopfen der Druckausgleichskanäle wieder aufgesetzt. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, dass das Silikon den Kanal in voller Breite ausfüllt. Während der Perfusionsversuche konnte keine Veränderung des Silikonfüllstandes beobachtet werden.

2.7.4 Etablierung der Gaschromatographie

Mittels Gaschromatographie können durch einen Flammenionisationsdetektor (FID) gasförmige Substanzen nachgewiesen werden. Detektiert wird hierbei zunächst der Stromfluss [pA], welcher die Höhe eines Peaks definiert. Unter Einbezug der Zeit ergibt sich die Peakfläche [pAs], welche als primäres Messergebnis verwendet wurde. Die automatisierte Auswertung der Peaks wurde visuell vor allem im Hinblick auf die Abgrenzung zu den nächstgelegenen Peaks überprüft. Bei Bedarf wurde manuell korrigiert.

Um die einzelnen Messungen in den Versuchsaufbau integrieren zu können, mussten mehrere Aspekte gleichzeitig beachtet werden. Erstens sollte die Tracersubstanz einen gut identifizierbaren Peak in der Messung mittels Gaschromatographie produzieren. Dies trifft auf Substanzen zu, welche einen geringen Gasdruck haben und brennbar sind. Für den Übergang eines Tracers aus der flüssigen in die gasförmige Phase, wie es in dem entwickelten Aufbau nötig war, ist ein niedriger Dampfdruck erforderlich. Sowohl Diethylether (859 hPa Dampfdruck bei 30 °C) als auch das anästhesiologisch relevantere Sevofluran (422,6 hPa Dampfdruck bei 36 °C) waren geeignet. Gleichzeitig waren die jeweils erzeugten Peaks in der Gaschromatographie ausreichend voneinander entfernt und klar von weiteren, in jeder Messung vorkommenden Peaks abzugrenzen. Diese weiteren Peaks resultierten beispielsweise aus dem Perfusionsmedium oder dem verwendeten 2-Komponenten-Epoxidharz. Die Dauer einer Einzelmessung sollte einen möglichst hochfrequenten Messzyklus durchführbar machen, welcher logistisch zu realisieren war. Unter diesen Bedingungen wurde die nachfolgende Methode erstellt (vgl. Tabelle 8, S. 29).

Tabelle 8: Übersicht GC-Messmethode

Run Time [min]	2
Inlet Temperature [°C]	130
Back Detector Heater [°C]	250
N2 Makeup Flow [mL/min]	25
H2 Flow [mL/min]	30
Air Flow [mL/min]	400
Data Rate [Hz]	20
Column	J&W Scientific 125-1334; DB 624
Length [m]	30
Inner Diameter [mm]	0.53
Capillary Tubing	Fused Silica
Film Thickness [µm]	3
Pressure [kPa]	32.26
Flow [mL/min]	4.3551
Average Velocity [cm/s]	39.017
Holdup Time [min]	1.2815

2.7.5 Kalibration zur Umrechnung von pAs in ppm

Mittels externer Kalibrierung wurde eine Quantifizierung des Gehaltes an Ether und Sevofluran in den gasförmigen Proben aus dem Raum über der Glasmembran im Membranslide erstellt. Dabei wurde mittels dreier Messreihen ein Mittelwert für den Regressionskoeffizienten zur Umrechnung zwischen pAs und ppm gebildet. Darauf basierend erfolgte die Umrechnung der Messergebnisse mit der nachfolgend genannten Regressionsgleichung.

Regressionsgleichung: $c \text{ [ppm]} = b \times \text{Signal [pAs]}$

Regressionskoeffizienten: $b \text{ (Ether)} = 4,09$; $b \text{ (Sevofluran)} = 3,51$

In der folgenden Abbildung 12 auf Seite 30 sind die Messreihen der Kalibrierung dargestellt. Zusätzlich ist zur Visualisierung des linearen Zusammenhangs zwischen pAs und ppm für die beiden Tracer die jeweilige Trendlinie eingezeichnet.

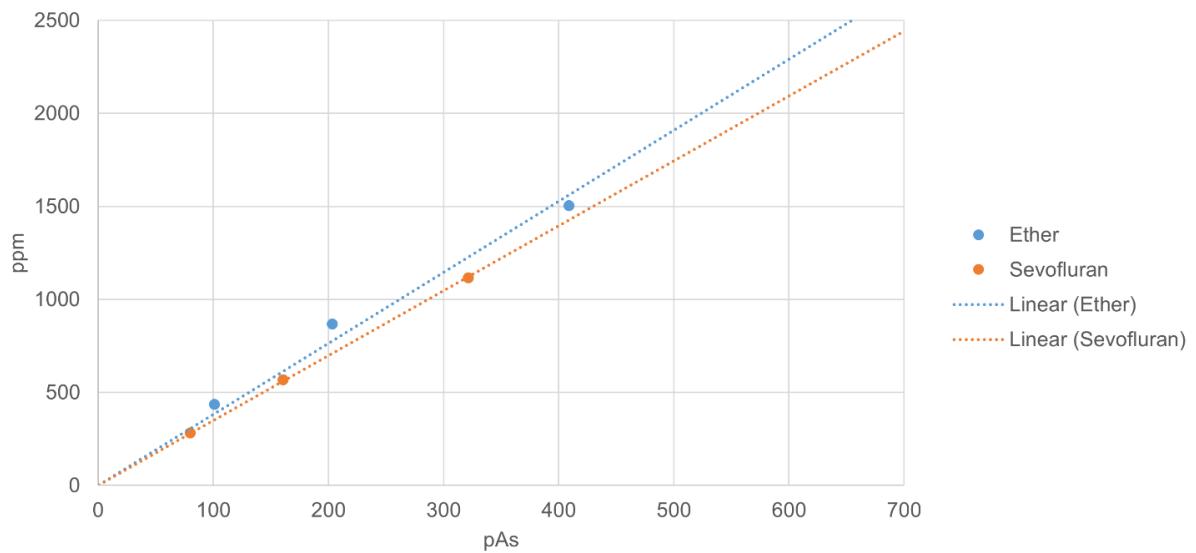


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Signal des Flammenionisationsdetektors (FID) [pAs] und Gaskonzentration [ppm]

2.8 Entwickelte Methode

2.8.1 Vorbereitung des Membranslides

Auf Basis der Methodenentwicklung (vgl. Kapitel 2.7, S.24ff) wurde folgender Versuchsaufbau konstruiert: Das Membranslide wurde mit dem Schlauchsystem für 12 h in den Inkubator gestellt. Vor Verwendung erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Glasmembran. Dann wurde das Membranslide unter der Sicherheitswerkbank in eine sterile Zellkulturschale transferiert. Es wurde kontinuierlich auf ein möglichst hohes Maß an Sterilität geachtet. Gemäß Herstellervorgaben (26,27) wurden beide Kanäle mit Kollagen IV (Artikel 354233 von Corning Inc., vgl. Tabelle 6, S. 18,) beschichtet. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden beide Kanäle mit Zellkulturmedium (vgl. Tabelle 3, S. 17,) gespült. Darauf wurden HUVEC mit einer Konzentration von 2 Millionen Zellen pro Milliliter im unteren Kanal ausgesät. Anschließend wurde das Slide im invertierten Zustand für 2 h in den Brutschrank (37 °C; 5 % CO₂) gestellt. Bevor der Anschluss an das Pumpsystem erfolgte, wurden die Zellen im Slide mikroskopisch kontrolliert. Es wurde auf ausreichend dichtes Anwachsen der Zellen geachtet.

Das Membranslide wurde in einem Inkubator (5 % CO₂; 37 °C) an die Pumpe angeschlossen und die Atmosphäre mittels Narkosegerät und Kapnometer kontrolliert (vgl. Kapitel 2.1.2, S. 16). Die Perfusion wurde schrittweise gesteigert (vgl. Tabelle 9, S. 32). Ab diesem Zeitpunkt erfolgte circa alle 12 h ein Wechsel des Perfusionsmediums. Es wurde eine Zellkonfluenz von 100% abgewartet, definiert als der Zeitpunkt, an dem eine Fläche zu 100% von Zellen bedeckt ist und keine Lücken zwischen den Zellen bestehen. Dann wurde der weitere Aufbau des Experiments gestartet. Dafür wurde die Perfusion kurzzeitig gestoppt und zunächst die Gasanschlüsse eingebaut (vgl. Kapitel 2.7.2, S. 25). Anschließend erfolgte der Verschluss der Druckausgleichskanäle mit Silikon (vgl. Kapitel 2.7.3, S. 26). Das Membranslide mit Zellkulturschale wurde auf einer Hebebühne platziert, sodass es sich 7,7 cm über dem Füllstand in den beiden Reservoirs der Pumpe befand (vgl. Abbildung 13, S. 32). In jedem Reservoir befand sich circa 7 mL Zellkulturmedium. Nun wurde die Perfusion fortgesetzt.

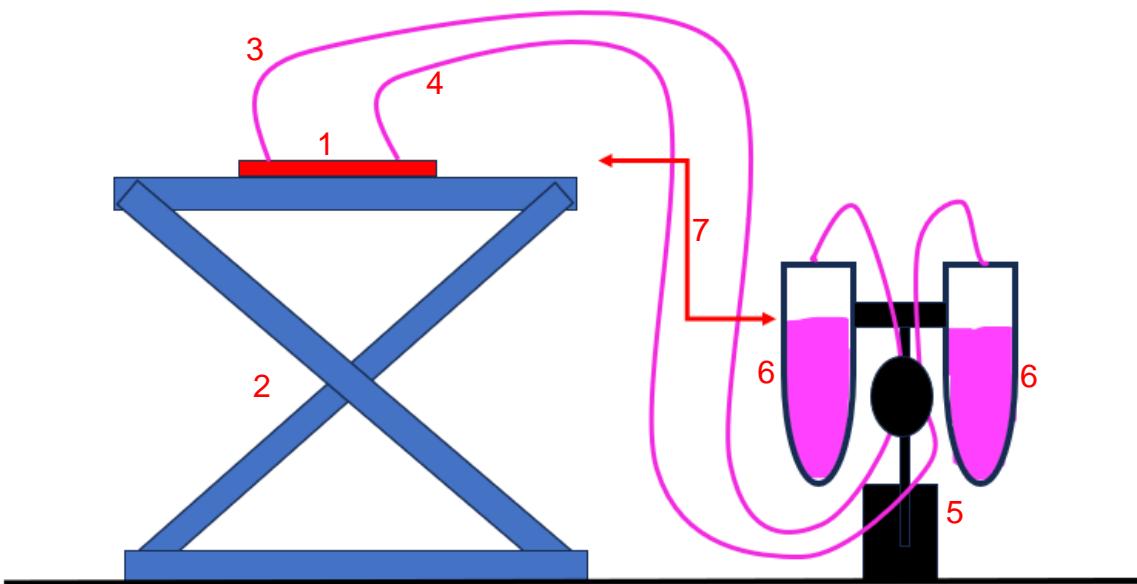


Abbildung 13: Schema für Höhenverhältnis zwischen Füllstand in Reservoirs und Membranslide

1: Membranslide; 2: Hebebühne (höhenverstellbar); 3: Zuleitung Perfusionsmedium; 4: Ableitung Perfusionsmedium; 5: Pumpe; 6: Reservoir mit Perfusionsmedium gefüllt (lila); 7: Höhendifferenz zwischen Füllniveau Reservoirs und Membranslide

Tabelle 9: Übersicht über Pumpenkonfiguration

Dauer [min]	Scherkraft [dyn/cm ²]	Druck [mbar]
60	2	6
60	5	12
unbegrenzt	10	25

2.8.2 Ablauf eines Diffusionsversuches

Zunächst wurde der Pumpendruck auf 10mbar herabreguliert, was laut Herstellerangaben einer Scherkraft von 4 dyn/cm² entspricht. Diese Kraft entsteht durch den Fluss des Perfusionsmediums im Kanal. Danach wurde die Freiheit von Flüssigkeit des oberen Kanals sichergestellt. Nun wurde eine Vorverdünnung des Tracers erstellt, um dann das gesamte zirkulierende Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 0,1 µL Tracer pro mL zu bringen. Auf Grund des Experimentaufbaus konnte die Zugabe des Tracers jedoch nur zur Perfusionsflüssigkeit in den beiden Reservoirs erfolgen. Die übrige Flüssigkeit in den Schläuchen wurde bei Start der Pumpe schrittweise in das Reservoir gepumpt, bis eine vollständige Vermischung erreicht wurde. Als Tracer kamen Sevofluran und Diethylether zum Einsatz. Die

Zeitmessung wurde mit anschließendem Start der Perfusion begonnen. Die Probenabnahme von 50 μL Luft erfolgte zunächst bei Minute 1, dann alle 3 Minuten bis Minute 40, jeweils mittels gasdichter Spritze über die abführende 60 cm Glaskapillare. Vor einem erneuten Diffusionsversuch wurde jeweils eine Leerwertprobe bestimmt, um sicherzugehen, dass die Ergebnisse nicht durch noch vorhandene Tracer beeinflusst werden. Pro Membranslide wurden 6-8 Versuchsdurchläufe, verteilt auf 3-4 Tage, durchgeführt.

