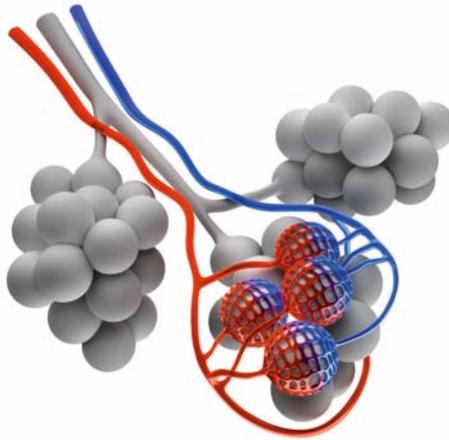


Einfluss von Ischämie auf das pulmonale Surfactantsystem  
und das alveoläre Redoxgleichgewicht in isolierten  
Kaninchenlungen

---

**CHRISTOPH SCHÄFER**



**INAUGURALDISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Einfluss von Ischämie auf das pulmonale Surfactantsystem und  
das alveoläre Redoxgleichgewicht in isolierten  
Kaninchenlungen

INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Christoph Schäfer  
aus Gießen

Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Günther

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Schulz

Tag der Disputation: 20.09.2012

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Das alveoläre Kompartiment</b>	<b>10</b>
1.1.1	Morphologie des alveolären Kompartiments	10
1.1.2	Das pulmonale Surfactantsystem	11
1.1.2.1	Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants	12
1.1.2.2	Metabolismus des Surfactants	13
1.1.2.3	Funktion des Surfactants	15
<b>1.2</b>	<b>Die Redoxbalance im alveolären Kompartiment</b>	<b>17</b>
1.2.1	Oxidantien	17
1.2.1.1	Singlet-Sauerstoff	18
1.2.1.2	Superoxid-Radikale	18
1.2.1.3	Hydrogen-Peroxide	19
1.2.1.4	Hydroxyl-Radikale	19
1.2.1.5	Peroxy-Radikale	19
1.2.1.6	Oxoferryl-Komplex	20
1.2.1.7	Stickstoffmonoxid	20
1.2.1.8	Andere Oxidantien	21
1.2.2	Antioxidantien	21
1.2.2.1	Ascorbinsäure	21
1.2.2.2	Harnsäure (Urat)	22
1.2.2.3	Thiole	23
1.2.2.4	Tocopherol	24
1.2.2.5	Retinol	24
1.2.2.6	Plasmalogene	25
1.2.2.7	Enzymatische Systeme	26
1.2.2.8	Antioxidativ wirksame Proteine	27
1.2.3	Oxidative Abbauprodukte	28
1.2.3.1	Malondialdehyd	28
1.2.3.2	F <sub>2</sub> -Isoprostane	28
1.2.4	Normwerte antioxidativer Substanzen im Alveolarraum	29
<b>1.3</b>	<b>Pathophysiologische Konsequenzen einer gestörten Redoxbalance im alveolären Kompartiment</b>	<b>31</b>
<b>1.4</b>	<b>Therapie mit Antioxidantien</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>38</b>
3.1.1	Chemikalien	38
3.1.2	Geräte	40
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>41</b>
3.2.1	Aufbau der Studie	41
3.2.2	Isoliertes Lungenmodell	42
3.2.2.1	Versuchsaufbau	43
3.2.2.2	Präparation der isolierten Lunge	46
3.2.2.3	Integration des Organs in das Meßsystem	47
3.2.2.4	Bronchoalveoläre Lavage	49
3.2.2.5	Native BAL-Kontrollen	49
3.2.2.6	Reinigung und Sterilisation der Systeme	50
3.2.3	Lipidextraktion nach Bligh und Dyer	50