2.8.3 Auswertung der Diffusionsversuche

Als primärer Outcome wurde die Entwicklung der Tracerkonzentration in der Gasphase über die Zeit beobachtet. Das Experiment wurde auch mit unbeschichteten oder nur beschichteten, aber immer zellfreien Membranslides durchgeführt („Leerwerte“). Zusätzlich wurde der Wert T_{\max} [min] eingeführt (vgl. Abbildung 14, S. 33). Dieser wurde definiert als Zeitpunkt, an welchem die Konzentration des Tracers den höchsten Wert im Experiment erreichte. Zur Berechnung wurde jeder Versuchsdurchlauf einzeln als Annäherung durch eine Funktion 2. Ordnung ($f(x) = a x^2 + c$) abgebildet und die erste Ableitung ($f'(x)$) davon erstellt. Deren Nullstelle ($f'(0)$) ergab dann den T_{\max} -Wert in Minuten.

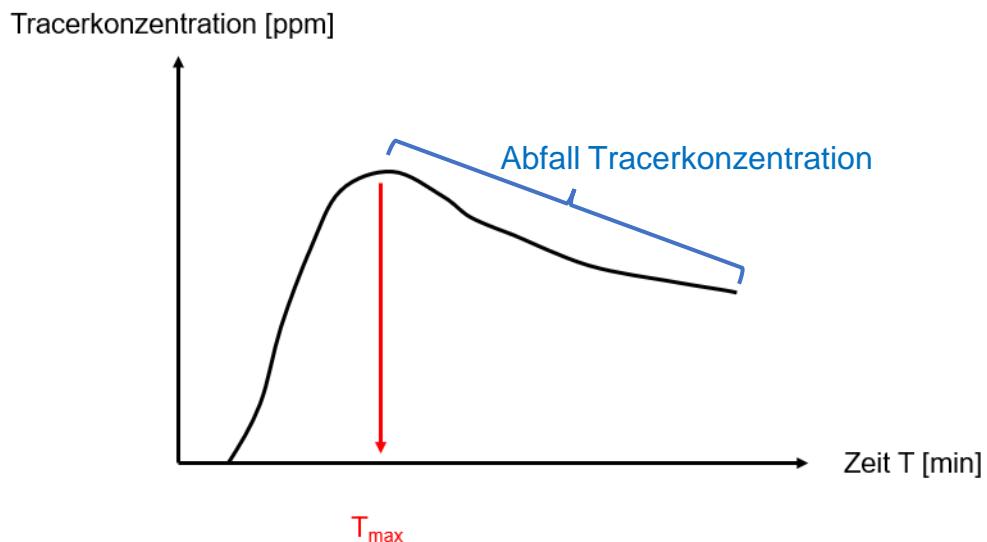


Abbildung 14: Definition der T_{\max} [min] in Bezug auf die Tracerkonzentration [ppm] und Darstellung des Abfalls der Tracerkonzentration

Mittels eines Versuches, bei dem zu Minute 0 der Tracer Ether und bei Minute 40 der Tracer Sevofluran dem Experiment hinzugefügt wurde, wurde die Interaktion der beiden Tracer miteinander genauer untersucht.

Alle relevanten Daten zu den Versuchsdurchläufen wurden in einer Exceldatei zusammengefasst und anschließend mittels SPSS und Phoenix analysiert. Mittels Kolmogorow-Smirnow-Tests wurde auf Normalverteilung getestet. Anschließend wurden die Ergebnisse im Rahmen einer einfaktoriellen Varianzanalyse untersucht.

2.9 Pharmakokinetisches Modell und Simulation

In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Gruber (Leiter Forschungslabor, Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinik Regensburg) wurde in Phoenix auf Basis der experimentell gewonnenen Daten der Tracerdiffusion ein 2-Kompartimenten-Modell entwickelt (vgl. Abbildung 15, S. 35). Dabei wurde die Diffusion eines Tracers dargestellt, welcher mit einer gewissen Verzögerung (Tlag) in den unteren, flüssigen Kanal (C_L) kommt und aus diesem in den oberen, gasförmigen Kanal (C_G) diffundiert. Wie bereits beschrieben (vgl. Kapitel 2.8, S. 31) erfolgte im oberen Kanal eine Konzentrationsmessung (C_{Obs}). Zusätzlich bestand ein Austausch mit der Atmosphäre (A_{Atmos}), da der obere Kanal während des Experiments dauerhaft offen war. Zusätzlich sind zwei Parameter dargestellt, welche den bidirektionalen Austausch zwischen den beiden verbundenen Kompartimenten (Q_{L_G}) bzw. der Elimination in die Umwelt (CL_{G_A}) darstellen. Die Bedingungen Gel + Zellen, nur Gel und keine Beschichtung wurden als Cofaktoren definiert.

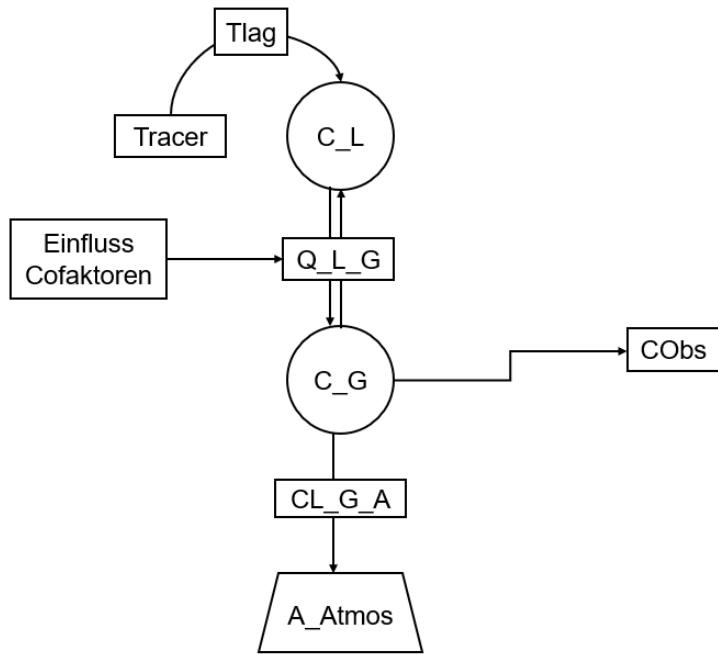


Abbildung 15: Grafische Darstellung 2-Kompartimentemodell

Es wurde eine Kurvenannäherung (Iteration) an die experimentell erhobenen Diffusionswerte durchgeführt auf Basis der nachfolgenden Startbedingungen (vgl. Tabelle 10, S. 35):

Tabelle 10: Startbedingungen für Iteration

Bezeichnung	Startwert
Start Time [min]	0
Duration [min]	100
tvV_L [L]	0.016
tvTlag [min]	8
tvV_G [L]	0.4
tvQ_L_G [L/min]	1
tvCL_G_A [L/min]	0.01

Auf den Ergebnissen der Iteration basierend wurde eine Simulation der Tracerkonzentration mit 1000 Durchläufen für jeden der 3 Cofaktoren bei beiden Tracern (Ether bzw. Sevofluran) durchgeführt. Es wurde festgelegt, dass die Cofaktoren in der Simulation nur den Austausch zwischen flüssiger und gasförmiger Phase ($Q_{L,G}$), nicht aber die Zeitverzögerung des Tracers (T_{lag}), den Austausch zwischen Gasphase und Atmosphäre ($CL_{G,A}$) und das Gas-/ Flüssigkeitsvolumen beeinflussen dürfen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Zellformen unter Perfusion

In der nachfolgenden Abbildung 16 werden die Ergebnisse aus den Versuchen zur Zellausrichtung unter Perfusion dargestellt (vgl. Kapitel 2.6, S. 21). Hier wurde der Median für den Betrag der X-Komponente der langen Halbachse des Ellipsoids (Vektor C) beziehungsweise der Zellen (vgl. Abbildung 8, S.24) gebildet. Anschließend wurde dieser gegen die Versuchsdauer aufgetragen. Eine Konzentration von 1,5 Mio. und eine von 0,8 Mio. Zellen pro Milliliter wurde hier gemeinsam visualisiert. In der frühen Phase (0h-53h) befand sich der Median der X-Komponente der langen Halbachse (Vektor C) beider Zellkonzentrationen im gleichen Bereich von circa 0,9. Hier bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,05$). In der späten Phase (54h-93h) gab es einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen, welcher grenzwertig zur Signifikanz ($p = 0,057$) war. Der Median der Gruppe mit 1,5 Mio. Zellen pro mL lag konstant nahe einem Wert von 1 für die X-Komponente der langen Halbachse (Vektor C).

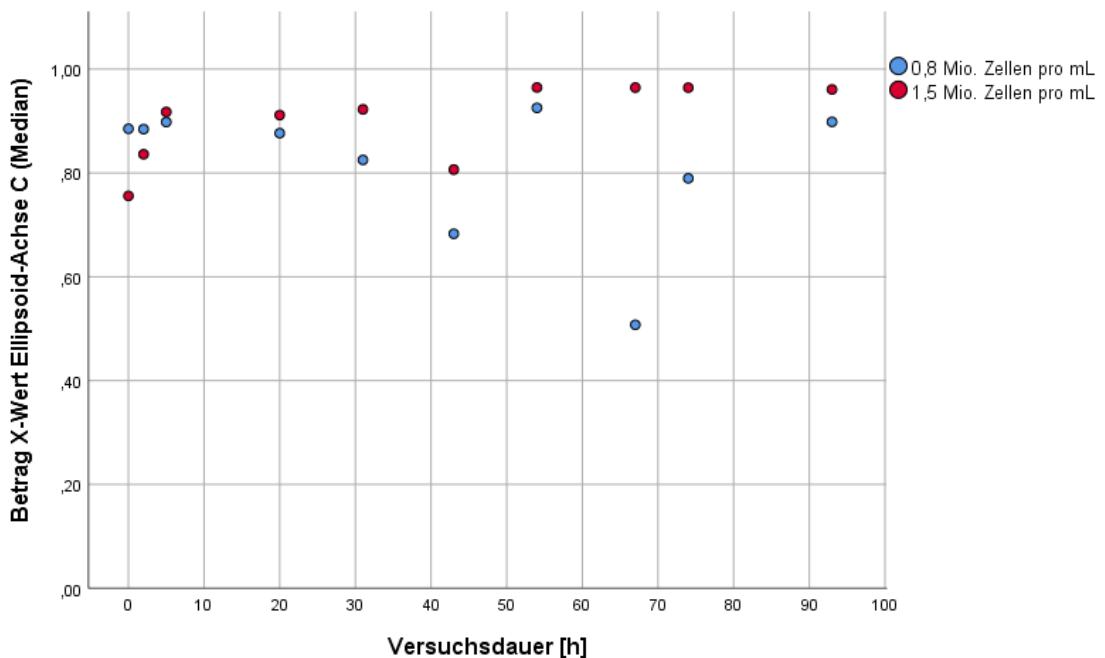


Abbildung 16: Entwicklung der Zellausrichtung während Perfusion bei unterschiedlicher initialer Zellkonzentration

3.2 Auswertung der Tracerdiffusion in einem Membranslide

In Abbildung 17 ist eine Aufnahme der porösen Glasmembran im Ganzen zu sehen. Hierbei wird deutlich, dass der gesamte Bereich homogen von einer Schicht aus Endothelzellen überzogen ist. Beim nachfolgenden Bild (vgl. Abbildung 18, S.38) handelt es sich um eine Vergrößerung aus der Abbildung 17. Dabei sind besonders die Zellen gleichzeitig mit den in der Glasplatte vorhandenen Löchern sichtbar (vgl. auch Abbildung 28, S. 48). Dies ist beweisend dafür, dass die Zellen sich an der richtigen Stelle in adäquater Konzentration befanden und damit die Vorbedingung für einen Perfusionsversuch erfüllt waren (vgl. Kapitel 1.8, S. 14).

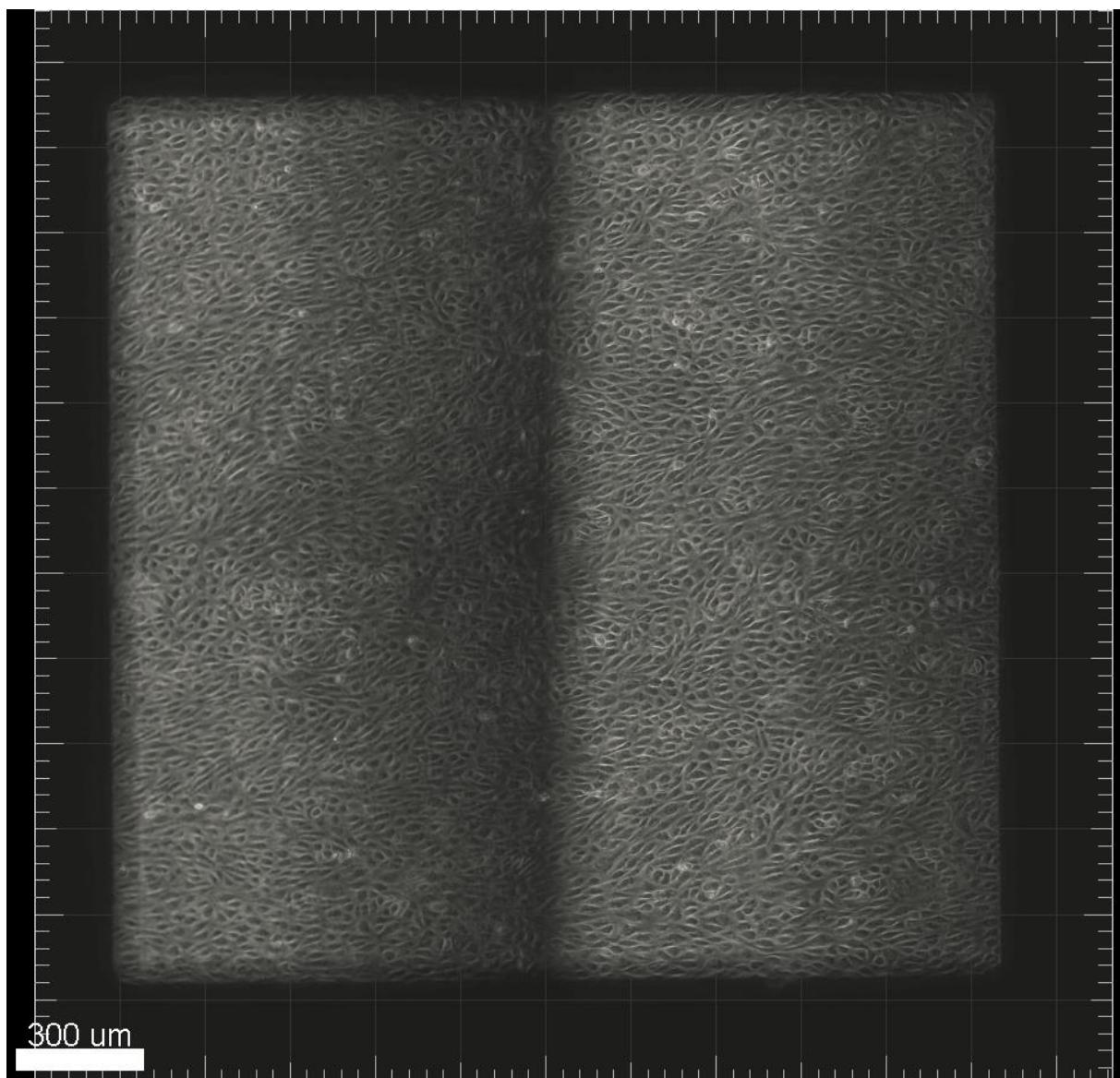


Abbildung 17: Mikroskopaufnahme der Membran mit konfluenter HUVEC-Schicht; in der Mitte Artefakt (Streifen)

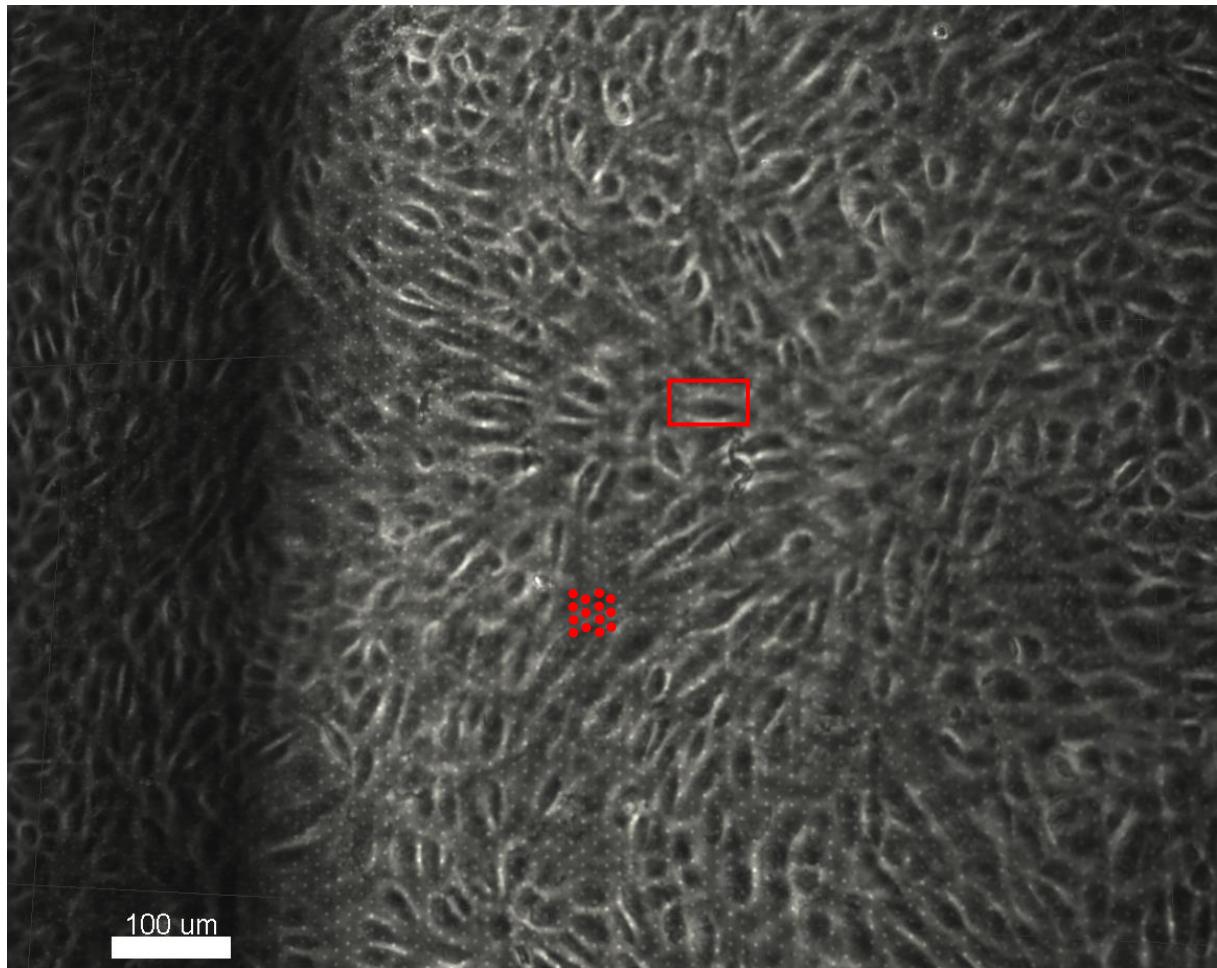


Abbildung 18: Vergrößerung aus Abbildung 17; Zellen (Rechteck) und Löcher (Punkte) je exemplarisch markiert; auf Membran gleichzeitig sichtbar

Auf Basis der entwickelten Methode (vgl. 2.8, S. 31) wurden die folgenden Ergebnisse der Tracerdiffusion erhoben:

In Abbildung 19 (vgl. S. 39) sind die Absolutwerte der Diffusion der beiden Tracer dargestellt, hinter jeder Kurve stehen 3-4 einzelne Versuchsreihen. Hierbei ist zu erkennen, dass bei beiden Tracern erst ab Minute 7 ein Wert gemessen werden kann. Alle Kurven steigen anschließend zu ihrem Maximum an und fallen anschließend ab. Dieser absolute Maximalwert ist bei Ether um Faktor 4-5 größer als bei Sevofluran.

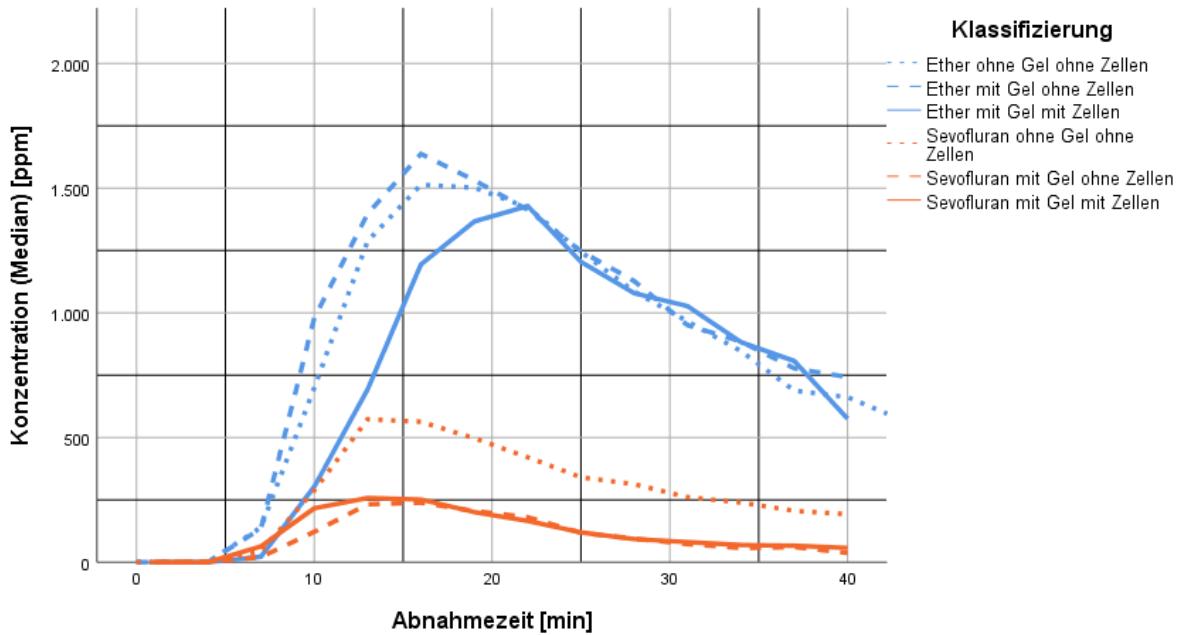


Abbildung 19: Absolutwerte der Tracerdiffusion bei verschiedenen Membranzuständen

Bei den Versuchen konnten vereinzelt deutlich abweichende Ergebnisse der Tracerkonzentration gemessen werden (vgl. Abbildung 20, S. 39). Diese traten hauptsächlich bei Sevofluran auf und unterschieden sich um circa Faktor 3. Wie zu erkennen ist, war der relative Verlauf der Tracerdiffusion im Vergleich zu den übrigen Durchläufen nicht beeinflusst.

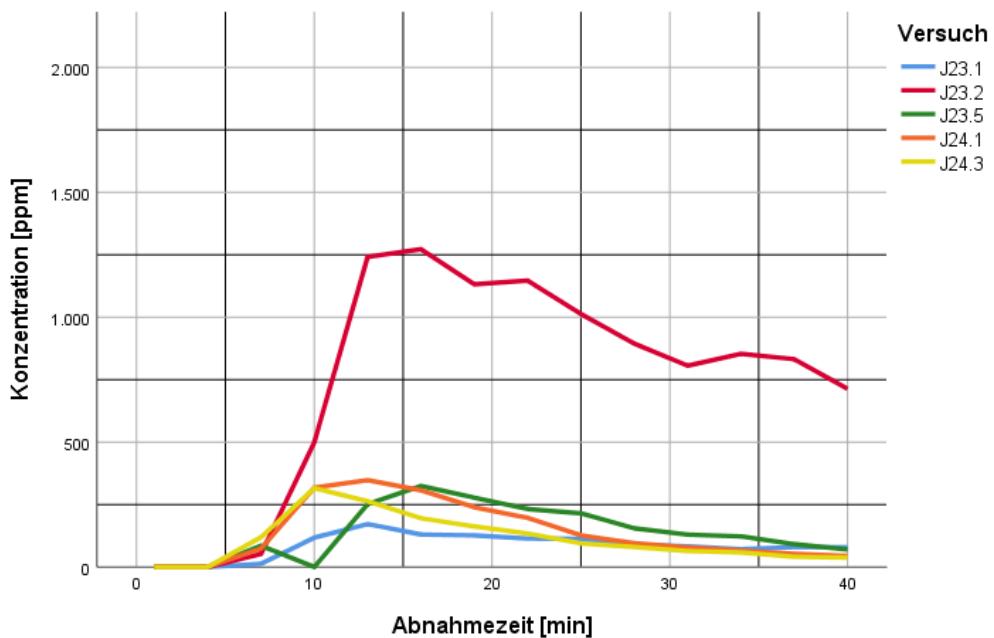


Abbildung 20: Zeitabhängige Entwicklung der absoluten Sevofluran Konzentration in den Versuchen mit Zellen

In Abbildung 21 (vgl. S. 40) ist eine zeitlich enge Abfolge eines Durchlaufs mit Ether gefolgt von einem Durchlauf mit Sevofluran dargestellt. Hier wurde bei Minute 0 Ether und bei Minute 40 Sevofluran hinzugegeben. Zunächst steigt ab Minute 7 die Konzentration des Ethers im oberen Kanal bis zu seinem Maximum an und fällt anschließend ab. Bei Minute 46 ist ein weiterer Anstieg bei der Etherdiffusion zu erkennen. Anschließend steigt ab Minute 49 auch der gemessene Wert des Sevofluran an. Es ist zu erkennen, dass beide Tracer ihr Maximum sowohl zu der üblichen Abnahmezeit als auch in der üblichen absoluten Höhe erreichen.