3.2.4	Kolorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes	51
3.2.5	Quantitative Proteinbestimmung	52
3.2.6	Gaschromatographische Bestimmung der Gesamt-Fettsäuren und der Plasmalogene	52
3.2.7	Messung des reduzierten und oxidierten Glutathions	62
3.2.7.1	Herstellung der Standards und der Reaktionslösungen	63
3.2.7.2	Probenvorbereitung für die GSSG-Bestimmung	65
3.2.7.3	Durchführung der Messung	65
3.2.8	Quantifizierung von Retinol und $\alpha$ -Tocopherol	67
3.2.8.1	Herstellung der Standards	67
3.2.8.2	Probenvorbereitung	68
3.2.8.3	Chromatographische Bedingungen	68
3.2.9	Quantifizierung von Ascorbinsäure und Harnsäure	69
3.2.9.1	Herstellung der Standards und Erstellen der Standardkurve	69
3.2.9.2	Vorbereitung der Proben	70
3.2.9.3	HPLC – Bedingungen	70
3.2.9.4	Quantifizierung von Malondialdehyd	71
3.2.9.5	Präparation des MDA-Standards	72
3.2.9.6	Präparation des MDA-TBA-Addukts	72
3.2.9.7	HPLC-Analytik	73
3.2.10	Quantifizierung von 8-Isoprostanen	73
3.2.10.1	Vorbereitung der Reagenzien	73
3.2.10.2	Herstellung der Standards	73
3.2.10.3	Probenvorbereitung	74
3.2.10.4	Messung der Proben	74
<b>3.3</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Physiologische Daten</b>	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>Antioxidantien und Oxidationsprodukte in BAL</b>	<b>77</b>
4.2.1	Oxidiertes Glutathion	79
4.2.2	F <sub>2</sub> -Isoprostane	80
4.2.3	Reduziertes Glutathion	81
4.2.4	Plasmalogene	82
4.2.5	Alpha-Tocopherol	83
4.2.6	Retinol	84
4.2.7	Ascorbinsäure	85
4.2.8	Harnsäure	86
<b>4.3</b>	<b>Surfactantanalyse</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>91</b>
<b>5.1</b>	<b>Oxidationsprodukte im alveolären Raum nach Ischämie</b>	<b>91</b>
<b>5.2</b>	<b>Alveoläre Antioxidantien während Ischämie</b>	<b>92</b>
<b>5.3</b>	<b>Regulation von Antioxidantien im alveolären Kompartiment, Rolle des Sauerstoffes</b>	<b>94</b>
<b>5.4</b>	<b>Pulmonaler Surfactant</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>102</b>

# 1 Einleitung

Die Lunge des Menschen stellt mit einer Gesamtoberfläche von über 100 qm das Organ mit der größten Oberfläche dar. Die Alveolen, die als funktioneller Teil der Lunge für den Gasaustausch verantwortlich sind, haben daran den größten Anteil. Bereits im Jahre 1929 lieferten Pionierarbeiten des schwedischen Forschers Kurt von Neergard [1] Hinweise auf den Zusammenhang zwischen der alveolären Oberflächenspannung und den Retraktionskräften der Lunge. Etwa dreißig Jahre später wurde der pulmonale Surfactant von Clements [2] und Pattle [3] als Wortkonstruktion aus „surface-active-agent“ identifiziert und charakterisiert. Surfactant besteht aus einem Lipoproteingemisch, das in der Lage ist, die Oberflächenspannung in der Alveole zu senken und somit deren Kollaps während der Endexpiration zu verhindern. Dadurch wird die Ausbildung von Atelektasen verhindert und ein funktionierender Gasaustausch sichergestellt.

Der Alveolarraum ist permanent Oxidantien aus der Atemluft oder aus zellulären Quellen ausgesetzt [4]. In der Regel besteht hier ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und einer Vielzahl antioxidativ wirksamer Substanzen, die einen ausreichenden Schutz des Lungenepithels vor oxidativer Schädigung gewährleisten [5]. Dieses Gleichgewicht kann jedoch durch eine Reihe pathophysiologischer Ereignisse oder exogener Einflüsse gestört sein und zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und Beeinträchtigung des Surfactantsystems und somit zur Einschränkung des Gasaustausches und der Compliance der Lunge führen.

Der in dieser Studie untersuchte pulmonale Ischämie-Reperfusionsschaden führt zu einer Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies und anderer Radikale im alveolären Kompartiment. Diese Überproduktion der reaktiven Oxidantien kann die natürlichen antioxidativen