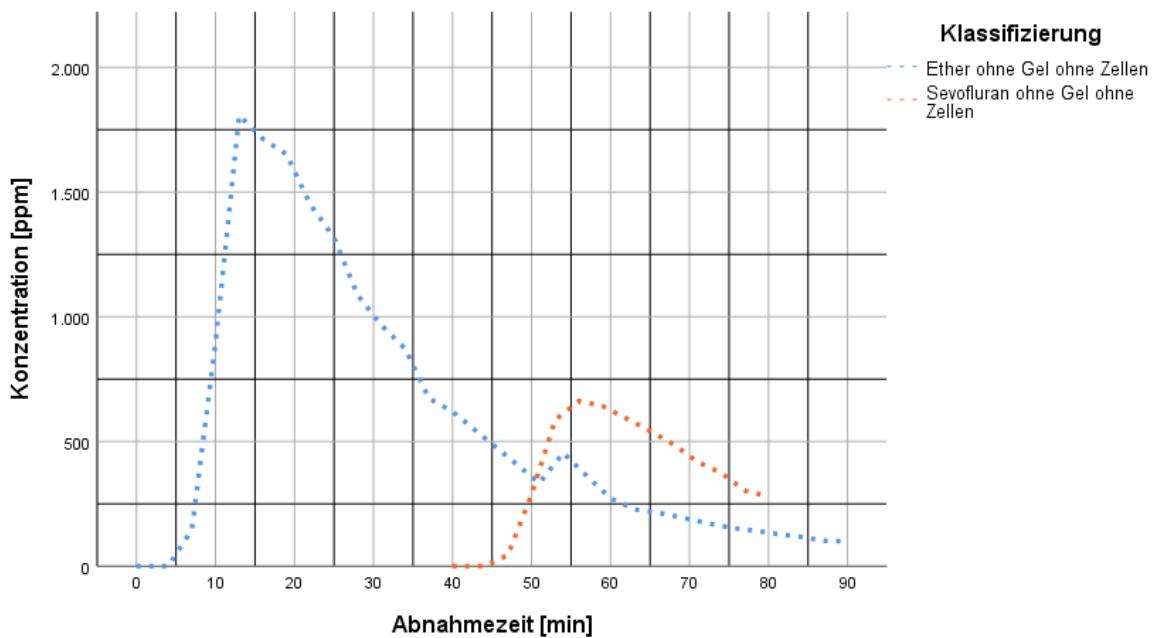


Abbildung 21: enge zeitliche Abfolge zwischen der Diffusion von Ether und Sevofluran

Als Reaktion auf diese Erkenntnisse wurde folglich der Verlauf der Tracerkonzentration relativ zum Maximalwert des jeweiligen Versuchsdurchlaufs analysiert. In der Abbildung 22 und Abbildung 23 (vgl. S. 41) ist für die beiden Tracersubstanzen Ether und Sevofluran jeweils unter den verschiedenen Membranbedingungen (vgl. Cofaktoren) die Entwicklung der Tracerkonzentration in der Gasphase des oberen Kanals relativ zum Maximalwert der Tracerkonzentration des jeweiligen Versuchsdurchlaufs über den gesamten Versuchszeitraum von 40 Minuten aufgetragen.

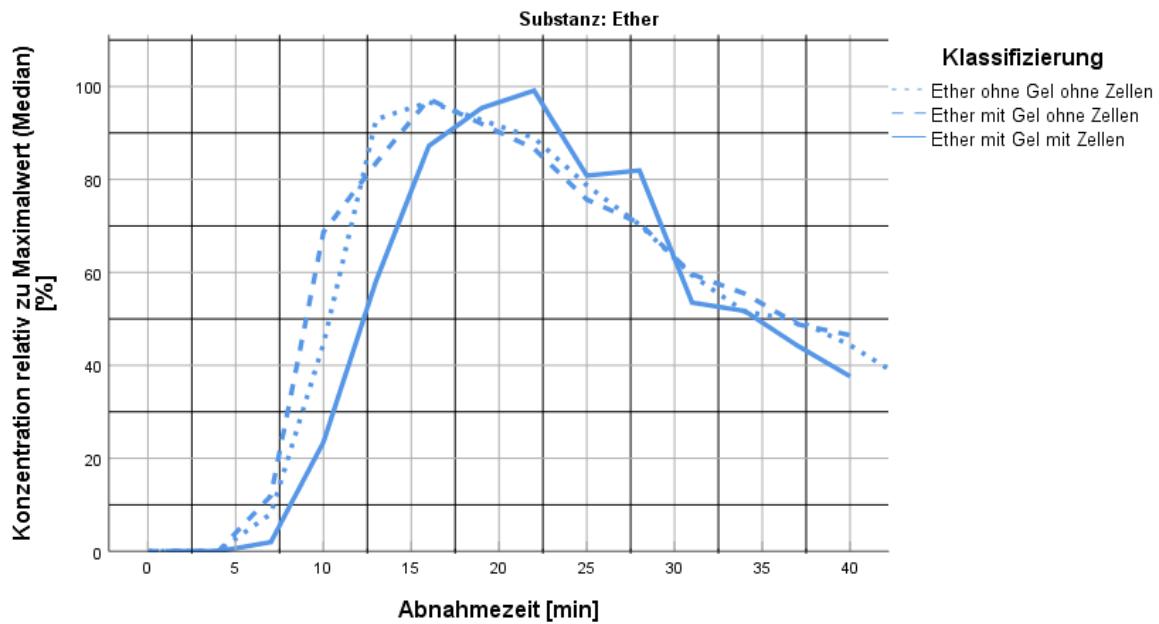


Abbildung 22: Entwicklung der Etherkonzentration relativ zum Maximalwert bei unterschiedlichen Membranzuständen

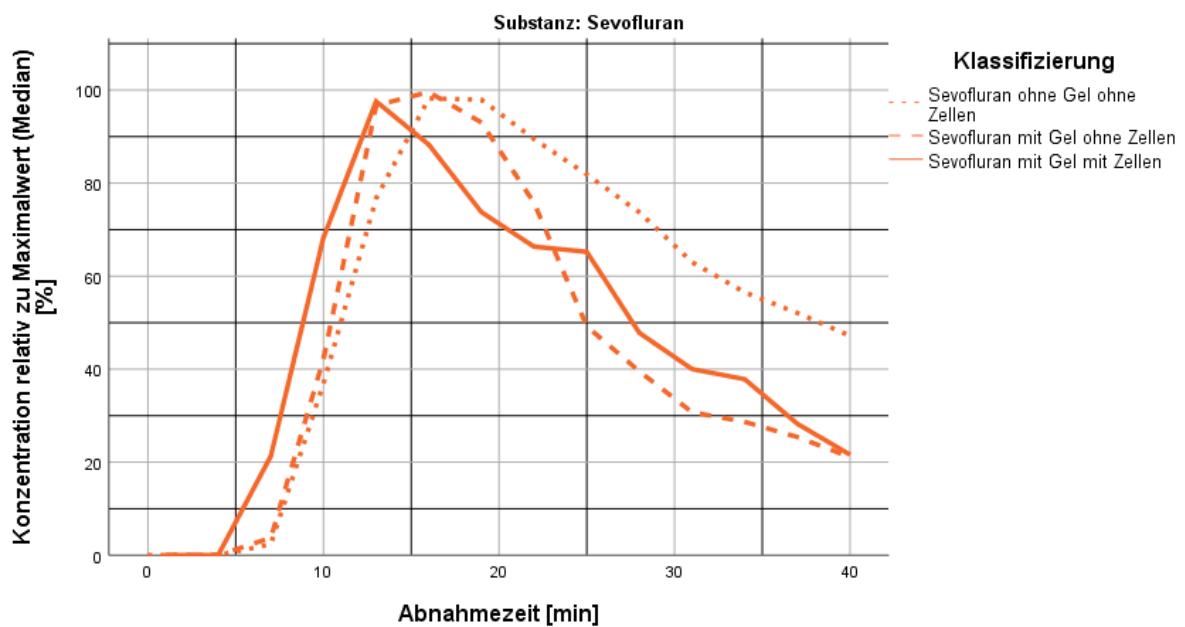


Abbildung 23: Entwicklung der Sevoflurankonzentration relativ zum Maximalwert bei unterschiedlichen Membranzuständen

Bei Betrachtung der Graphen erkennt man, dass bei beiden Substanzen kein Wert im Zeitraum zwischen Minute 0 und 4 messbar war. Bei beiden Tracern folgt nach Erreichen des Maximums ein Abfall der Konzentration bis zum Ende des Experiments bei Minute 40. Hier konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) hinsichtlich der beiden Tracer und der unterschiedlichen Membranzustände (leere

Membran; mit Coating; mit Zellen) festgestellt werden. Die Mittelwerte der maximalen Tracerkonzentration (T_{max}) befanden sich in dem Bereich zwischen 17,7 und 19,5 Minuten für Ether und 14,5 und 18,4 Minuten für Sevofluran ($n = 4 - 5$). Es zeigte sich zwischen den verschiedenen Membranzuständen wie auch in Bezug auf die unterschiedlichen Diffusionssubstanzen kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) (vgl. Abbildung 24, S.42).

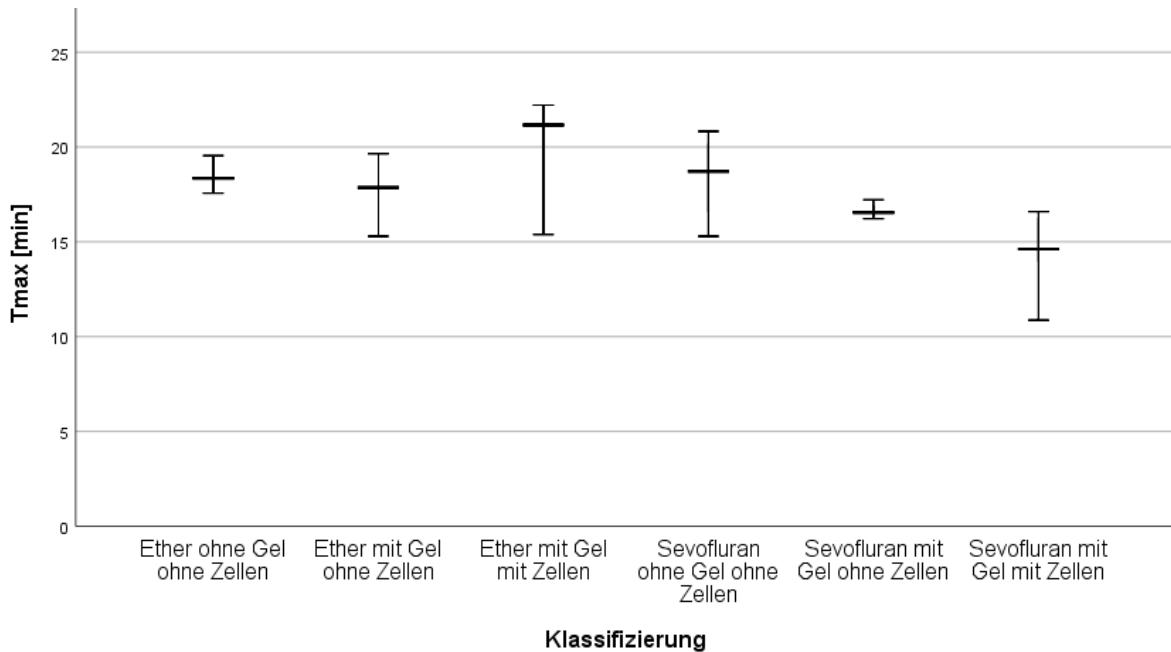


Abbildung 24: Vergleich der T_{max} (Mittelwerte inkl. Streubereich) untereinander zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen

3.3 Ergebnisse von pharmakokinetischen Modell und Simulation

Nachfolgend ist zunächst die Iteration der Konzentrationskurven an die in dieser Arbeit gemessenen Konzentrationen beispielhaft dargestellt (vgl. Abbildung 25, S. 43). Für die Iteration musste mit der Konzentrationseinheit [nmol/L] im Gegensatz zur sonst verwendeten Einheit [ppm] gearbeitet werden, weswegen diese hier auf der y-Achse aufgeführt ist. Anschließend folgen die tabellarisch dargestellten Ergebnisse der Iteration (vgl. Tabelle 11, S. 44). Die genannten Parameter beziehen sich hierbei auf die Abbildung 15 auf Seite 35. Ein vorgestelltes „tv“ steht hierbei für „typical value“, ein „d“ für den Einfluss des Cofaktors auf den jeweiligen Parameter. Bei den beiden Einflussfaktoren „Q_L_G“ und „CL_G_A“ meint der „tv“-Wert jeweils den Standard

ohne Gel ohne Zellen. Der Parameter dQ_L_G (Austausch zwischen flüssigem und gasförmigem Kompartiment) zeigt den jeweiligen Einfluss der Cofaktoren (z.B. Ether mit Gel mit Zellen) auf den Austausch zwischen den Kompartimenten an. Die Berechnung basiert auf folgender Funktion:

$$A = tvA \times \exp (dA(Klassifizierung))$$

A = analysierter Parameter, z.B. Elimination in die Umwelt; tvA = typischer Wert für A; dA = Abweichungstendenz von A

Es wird deutlich, dass wenn der Parameter dA (Cofaktor) $\rightarrow 0$; dann entspricht A den typischen Werten (tvA). Der untersuchte Cofaktor (Gel/Gas/Zellen) hat also nur einen geringen Einfluss auf den Parameter. Wenn hingegen dA (Cofaktor) $\neq 0$; zeigt dies mit steigendem Wert einen zunehmenden Einfluss des entsprechenden Cofaktors an. Die Simulation wurde basierend auf den Ergebnissen der Iteration getrennt für Ether und Sevofluran durchgeführt, nachfolgend sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

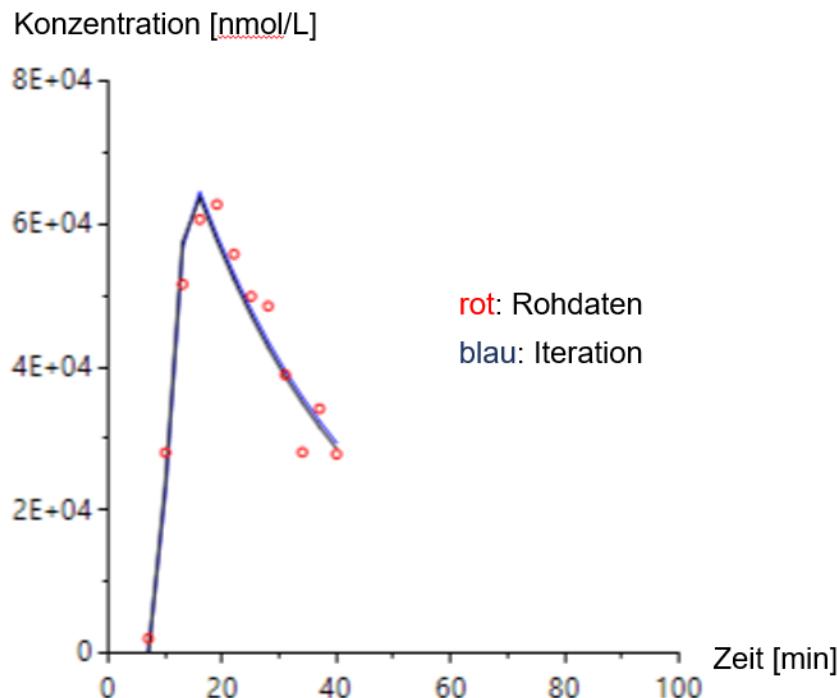


Abbildung 25: beispielhafte Iteration bei Ether

Tabelle 11: Ergebnisse der Iteration

Parameter	Ether	Sevofluran
tvV_L [L]	0.016	0.016
tvTlag [min]	8	8
tvV_G [L]	0.18	0.74
tvQ_L_G [L/min] (ohne Gel ohne Zellen)	1.00	1.02
dQ_L_G (mit Gel ohne Zellen)	0.004	-0.014
dQ_L_G (mit Gel mit Zellen)	-0.002	0.043
tvCL_G_A [L/min] (ohne Gel ohne Zellen)	0.006	0.03

Im Nachfolgenden (vgl. Abbildung 26f, S. 44f) sind nun die Mediane der simulierten Konzentrationswerte der beiden Tracer Ether und Sevofluran dargestellt. Die Kurven steigen auf ihren Maximalwert an, nachdem sie die ersten Minuten bei null sind und fallen anschließend dauerhaft ab.

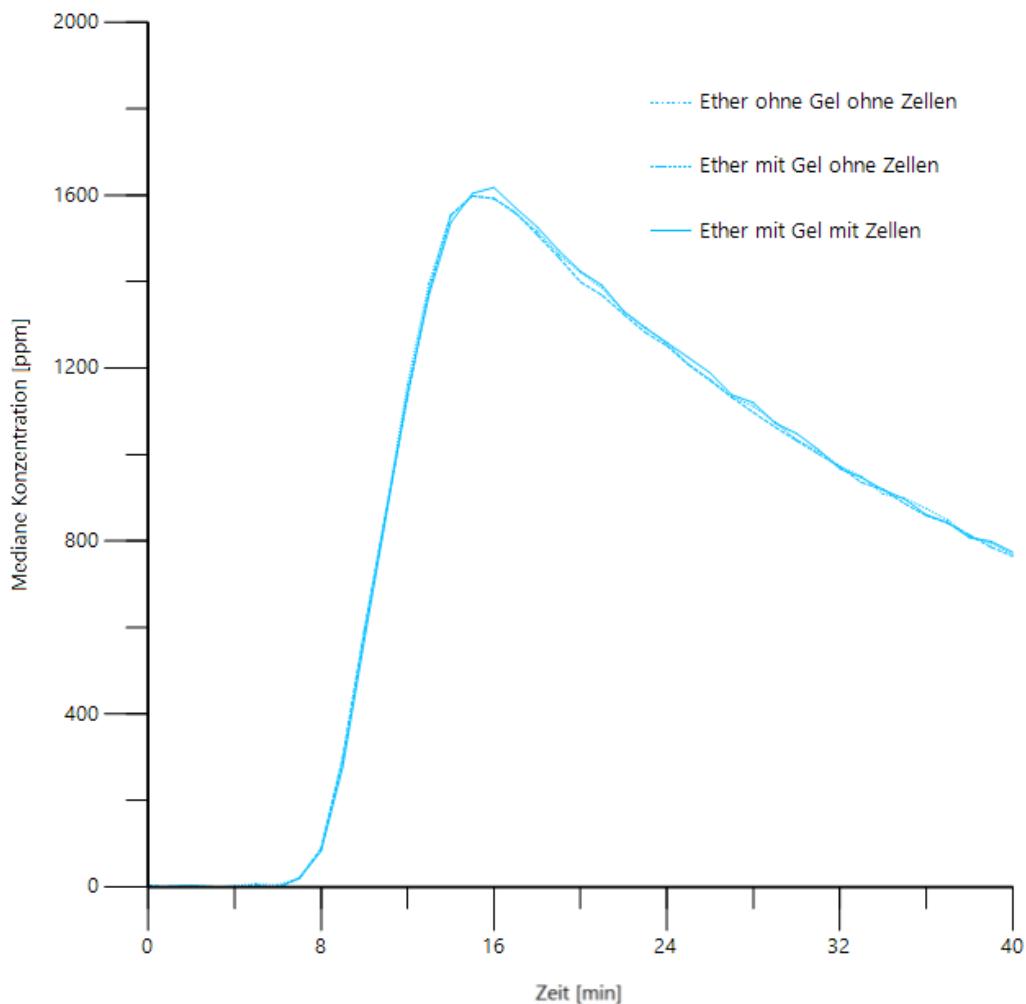


Abbildung 26: Mediane Konzentrationen der Simulation mit Ether

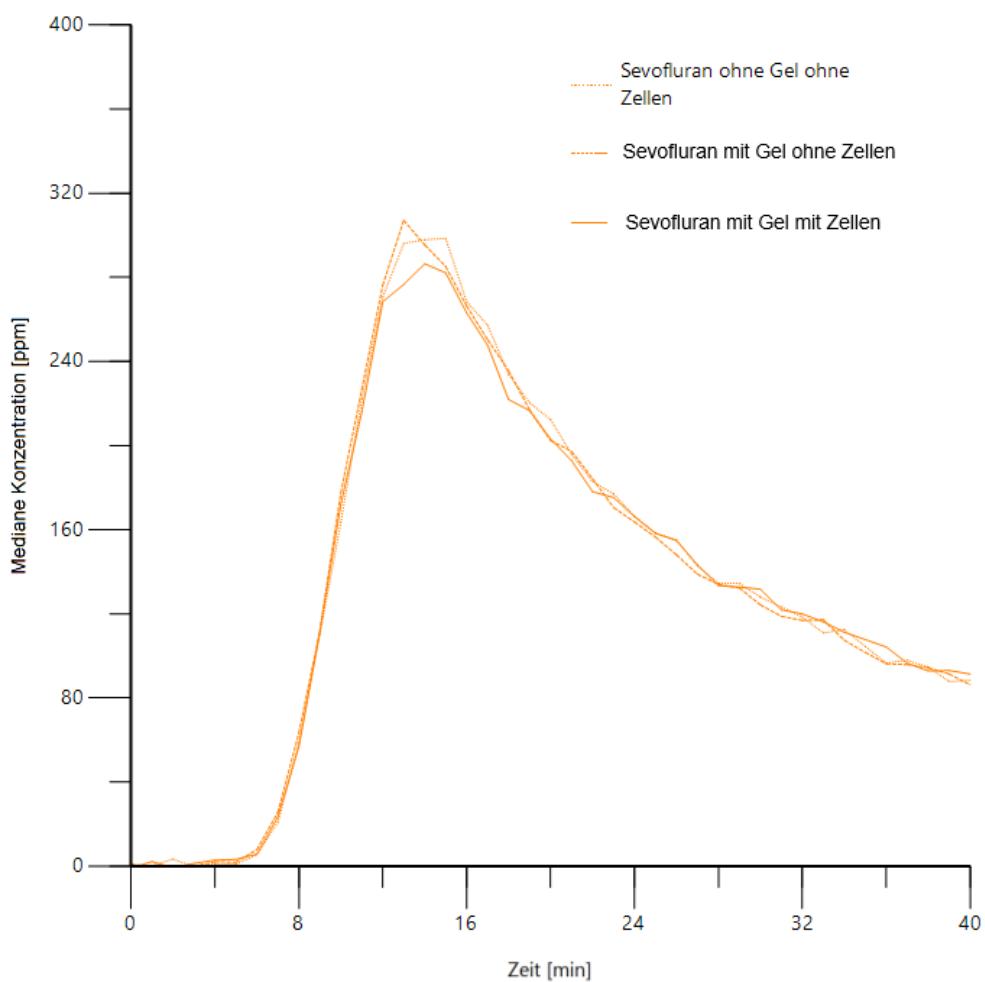


Abbildung 27: Mediane Konzentrationen der Simulation mit Sevofluran

In der Simulation befanden sich die T_{\max} - Werte im Bereich 15 - 16 Minuten für Ether und 13 - 14 Minuten für Sevofluran.

4 Diskussion

4.1 Endothelzellkultivierung

Um den Prozess der Kultivierung von Endothelzellen unter Flussbedingungen zu etablieren (vgl. 2.6, S. 21), wurde das „ μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom“ (ibidi GmbH) verwendet, um einen ähnlichen Untergrund (Glass) für die Zellkultivierung zu verwenden wie im späteren Membranslide. Hier war es Ziel eine Ausrichtung der Zellen linear zum Fluss sowie eine Elongation beobachten zu können. Diese Veränderungen entsprechen einerseits physiologischen Verhältnissen, andererseits werden dadurch Zellstoffwechsel und Permeabilität beeinflusst (28).

Wie beschrieben (vgl. 2.7.1, S. 24) scheiterte die direkte Übertragung der Methode der HUVEC-Kultivierung von dem verwendeten „ μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom“ zum Membranslide. Unerwartet, da allein der Aspekt der Porosität das Membranslide vom „ μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom“ unterscheidet. Dies wurde auch nicht durch eine verlängerte Zeit zum Anwachsen der Zellen ermöglicht, sondern erst durch den Wechsel auf ein humanes Kollagen IV als Coating-Lösung erreicht. Vermutlich waren also die Löcher als einziger unterscheidender Parameter verantwortlich für das Nicht-Anwachsen der Zellen auf dem Gelatine-Coating. Zusätzlich erwies sich auch die Herkunft des Kollagen IV als relevant. Scheinbar führte die unterschiedliche Herkunft des Kollagens zu unterschiedlicher Reaktion der Endothelzellen und verhinderte oder unterstützte (wie bei Kollagen IV aus humaner Quelle) deren Anwachsen auf der Glasmembran.

4.2 Zellausrichtung unter Perfusion

Die Auswertung der Zellausrichtung unter Perfusion (vgl. Abbildung 16, S. 36) erfolgte mit Hilfe des Parameters C X. Ein Wert von 0,5 (gemittelt über alle Zellen) würde einer zufälligen Ausrichtung der Zellen entsprechen. Nähert sich der Wert 1 an, erfolgt eine Ausrichtung parallel zum Fluss. Mit den erhobenen Ergebnissen im Bereich von 0,9 konnte also eine deutliche Ausrichtung der Zellen parallel zum Fluss des Zellmediums gezeigt werden. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden initial ausgebrachten Zellkonzentrationen nachgewiesen werden. In der Serie

mit 0,8 Mio. Zellen pro mL existiert ein Wert bei 67 h, welcher aus dem eigentlich zu erwartenden Ergebnisbereich fällt. Hierbei gilt es zu bedenken, dass der softwarebasierten Auswertung manuell angefertigte Digitalaufnahmen zugrunde liegen. Diese wurden durch eine an ein Lichtmikroskop angeschlossene Digitalkamera aufgenommen. Es war hierbei auf Grund des experimentellen Settings nicht möglich sicherzustellen, dass immer der exakt gleiche Ausschnitt der Zellschicht fotografiert wurde. Vor allem im Bereich der Ein- und Ausleitung des Perfusionsmediums in den Perfusionskanal gibt es bauartbedingt verstärkt Turbulenzen und dadurch vermutlich auch eine verminderte Ausrichtung der Zellen. Grundsätzlich lässt sich jedoch festhalten, dass bei beiden Zellkonzentrationen von Beginn eine Ausrichtung parallel zum Fluss gegeben war.

In den durchgeführten Perfusionsversuchen zeigte sich optisch, dass es nach einer initialen Ausrichtung und Elongation der Endothelzellen wieder zu einem Rückgang dieses Prozesses kommt. Dieser subjektive Eindruck ließ sich beim Blick in die Literatur bestätigen. So haben auch die Kollegen Fey et al. an HUVEC unter kontinuierlicher Perfusion zeigen können, dass es bereits nach 24 h zu einem Rückgang der Zellelongation bei fortgesetzter Scherkraft durch Perfusion kommen kann (29). Die erzeugten Scherkräfte waren hierbei vergleichbar mit denen, welche für das entwickelte BAB-Model angewendet wurden. Eine mögliche Erklärung für den Rückgang der Zellelongation könnte sein, dass mit der Zeit die Zell-Zell-Kontakte zunehmend stärker ausgebaut werden. Dadurch könnte möglicherweise die Anfälligkeit der einzelnen Zelle für den Fluss von Zellkulturmedium reduziert sein und dadurch die Notwendigkeit sich parallel zum Fluss auszurichten nicht mehr gegeben sein. Hiermit wird auch nochmal der enge Zusammenhang zwischen auf die Zelle wirkender Scherkraft und Zellphysiologie, bzw. -morphologie deutlich.