Schutzmechanismen der Lunge überlasten und so eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Lungenversagens spielen [5]. Oxidative Abbauprodukte, wie Lipidhydroperoxide, konjugierte Diene und reaktive Substanzen der Thiobarbitursäure (TBARS) sind häufig während Ischämie-Reperfusion im Lungengewebe erhöht [6 und 7]. Antioxidantien sind notwendig, um die Bildung freier Radikale zu verhindern und so die schädigenden Auswirkungen auf DNA, Lipide und Proteine zu hemmen. Intra- und extrazelluläre Schutzmechanismen enthalten antioxidativ wirksame Moleküle (Glutathion (GSH),  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Retinol (Vitamin A), Ascorbinsäure (Vitamin C), Harnsäure und Plasmalogene) und eine Anzahl antioxidativer Enzymsysteme (Superoxiddismutase (SOD), Katalase, Glutathionperoxidase (GSH-PX)) [4 und 5]. Versuche haben gezeigt, dass sowohl die zirkulierenden als auch die im Lungengewebe ortsständigen Antioxidantien im Verlauf der Ischämie-Reperfusion abnahmen [9]. In mehreren Studien ergab die Zuführung von Antioxidantien wie z.B. SOD und Katalase eine beträchtliche Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschadens [10, 11, 12 und 13]. Es ist bislang noch nicht geklärt worden, ob die reaktiven Oxidantien vorzugsweise während der ischämischen Phase, der Reperfusionperiode oder während beider entstehen. Im Gegensatz zu anderen Organen, in denen Ischämie eine weitgehende Gewebhypoxie verursacht und die Wiedereinführung des Sauerstoffes während der Reperfusion eine plötzliche Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies und der oxidativen Abbauprodukte hervorruft, kann das Lungengewebe vom alveolaren Raum her, entlang eines Partialdruckgradienten mit Sauerstoff versorgt werden.

In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass die Lipidperoxidation im Lungengewebe während der Ischämie anstieg, es jedoch während der darauf folgenden Reperfusion keine weitere Zunahme gab, was darauf hinweist, dass die durch Radikale verursachten Prozesse in der ischämischen Phase ablaufen [14, 15, 16, 17 und 18]. Außerdem wurde gezeigt, dass

therapeutische Interventionen am Beginn der ischämischen Periode wirkungsvoller sind, als kurz vor der Reperfusion (z.B. Prostaglandine [19], Natriumnitroprussid [19], Gabe von exogenem Surfactant [20]). Zudem haben einige Autoren gezeigt, dass eine Vorbehandlung der Spenderlunge durch Ischämie vor der Explantation vorteilhafte Effekte in Bezug auf Surfactantveränderungen und Gasaustauscheigenschaften der transplantierten Lunge nach Reperfusion hat [21 und 22]. Der Grund hierfür könnte die Induktion der Antioxidantienproduktion und folglich die Verminderung des oxidativen Schadens sein.

Vorhergehende Arbeiten unserer Gruppe [23] und anderer [24] ergaben einen protektiven Effekt gegenüber dem Ischämie-Reperfusionsschaden bei Fortführung der Ventilation. In diesen Studien war der protektive Effekt bei hyperoxischer (95% Sauerstoff) und normoxischer (21% Sauerstoff) Ventilation größer als bei anoxischer Ventilation mit reinem Stickstoff [23 und 25].

Jedoch erbrachten die Nachforschungen anderer Autoren auf diesem Gebiet gegensätzliche Resultate [26]. Ferner sind die Auswirkungen eines hyperoxischen gegenüber einem anoxischen Milieu auf die Radikalbildung und die antioxidative Abwehr unter den Bedingungen der Lungenischämie weitgehend unbekannt. Unterschiedliche Mechanismen der Radikalbildung in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks sind bereits besprochen worden [27]. Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 $\alpha$  und NF- $\kappa$ B könnten ebenfalls eine Rolle in der Regulation der molekularen Antwort auf oxidativen Stress spielen [28].

Veränderungen der pulmonalen Surfactantfunktion und Zusammensetzung werden regelmäßig nach Ischämie-Reperfusion beobachtet und tragen zu Veränderungen der Homöostase, der Reduktion der Lungencompliance und zur Beeinträchtigung des Gasaustausches bei [29, 30 und 31]. Diese Veränderungen umfassen erhöhte BAL-Proteinwerte, Veränderungen der Surfactantproteinkonzentrationen, verringerte Anteile der sogenannten „large surfactant aggregates“ (LSA), des für die physikochemische

Surfactantfunktion essentiellen dipalmitoylierten Phosphatidylcholin (DPPC) und des Phosphatidylglycerol (PG). Diese Veränderungen bewirken letztendlich eine Verschlechterung der Oberflächenaktivität, die durch erhöhte minimale Oberflächenspannungswerte (minimum surface tension values /  $\gamma_{\min}$ ) dokumentiert werden kann.