4.3 Umgang mit Glasmembran

Wie bereits zuvor dargestellt erwies sich die poröse Glasmembran als Schwachstelle im entwickelten Experimentaufbau (vgl. Kapitel 2.7.3, S. 26). Für deren Schutz wurden in der verwendeten Version des Membranslides Druckausgleichskanäle eingebaut, welche verschlossen werden mussten (vgl. Kapitel 2.7.3, S. 26). Dadurch wurde die Anfälligkeit der Membran zu brechen noch einmal erhöht. Kritische Zeitpunkte für einen Bruch waren vor allem das erneute Befüllen des unteren Kanals mit

Perfusionsmedium, wenn dieser leer geworden war. Gründe hierfür waren beispielsweise eine Undichtigkeit des Systems, zu niedrige Perfusionsdrücke oder ein falsches Höhenverhältnis zwischen Füllstand im Perfusionsreservoir und der Öffnung des Gaskanals (oberer Kanal) zur Umwelt (vgl. Abbildung 13, S. 32). Ein zweiter kritischer Zeitpunkt für die Membran war das Leeren des Gaskanals von Flüssigkeit. Hierbei musste teilweise mit positivem Druck im Gaskanal gearbeitet werden. Dies führte in Einzelfällen (dreimal von ca. 20 Versuchen insgesamt; jeweils Verlust von ca. 2-4 Tagen Arbeit) zum Bruch der Membran.

Um die Intaktheit der Glasmembran sicherzustellen, wurde zu Beginn bei jedem Membranslide eine optische Kontrolle mittels Durchlichtmikroskopie durchgeführt. Wenn im späteren Verlauf eines Experiments ein Bruch entstand, war es nicht mehr möglich den oberen Kanal von Flüssigkeit zu befreien. Somit war sichergestellt, dass nur Daten erhoben werden konnten, wenn die Membran intakt war. In Abbildung 28 ist eine intakte Membran dargestellt, welche zentral über den gelochten Bereich verfügt. In der Abbildung 29f ist dann zum Vergleich dargestellt, auf welch unterschiedliche Weisen sich der Bruch der Membran optisch präsentierte.

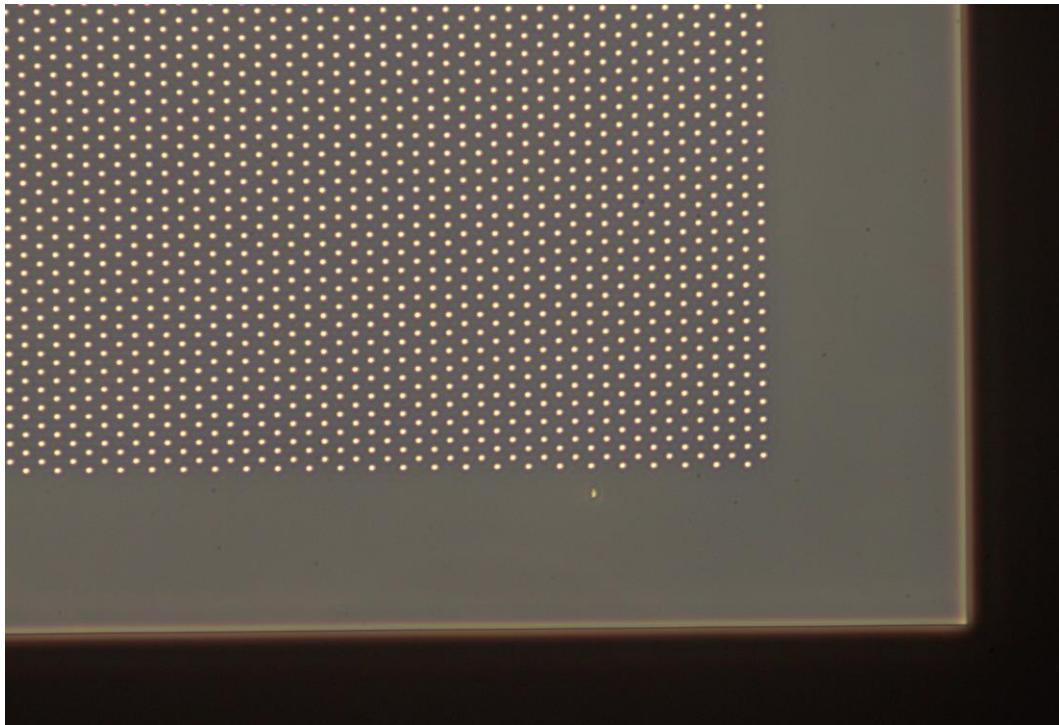


Abbildung 28: intakte Glasmembran in der Fassung (schwarz), 10-fach vergrößert

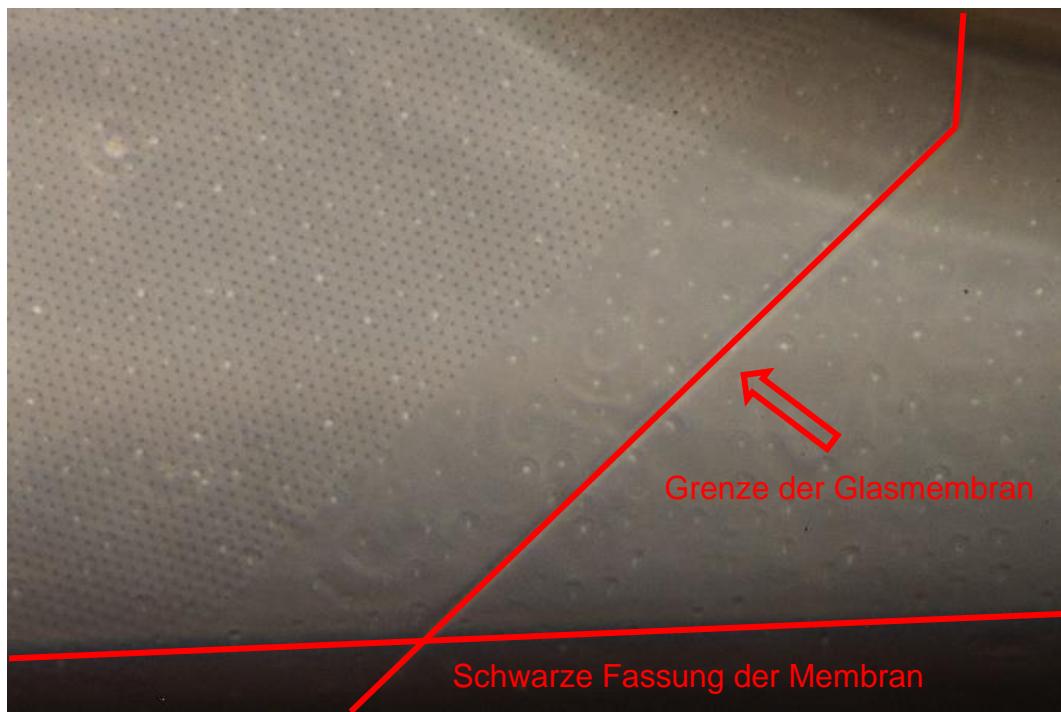


Abbildung 29: poröse Membran im Bild intakt, jedoch aus Fassung herausgebrochen und rotiert, 10-fach vergrößert



Abbildung 30: Membran mit quer verlaufender Bruchlinie inklusive scharfkantigem Bruchstück, 10-fach vergrößert

4.4 Entwicklung eines geeigneten Messzyklus

Für die Analyse der Gasproben durch die Gaschromatographie war es essenziell, den oberen luftgefüllten Kanal des Membranslide über die gesamte Länge eines Versuchs frei von Flüssigkeit zu halten. Die Idee, einen Luftstrom in diesem Kanal anzulegen, musste verworfen werden. Grund war, dass die verwendeten Perfusoren in luftgefülltem Zustand einen leicht oszillierenden Druck auszuüben schienen. Zwar ermöglichte dies, Wassertropfen aus dem oberen Kanal leichter herauszudrücken, beides zusammen führte jedoch zu stark schwankenden Luftflüssen und somit zu unplaublichen Messergebnissen. Schlussendlich ließ sich ohne Gasfluss und allein durch die Höhenverstellung des Membranslides im Vergleich zur Pumpe, inklusive der Füllstände der Reservoirs, eine ausreichend konstante Flüssigkeitsfreiheit des oberen Kanals erreichen (vgl. Abbildung 13, S. 32). Ebenso zeigte sich, dass ein konstanter Zeitabstand zwischen den Einzelmessungen des jeweiligen Experiments wichtig ist. Nur so wurden die Ergebnisse vergleichbar.

4.5 Interaktion zwischen Tracern, Membranslide und Schlauchsystem

4.5.1 Diffusion der Tracer neben der Glasmembran

Grundlage für die Entwicklung eines Blood Air Barrier Model war es, dass die Diffusion der verwendeten Tracer primär durch die poröse Glasmembran inklusive der aufliegenden Coating- bzw. Zellschicht erfolgt. Es war jedoch zu erwarten, dass auch daneben Diffusion durch die Wände der Kanäle im Membranslide stattfindet. Zunächst könnte hierdurch ein Verlust von Ether bzw. Sevofluran an die Umwelt stattfinden. Andererseits könnte auch eine Diffusion in den oberen luftgefüllten Kanal direkt erfolgen. Hierdurch käme es zu falsch positiven Messergebnissen. Vor allem bei Sevofluran ist eine Diffusion in das umgebende Plastik naheliegend auf Grund der Lipophilie.

Im Verlauf der Methodenentwicklung wurde diese Problematik früh identifiziert. Es wurde nach Möglichkeiten gesucht, die poröse Glasmembran als Ort der Tracerdiffusion auszuschalten. Somit konnte der Umfang der Diffusion über andere Wege genauer erhoben werden. Aktuell ist jedoch kein ähnliches Produkt eines Slides mit zwei kreuzenden Kanälen und einer durchgängigen Glasmembran (ohne Löcher)

auf dem Markt verfügbar. Eine direkte mechanische Beeinflussung der Glasmembran schied auf Grund der Empfindlichkeit aus. Es wäre mit einem sofortigen Bruch derselben bei Manipulation zu rechnen. Daher wurde dieser Ansatz als nicht zielbringend angesehen und unterlassen. Dennoch erfolgt ein Hinweis auf die Möglichkeit einer Diffusion neben der Membran, wenngleich der potenzielle Fehler dadurch als gering einzuschätzen ist.

4.5.2 Tracerdiffusion in Membranslide und Schlauchsystem

Die Problematik der lipophilen Eigenschaften vor allem des Sevoflurans, aber auch des Diethylethers wurden bereits im vorhergehenden Kapitel angesprochen. Eine weitere Folge dessen ist, dass es vermutlich zu einer dauerhaften Diffusion in unterschiedlicher Stärke und wechselnder Richtung zwischen den Kompartimenten Perfusionsmedium, Plastik (Membranslide bzw. Schläuche) und Umgebung kam, wie in Abbildung 31 dargestellt.

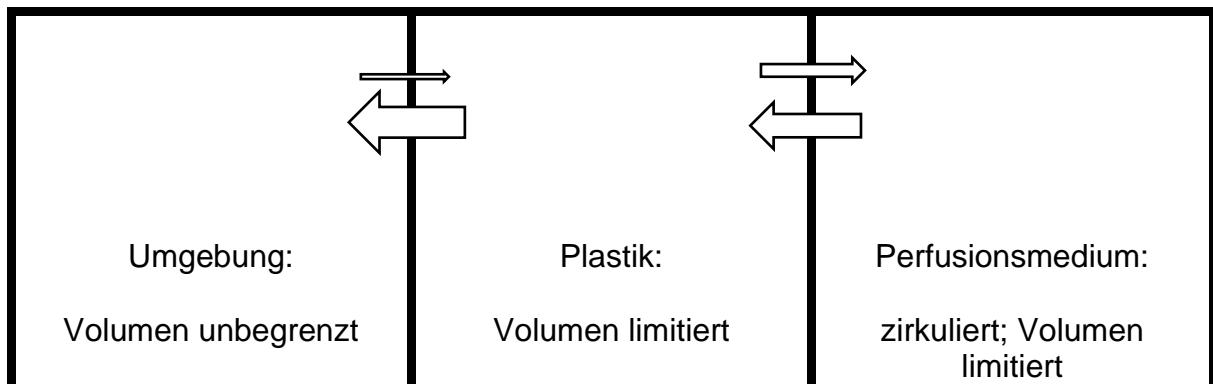


Abbildung 31: schematische Darstellung der Diffusionsvorgänge zwischen den Kompartimenten im Modell

Besonders zu bedenken ist hierbei, dass die Tracer, welche in die Umgebung diffundieren, unendlich verdünnt wurden. Es handelte sich hierbei also um ein offenes System. Dadurch wurde die Rückdiffusion in das Medium reduziert. Ein weiterer Faktor war, dass die Konzentration von Sevofluran oder Diethylether im Perfusionsmedium Schwankungen unterworfen war. Zu Beginn eines jeden Experiments war sie bei null und hatte danach zunächst einen wellenförmigen Verlauf. Auf Grund des Experimentaufbaus konnte nämlich nur die Perfusionsflüssigkeit in den beiden Reservoirs mit Tracer vermischt werden (vgl. Kapitel 2.8.2, S. 32). Die übrige Flüssigkeit in den Schläuchen wurde bei Start der Pumpe schrittweise in das Reservoir

gepumpt (→ Verdünnung der Konzentration). Das zunehmend verdünnte Perfusionsmedium in den Reservoirs wurde fortlaufend dem Schlauchsystem zugeführt, bis eine vollständige Vermischung erreicht wurde.

Schlussendlich könnte es bei Abnahme der Tracerkonzentration in der Perfusionslösung zu einer Rediffusion von Tracer aus dem Plastik in die Flüssigkeit und dann in die Gasphase gekommen sein, wodurch die Messergebnisse eine zeitliche Streckung erfahren hätten.