Es wurde experimentell bewiesen, dass der pulmonale Surfactant durch Oxidantien beeinträchtigt wird. Dies geschieht entweder durch direkte Exposition gegenüber diesen Substanzen oder durch Störung der Surfactantsynthese und –homöostase, bedingt durch den oxidativen Schaden [4, 32, 33 und 34].

Eine Vielzahl von Antioxidantien findet sich auch im epithelial lining fluid (ELF) und, im Falle des GSH, in viel höheren Konzentrationen als im intrazellulären Raum [35 und 36]. Beträchtliche sortenspezifische Unterschiede bestehen zwischen den Antioxidantienkonzentrationen im Serum und im ELF [37]. Kaninchen sind, im Gegensatz zu Menschen, zur Synthese von Ascorbinsäure aus Glukose fähig. Harnsäure stellt das Endprodukt des Purinkatabolismus des Menschen dar. In den Kaninchen dagegen wird Harnsäure weiter in Allantoin und Harnstoff umgewandelt. Dies erfordert das Vorhandensein von Urikase, einem Enzym, das im Menschen nicht vorkommt. Daraus folgend haben Kaninchen höhere Ascorbinsäurekonzentrationen im Serum (100  $\mu\text{M}$ ) und im ELF (200  $\mu\text{M}$ ) verglichen mit Menschen (50  $\mu\text{M}$  resp. 50  $\mu\text{M}$ ), jedoch niedrigere Harnsäurekonzentrationen im Serum (20  $\mu\text{M}$ , resp. 400  $\mu\text{M}$ ) und im ELF (10  $\mu\text{M}$  resp. 200  $\mu\text{M}$ ) [38 und 39].

Extrazelluläre Antioxidantien schützen Alveolarzellen und helfen damit, die Surfactantsynthese und -funktion beizubehalten. Sie sind deshalb notwendig, die alveolärkapilläre Undichtigkeit zu verhindern, die im Rahmen von Lungentransplantationen oder,

allgemeiner, bei Lungenkrankheiten, die im Zusammenhang mit Entzündung oder oxidativem Stress stehen, beobachtet werden.

Bis jetzt ist wenig bekannt über Veränderungen der alveolären Antioxidantien während Ischämie-Reperfusion, möglicherweise wegen des hohen Verdünnungsgrades des alveolären *lininglayers* während des Lavageprozesses und der dadurch zur Messung notwendigen, hochempfindlichen Analysemöglichkeiten [35]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir nun den Einfluß warmer Ischämie mit hyperoxischer gegenüber anoxischer Ventilation über eine Ischämiedauer von zwei bis vier Stunden auf die Surfactanteigenschaften und den alveolären antioxidativen Status.

## **1.1 Das alveoläre Kompartiment**

### **1.1.1 Morphologie des alveolären Kompartiments**

Im alveolären Kompartiment unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen, die Alveolen auskleidenden, Alveolarepithelzellen. Dabei wird über 90 % der Oberfläche von Epithelzellen des Typs I bedeckt, die jedoch nur geringe metabolische Aktivität aufweisen. Die Epithelzellen vom Typ I sind durch eine sehr geringe Dicke charakterisiert, weshalb sie eine effiziente Diffusion zwischen kapillärem und alveolärem Kompartiment ermöglichen. Die Typ II Epithelzellen, auch Pneumozyten genannt, bedecken dagegen nur etwa 7 % der alveolären Oberfläche, haben aber mit 70 % den größten Anteil an der Zellzahl. Die Pneumozyten nehmen eine zentrale Rolle im Metabolismus des Surfactants ein. Der pulmonale Surfactant wird von ihnen sowohl synthetisiert, als auch wieder aufgenommen. Hinweise auf einen aktiven Metabolismus der Pneumozyten zeigen auch die vielen Zellorganellen, wie endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Golgi-Vesikel und Ribosomen, die man im Zytoplasma besonders zahlreich findet. Darüber hinaus findet man im

Zytoplasma dieser Zellen sogenannte „lamellar bodies“, die Surfactant speichern können und somit ständig in der Lage sind Surfactant abzugeben. Diese Lamellarkörperchen werden durch Exozytose in die Hypophase des „Epithelial lining fluid“ (ELF) des Alveolarraumes abgegeben und dort zu tubulärem Myelin umgewandelt. Das tubuläre Myelin zeigt einen dreidimensionalen, gitterartigen Aufbau und stellt die direkte Vorstufe der oberflächenaktiven Grenzschicht dar, die die Grenze zum Gasraum bildet. Bei der Regulation des alveolären Surfactantpools spielt neben anderen Faktoren die tiefe Inspiration (Stretch) [40] eine tragende Rolle, wodurch die Sekretion angeregt wird. Die Konzentration des Surfactantproteins A (SP-A) bewirkt eine Hemmung der Surfactantsekretion [41]. Die Surfactantlipide zeigen einen physiologischen „Turnover“ von etwa zehn Stunden [ 40 ].