4.6 Ursachendiskussion des fehlenden Einflusses der Zellen auf die Tracerdiffusion

In den durchgeführten Versuchen konnte wie in Kapitel 3.2 auf Seite 37 dargelegt kein signifikanter Unterschied bezüglich der Diffusion der beiden Tracer unter den drei Cofaktoren (ohne Gel + ohne Zellen, mit Gel + ohne Zellen, mit Gel + mit Zellen) nachgewiesen werden. Im nachfolgenden sollen nun mögliche Ursachen dieses Ergebnis eruiert werden.

4.6.1 Monolayer aus Endothelzellen nicht ausreichend

Möglich wäre, dass die Zellschicht einen nicht ausreichenden Diffusionswiderstand darstellte. Unter physiologischen Bedingungen sind Endothelzellen in Kapillaren „außerhalb der Kernregion nur 0,2 – 0,4 µm dick“ (22). In der durchgeführten Methode war es nicht möglich die wirkliche Dicke der Zellschicht genauer zu erheben. Eine Abweichung von physiologischen Zellausmaßen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Es ist aber auch denkbar, dass physiologische Zellverhältnisse keine detektierbare Verzögerung der Diffusion bewirken (vgl. Kapitel 4.6.2, S. 52).

Im nächsten Entwicklungsschritt zu einem BAB-Model werden Pneumozyten oder Lungenfibroblasten hinzugefügt werden (vgl. Kapitel 4.10.1, S. 56). Vielleicht wird dann eine Verzögerung der Diffusion detektierbar sein.

4.6.2 Einfluss der chemischen Eigenschaften der Tracer

Bei den beiden verwendeten Substanzen Ether und Sevofluran können auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften leicht in und durch Materialien diffundieren. Es ist daher denkbar, dass Tracer, die im Vergleich eine gesteigerte Polarität haben (z.B.

Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid), nur verzögert durch Zellen diffundieren würden. Ebenso könnte ein geringerer Gasdruck Unterschiede in der Diffusion leichter nachweisen lassen und so die Methode verbessern. Das Anfluten im Gaskanal würde langsamer geschehen. Problematisch ist jedoch, dass die verwendete Gaschromatographie nur mit brennbaren, gasförmigen Substanzen arbeiten kann. Daher bleibt vorerst nur die Verwendung von Ether, Sevofluran oder Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften (vgl. Kapitel 2.7.4, S. 28). Einziger Ausweg wäre hier das Wechseln der Messmethode (Wechsel auf eine Messung aus der flüssigen Phase mittels HPLC, vgl. Kapitel 4.10, S. 56).

Noch deutlich schwieriger würde sich dieses Unterfangen bei Tracern wie CO_2 und O_2 gestalten. Besonders wegen des ubiquitären Vorkommens im Experiment (der Brutkasten ist standardmäßig mit circa 5 % CO_2 gesättigt). Für die klinische Bedeutung des Modells wäre die Untersuchung der Atemgase wichtig, deren Austausch die originäre Funktion der Lunge darstellt.

4.6.3 Einfluss des Messverfahrens auf Ergebnis

Grundsätzlich ist bei der verwendeten Messmethode (Gaschromatographie) von einer sehr hohen Genauigkeit auszugehen. Ebenso gibt es eine starke Übereinstimmung zwischen den *ex ante* erwarteten Diffusionsverläufen und den schlussendlichen Ergebnissen. Beispielsweise gibt es in der Diffusion der Tracer einen initialen Zeitverzug von circa 4 Minuten. Dieser dürfte dadurch zustande kommen, dass die Substanzen erst durch die Pumpe aus den beiden Reservoiren durch das Schlauchsystem bis zum Membranslide transportiert werden. Eine deutlich frühere Messbarkeit würde deswegen irritieren und an der Messmethodik zweifeln lassen. Durch die Methode bedingt entstehen jedoch einige potenzielle Fehlerquellen. Beispielweise ist der Gaskanal in den 2 Minuten zwischen zwei Messungen über die beiden 60 bzw. 20 cm langen Kapillaren offen zur Umluft. Ebenso erfolgte die Probenziehung manuell mittels gasdichter Spritze. Geschwindigkeit und Kontinuität des Abziehens könnten hier einen Einfluss auf das Ergebnis haben und zu einem untersucherabhängigen Einfluss führen.

Darüber hinaus kam es bei der Diffusion vereinzelt zu teilweise stark abweichenden Kurven. Diese sind mit jetzigem Wissen nicht sinnvoll zu erklären (vgl. Kapitel 4.6.4, S.54). Es wird darauf hingewiesen, dass mit den bisherigen Experimenten nur die Machbarkeit demonstriert werden sollte; eine Fallzahlberechnung wurde deswegen

nicht durchgeführt. Um mit realisierbaren Fallzahlen Ergebnisse zu erzielen, müssten die Quellen der teils hohen Streuung noch identifiziert und möglichst reduziert werden.

4.6.4 Erklärung für stark abweichende Diffusionsmessungen

Unter den Versuchsdurchläufen gab es vereinzelt den Fall, dass die Ergebnisse eines Durchgangs eine deutliche Abweichung (circa Faktor 3) nach oben zeigten. Der Verlauf der Werte innerhalb der 40 Minuten war relativ zum Maximalwert jedoch sehr ähnlich den üblichen Durchläufen. Initial fiel dies bei einem Durchgang auf, welcher zeitlich sehr eng auf den vorherigen durchgeführt wurde. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass es zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Tracer kommt. Hierzu wurde versucht, die Beobachtung unter besonders enger zeitlicher Abfolge zweier Durchläufe zu reproduzieren (vgl. Abbildung 21, S. 40), was jedoch nicht gelang. Diese abweichenden Versuchsdurchläufe wurden bei beiden Tracern beobachtet.

4.7 Pharmakokinetische Simulation

Bei den Ergebnissen der Simulation fällt auf, dass die Cofaktoren nur einen geringen Einfluss auf den Austausch zwischen flüssiger und gasförmiger Phase haben. Dies ist kongruent mit den Erkenntnissen aus der statistischen Auswertung der Rohdaten, wo sich ebenfalls kein Unterschied durch die Cofaktoren nachweisen lies (vgl. Kapitel 3.2, S. 37, Kapitel 4.6, S. 52).

Beim Vergleich der Ergebnisse aus der pharmakokinetischen Simulation mit den Ergebnissen aus dem durchgeführten Experiment (vgl. Kapitel 3.2, S. 37 und 3.3, S. 42) erkennt man, dass sich die absoluten Konzentrationswerte im gleichen Maximalbereich bewegen. Gleichzeitig fällt auf, dass der Abfall der Konzentration in der Simulation deutlich schneller geschieht. Möglicherweise liegt dies darin begründet, dass das von uns entwickelte pharmakokinetische Modell nicht die in Kapitel 4.5.2 auf S. 51 erläuterten Interaktionen der Tracer mit dem Schlauchsystem berücksichtigt. Die Elimination in die Umwelt (CL_G_A) könnte dadurch verzögert geschehen, was den real langsameren Konzentrationsabfall in den durchgeführten Messungen erklären würde. Der Parameter T_{max} befindet sich ebenso sowohl in Simulation als auch in den durchgeführten Diffusionsversuchen in vergleichbaren Bereichen.

4.8 Abgrenzung zu einem Lungenmodell

Mit dieser Arbeit wurde ein Modell einer Alveole und ihrer Blood Air Barrier entwickelt, kein Lungenmodell. Die im Körper vorherrschenden physiologischen Druckschwankungen durch Veränderung des Thoraxdurchmessers und Absenken des Diaphragmas fehlen. Diese konnten in das entwickelte Modell auf Grund methodischer Limitationen nicht implementiert werden. Beim Blick in die Literatur fällt auf, dass es bis dato kaum experimentelle Lungenmodelle gibt. Die Arbeit von Huh et. al. (30) stellt dabei eine Ausnahme dar. Dort wurde ein Lungenmodell im Sinne eines „organ-on-a-chip“ entwickelt, welches auf zwei Kanälen basierte, welche durch eine flexible und mit Kollagen beschichteten Membran getrennt wurden. Nach Konfluenz der Zellschicht wurde begonnen mittels Druckveränderungen die menschliche Atmung zu simulieren. Dann wurden über den „Blutkanal“ inflammatorische Prozesse in der Zellschicht getriggert und beispielsweise die Bildung von ROS untersucht. Die Diffusion von Tracern wurde dabei nicht experimentell untersucht.

4.9 Mögliche Anpassungen des Versuchsaufbaus

4.9.1 Verbesserung der Überwachung der Zellschicht

In dieser Arbeit erfolgte die Kontrolle der Endothelzellen insbesondere auch im Hinblick auf die nötige Konfluenz für die Diffusionsversuche mit Durchlichtmikroskopie. In der aktuellen Methode war es auf Grund des luftgefüllten oberen Kanals nicht möglich die Zellen während der Diffusionsversuche genauer zu beobachten. Um die Konfluenz und den Zustand der Zellen beurteilen zu können, wäre dies vor allem in diesem Kernzeitraum erstrebenswert. Eine Möglichkeit wäre, die Zellen einzufärben. Dadurch wären die Zellgrenzen besser zu erkennen. Die Konfluenz könnte leichter überprüft werden. Die Beobachtung während der Diffusionsversuche bei luftgefülltem oberem Kanal wäre wahrscheinlich leichter. In der laborinternen Diskussion wurde sehr früh jedoch angesprochen, dass es aus Erfahrung bei Zellfärbungen einerseits zu einer veränderten Stoffwechselleage und andererseits zu einer reduzierten Widerstandsfähigkeit der Zellen kommen könnte. In der weiteren Entwicklung des

BAB-Model könnte dieser Ansatz jedoch getestet werden. Bei Erfolg könnte dies zu einer verbesserten Qualitätskontrolle beitragen.

4.9.2 Erhebung von Diffusionsdaten bei unterschiedlicher Zellkonfluenz

Bei den beiden durchgeführten Diffusionsversuchen mit Endothelzellen lag nicht das exakt gleiche Maß an Konfluenz zugrunde. Auf Grund der Dauer einzelner Versuche und der unterschiedlichen Entwicklung der Zellschicht während einer mehrtägigen Versuchsserie wird dies auch in Zukunft nur schwer sicherzustellen sein. Eine mögliche Lösung wäre es, das jeweilige Ausmaß an Konfluenz mit in die Betrachtung der Tracerdiffusion einzubeziehen. Nach der Erhebung von Zeit-Werten-Paare bei beispielsweise 25; 50; 75 und 100 % Konfluenz könnte analysiert werden, inwieweit die Ergebnisse von einer konfluenten Endothellschicht abhängen. Eine Konfluenz von 50% würde im Gegensatz zu 100% bedeuten, dass nur die Hälfte der beobachteten Fläche lückenlos mit Zellen bedeckt ist. Eine starke Abhängigkeit würde hierbei für eine hohe Sensitivität der etablierten Methode sprechen.

4.10 Ausblick

4.10.1 Erweiterung auf ein zweischichtiges BAB-Model

Wie bereits erläutert ist das Ziel eines Modells der Blut-Luft-Schranke in der Lunge mit nur einer Zellschicht noch nicht erreicht. Deswegen ist es das Ziel zukünftig eine weitere Zellschicht hinzuzufügen. Die Tracer müssten dann durch die Barriere von 2 Zellen und dazugehöriger extrazellulärer Matrix diffundieren. Damit würde eine Annäherung an physiologische Bedingungen erreicht. Durch den verlängerten Diffusionsweg dürfte es zu einer langsameren Diffusion der Tracer kommen, welche die Detektion von Unterschieden in der Diffusion erleichtern dürfte. Erschwerend dürfte jedoch hinzukommen, dass die Versorgung der 2. Zellebene mit Nährstoffen nur über Diffusion durch die bestehende Zellschicht erfolgen kann.

4.10.2 Inversion der etablierten Methode

In der etablierten Methode wird die Diffusion von Tracern aus einem flüssigen Medium in eine Gasphase durch eine Zellschicht beobachtet. Unter Vernachlässigung gewisser Aspekte (vgl. 4.8, S.55) kann man hier Parallelen zur Lunge sehen. Ähnlich wie am

Ende einer Gasnarkose kommt es hier zur Abgabe von beispielsweise Sevofluran an die Atemluft. Interessant wäre dann jedoch auch die Aufnahme der Substanzen. Hierzu müsste man die Methode umkehren. Die Tracer würden in den Gaskanal eingeleitet, die Messung der Diffusion würde dann aus der Flüssigkeit geschehen. Nebenbei hätte dies den Vorteil, dass von einer Gaschromatographie auf eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gewechselt werden müsste. Damit ließe sich der Umfang an potenziellen Tracern auf Grund der veränderten Anforderungen deutlich erweitern.

5 Zusammenfassung

Grenzschichten spielen im Körper an diversen Orten eine herausragende Rolle. Besonders auch die Blut-Gas-Grenzschicht in der Lunge beeinflusst maßgeblich die Diffusion von überlebenswichtigen Molekülen wie O₂ und CO₂. Dies wird besonders bei pathophysiologischen Prozessen wie einem ARDS deutlich. Methoden zur experimentellen Untersuchung der Gasdiffusion an diesen Grenzschichten fehlen bisher.

Das Ziel dieser Arbeit war eine Teiletablierung eines Blood Air Barrier Model und die Identifikation erster geeigneter Tracersubstanzen.

Im Rahmen einer Methodenentwicklung wurde basierend auf einem Membranslide, Endothelzellen und einem Pumpensystem ein experimentelles Modell für den endothelseitigen Anteil der pulmonalen Diffusionsstrecke entwickelt. Mittels Gaschromatographie wurden Zeit-Werte-Paare für die Diffusion der Substanzen Ether und Sevofluran erhoben. Die Komplexität aus einer Zellkultur unter Perfusion in Kombination mit einem Membranslide stellte sich dabei als sehr herausfordernd dar. Über einen Zeitraum von 40 Minuten wurde die Tracerdiffusion durch einen Monolayer aus Endothelzellen gemessen. Dabei war ein An- und Abfluten entsprechend einem 2-Kompartimente-Modell zu beobachten.

Mit den erhobenen Daten konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der Endothelzellschicht auf die Diffusion der Substanzen nachgewiesen werden. Es ist erstmals gelungen diese komplexe Methode zu etablieren.

Zur weiteren Vervollständigung des Modells bedarf es einer zweiten Zellschicht. Es besteht Grund zur Annahme, dass mit weiterer Standardisierung der Methode auch eine erhöhte Sensitivität für Änderungen der Diffusion durch die Endothelzellschicht erreicht werden kann.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele diffundierender Substanzen, zugehöriger Grenzschichten und anhängender Pathologien.....	8
Tabelle 2: EC-Medium für Endothelzellkultivierung	17
Tabelle 3: EC-Medium für Perfusionsversuche	17
Tabelle 4: Coating-Lösung für Endothelzellkultivierung	18
Tabelle 5: Coating-Lösung I für HUVEC im „μ-Slide Membrane ibiPore Flow“	18
Tabelle 6: Coating-Lösung II für HUVEC im „μ-Slide Membrane ibiPore Flow".....	18
Tabelle 7: Trypsin-EDTA für Zellkultur.....	18
Tabelle 8: Übersicht GC-Messmethode.....	29
Tabelle 9: Übersicht über Pumpenkonfiguration.....	32
Tabelle 10: Startbedingungen für Iteration.....	35
Tabelle 11: Ergebnisse der Iteration.....	44

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln von Lachgas, Diethylether, Isofluran und Sevofluran	10
Abbildung 2: schematischer Aufbau des verwendeten Membranslide	11
Abbildung 3: gelochte Glasmembran unter dem Mikroskop	12
Abbildung 4: Entwicklungsprozess des Blood Air Barrier Model	13
Abbildung 5: Ablauf einzelner Versuche zur Modelletablierung	14
Abbildung 6: μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom als „serial connection“	22
Abbildung 7: schematischer Aufbau Experiment mit μ -Slide VI 0.5 Glass Bottom	22
Abbildung 8: Analyse der Zellausrichtung durch "IMARIS" mittels Vektoren	24
Abbildung 9: Mikroskopaufnahme von HUVEC auf Membran nach 6h Inkubation	25
Abbildung 10: Membranslide; verschlossene Druckausgleichskanäle	26
Abbildung 11: Membranslide; Draufsicht	27
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Signal FID und Gaskonzentration [ppm]	30
Abbildung 13: Höhenverhältnis zw. Füllstand in Reservoirs und Membranslide	32
Abbildung 14: Definition der T_{max} [min] in Bezug auf die Tracerkonzentration [ppm]	33
Abbildung 15: Grafische Darstellung 2-Kompartimentmodell	35
Abbildung 16: Entwicklung der Zellausrichtung während Perfusion	36
Abbildung 17: Mikroskopaufnahme der Membran mit konfluenter HUVEC-Schicht	37
Abbildung 18: Vergrößerung aus Abbildung 17	38
Abbildung 19: Absolutwerte der Tracerdiffusion	39
Abbildung 20: Zeitabhängige Entwicklung der absoluten Sevofluran Konzentration	39
Abbildung 21: enge zeitliche Abfolge zw. Diffusion von Ether und Sevofluran	40
Abbildung 22: Entwicklung der Etherkonzentration relativ zum Maximalwert	41
Abbildung 23: Entwicklung der Sevoflurankonzentration relativ zum Maximalwert	41
Abbildung 24: Vergleich der T_{max} zw. den verschiedenen Versuchsbedingungen	42
Abbildung 25: beispielhafte Iteration bei Ether	43
Abbildung 26: Mediane Konzentrationen der Simulation mit Ether	44
Abbildung 27: Mediane Konzentrationen der Simulation mit Sevofluran	45
Abbildung 28: intakte Glasmembran in der Fassung	48
Abbildung 29: poröse Membran aus Fassung herausgebrochen und rotiert	49
Abbildung 30: Membran mit quer verlaufender Bruchlinie	49
Abbildung 31: Darstellung der Diffusionsvorgänge zw. den Kompartimenten	51

8 Literaturverzeichnis

1. World Health Organisation. COVID-19 Weekly Epidemiological Update: Edition 44 [cited 2021 Jun 17].
2. Stefan Kluge. S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19 [Internet]. Uwe Janssens, Tobias Welte, Gereon Schälte, Christoph D. Spinner, Jakob J. Malin, Florian Langer, Michael Westhoff, Michael Pfeifer, Klaus F. Rabe, Hendrik Bracht, Florian Hoffmann, Bernd W. Böttiger, Julia Weinmann-Menke, Alexander Kersten, Peter Berlit, Marcin Krawczyk, Wiebke Nehls, Reiner Haase, Oliver J. Müller, Miriam Stegemann, Marcel Schorrlepp, Christian Brandt, Christof Specker, Nina Kreuzberger, Monika Nothacker, Nicole Skoetz, Gernot Marx, Christian Karagiannidis. AWMF online. 2024 [updated 2024 May 7; cited 2024 Jul 2]. Available from: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/113-001>
3. Grasselli G, Tonetti T, Protti A, Langer T, Girardis M, Bellani G, Laffey J, Carrafiello G, Carsana L, Rizzato C, Zanella A, Scaravilli V, Pizzilli G, Grieco DL, Di Meglio L, Pascale G de, Lanza E, Monteduro F, Zompatori M, Filippini C, Locatelli F, Cecconi M, Fumagalli R, Nava S, Vincent J-L, Antonelli M, Slutsky AS, Pesenti A, Ranieri VM, Lissoni A, Rossi N, Guzzardella A, Valsecchi C, Madotto F, Bevilacqua F, Di Laudo M, Querci L, Seccafico C. Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: a multicentre prospective observational study. *Lancet Respir Med*. 2020;8(12):1201–8. doi:10.1016/S2213-2600(20)30370-2 Cited in: PubMed; PMID 32861276.
4. David S, Wiesner O. Das hypoxämische Lungenversagen [Hypoxic lung failure]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2016;111(3):186–95. ger. doi:10.1007/s00063-016-0146-z Cited in: PubMed; PMID 27084180.
5. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, Duan G. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 2020;12(4). doi:10.3390/v12040372 Cited in: PubMed; PMID 32230900.
6. Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, Linsell L, Staplin N, Brightling C, Ustianowski A, Elmahi E, Prudon B, Green C, Felton T, Chadwick D, Rege K, Fegan C, Chappell LC, Faust SN, Jaki T, Jeffery K, Montgomery A,

- Rowan K, Juszczak E, Baillie JK, Haynes R, Landray MJ. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *The New England Journal of Medicine*. 2021;384(8):693–704. doi:10.1056/NEJMoa2021436 Cited in: PubMed; PMID 32678530.
7. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(1):31–9. doi:10.1055/s-0039-1683996 Cited in: PubMed; PMID 31060086.
 8. Siddall E, Khatri M, Radhakrishnan J. Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. *Kidney international*. 2017;92(1):37–46. doi:10.1016/j.kint.2016.11.029 Cited in: PubMed; PMID 28318633.
 9. Brito MA, Palmela I, Cardoso FL, Sá-Pereira I, Brites D. Blood-brain barrier and bilirubin: clinical aspects and experimental data. *Archives of Medical Research*. 2014;45(8):660–76. doi:10.1016/j.arcmed.2014.11.015 Cited in: PubMed; PMID 25475697.
 10. Long B, Gottlieb M. Emergency medicine updates: Spontaneous bacterial peritonitis. *The American Journal of Emergency Medicine*. 2023;7084–9. doi:10.1016/j.ajem.2023.05.015 Cited in: PubMed; PMID 37244043.
 11. Acierno LJ. Adolph Fick: mathematician, physicist, physiologist. *Clinical Cardiology*. 2000;23(5):390–1. doi:10.1002/clc.4960230519 Cited in: PubMed; PMID 10803452.
 12. Schmidt RF, Lang F, editors. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie ; [+ IMPP-Fragen Physiologie online]*. 30th ed. Heidelberg: Springer Medizin; 2007. 1030 p. (Springer-Lehrbuch). ger.
 13. MacDougall JD, McCabe M. Diffusion coefficient of oxygen through tissues. *Nature*. 1967;215(5106):1173–4. doi:10.1038/2151173a0 Cited in: PubMed; PMID 6061810.
 14. Krogh M. The diffusion of gases through the lungs of man. *J Physiol*. 1915;49(4):271–300. doi:10.1113/jphysiol.1915.sp001710 Cited in: PubMed; PMID 16993296.
 15. Petermann H, Goerig M. Geschichte der Anästhesie: „Vom Narkotiseur zum perioperativen Homöostatiker“ [History of anesthesia: "From narcosis to

- perioperative homeostasis"]. *Anaesthesist*. 2016;65(10):787–808. ger. doi:10.1007/s00101-016-0223-y Cited in: PubMed; PMID 27654500.
16. Wawersik J. History of anesthesia in Germany. *Journal of Clinical Anesthesia*. 1991;3(3):235–44. doi:10.1016/0952-8180(91)90167-L Cited in: PubMed; PMID 1878238.
 17. Patel SS, Goa KL. Sevoflurane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its clinical use in general anaesthesia. *Drugs*. 1996;51(4):658–700. doi:10.2165/00003495-199651040-00009 Cited in: PubMed; PMID 8706599.
 18. Koch S, Pecher S. Neue Herausforderungen für die Anästhesie durch den Klimawandel [New challenges for anesthesia due to the climate change]. *Anaesthesist*. 2020;69(7):453–62. ger. doi:10.1007/s00101-020-00770-1 Cited in: PubMed; PMID 32346776.
 19. Schuster M. Der CO₂-Fußabdruck der Anästhesie. Wie die Wahl volatiler Anästhetika die CO₂-Emissionen einer anästhesiologischen Klinik beeinflusst. Richter H, Weixler S, Schuster M: Der CO₂-Fußabdruck der Anästhesie. Wie die Wahl volatiler Anästhetika die CO₂-Emissionen einer anästhesiologischen Klinik beeinflusst. 2020;(05-2020):154–61. ger. doi:10.19224/ai2020.154
 20. Campbell M, Pierce JMT. Atmospheric science, anaesthesia, and the environment. *BJA Education*. 2015;15(4):173–9. doi:10.1093/bjaceaccp/mku033
 21. ChemSpider | Search and share chemistry [Internet]. 2021 [updated 2021 Sep 25; cited 2021 Sep 25]. Available from: <http://www.chemspider.com/>
 22. Lehrbuch Histologie: Mit 49 Tabellen. 4th ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2014. 699 p.
 23. Schema des Aufbaus des μ-Slide Membrane ibiPore Flow der ibidi GmbH [Internet] [cited 25.09.21]. Available from: https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_850XX_Membrane_ibipore_Flow/S_850XX_ibipore_Flow_03.jpg
 24. ibidi. μ-Slide VI 0.5 Glass Bottom | Flow & Immunofluorescence | ibidi [Internet]. 2024 [updated 2024 Jun 11; cited 2024 Jun 11]. Available from: <https://ibidi.com/channel-slides/194--slide-vi-05-glass-bottom.html>

25. Application Note 11: Shear Stress and Shear Rates for ibidi μ -Slides - Based on Numerical Calculations.
26. ibidi GmbH, www.ibidi.com. Instructions μ -Slide Membrane ibiPore Flow: Product Information Sheet.
27. Application Note 59: Human endothelial cells under shear stress cultivated on the glass membrane of the μ -Slide Membrane ibiPore Flow.
28. Wu L-H, Chang H-C, Ting P-C, Wang DL. Laminar shear stress promotes mitochondrial homeostasis in endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2018;233(6):5058–69. doi:10.1002/jcp.26375 Cited in: PubMed; PMID 29219180.
29. Christina Fey, Anita Reiser, Helga Wagner, Armin Bieser, Roman Zantl. Defining the Critical Shear Stress Range in Long Term HUVEC Cell Culture [cited 2021 May 4]. 1 p.
30. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science (New York, N.Y.)*. 2010;328(5986):1662–8. doi:10.1126/science.1188302 Cited in: PubMed; PMID 20576885.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Martin Kees danken für die Überlassung dieses spannenden Themas und für die Zeit und Mühe meine wissenschaftliche Arbeit durch Diskussionen und positive Auseinandersetzung mit dem Thema voranzutreiben.

Dem Team des Labors der Klinik für Anästhesiologie an der Uniklinik Regensburg gilt mein ausgesprochener Dank für die tägliche Unterstützung in kleinen und großen Herausforderungen in der experimentellen Forschung. Insbesondere erwähnen möchte ich Dr. Michael Gruber, Ruth Späth, Simon Tümmler und Regina Lindner, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zu Ende gebracht werden hätte können.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Schwester sowie Carolin, welche alle durch ihre Unterstützung zum erfolgreichen Abschluss sowohl dieser wissenschaftlichen Arbeit als auch des Studiums beigetragen haben.