### **1.1.2 Das pulmonale Surfactantsystem**

Das pulmonale Surfactantsystem ist für den physiologischen Verlauf des Respirationszyklus von entscheidender Bedeutung. Der pulmonale Surfactant senkt die alveoläre Oberflächenspannung und ermöglicht dadurch die Atmung bei normalen transthorakalen Drücken. Er stabilisiert die Alveolen und verhindert deren Kollaps während der Endexpirationsstellung. Als wesentliche Funktion des Surfactants gelten sein günstiger Einfluß auf die Atemmechanik und den transendothelialen und transepithelialen Flüssigkeitsflux, jedoch treten in letzter Zeit auch immunregulatorische Funktionen zunehmend in den Vordergrund. Schon länger bekannt ist der Zusammenhang zwischen der respiratorischen Insuffizienz beim IRDS (infant respiratory distress syndrome) und dem Mangel an Surfactant, der auf die fetale Lungenunreife zurückzuführen ist. Mit Einführung der Surfactanttherapie konnte daher die Behandlung dieser Frühgeborenen wesentlich verbessert und die Mortalität erheblich gesenkt werden [43 und 44]. Bei anderen Krankheitsbildern wie dem ARDS (adult respiratory distress syndrome), der Pneumonie, der idiopathischen Lungenfibrose, dem Reperfusionsödem nach Lungentransplantation und

wahrscheinlich sogar bei obstruktiven Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale muss zumindest eine Beteiligung des Surfactantsystems angenommen werden.

### **1.1.2.1 Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants**

Einen Einblick in die Zusammensetzung pulmonalen Surfactants erlaubt die Analyse bronchoalveolärer Lavagen (BAL), deren zellfreier Überstand das Ausgangsmaterial einer Reihe lipidchemischer und proteinchemischer Untersuchungen darstellt [42]. Surfactant besteht zu etwa 90 % aus Lipiden und zu etwa 10 % aus Proteinen, von denen etwa die Hälfte den Surfactant-spezifischen Surfactantproteinen zuzuordnen ist [42, 92, 93, 94, 95]. Trotz der verschiedenen intra- und extrazellulären Erscheinungsformen pulmonalen Surfactants ist die Lipidzusammensetzung dieser Subfraktionen annähernd gleich [96, 97, 98]. Im Gegensatz hierzu findet man in den verschiedenen Subfraktionen pulmonalen Surfactants einen wechselnden Proteingehalt [96, 94, 99]. Dies weist auf die Bedeutung dieser Surfactantproteine bezüglich Funktion und Struktur dieser Subfraktionen hin [96, 92].

Die Lipide machen 85-90% der Surfactanttrockenmasse aus. Neben einem kleinem Anteil an Neutralfetten (10-20%, vorwiegend Cholesterin) findet sich in dieser Fraktion vor allem die Klasse der Phospholipide (80%-90%), unter denen quantitativ das Phosphatidylcholin (PC) vorherrscht [100, 92, 94, 95, 93]. Unter den zahlreichen Fettsäureresten des Phosphatidylcholin finden sich überwiegend gesättigte Fettsäuren [100, 92, 94, 95, 93], vor allem Palmitin- und in geringem Maße auch Stearinsäure. Insgesamt finden sich etwa 50% dipalmitoyliertes Phosphatidylcholin (DPPC) [100, 92, 94, 95, 93], was somit die dominierende Einzelsubstanz der Lipidfraktion des Surfactant darstellt. Des Weiteren finden sich in der Klasse der Phospholipide Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), und Phosphatidylserin (PS), von denen beim Menschen und

bei anderen Species Phosphatidylglycerol überwiegt (5-10%) [100, 92, 94, 95, 93], sowie Sphingomyelin (Sph). Phosphatidylglycerol ist beim Menschen hauptsächlich (etwa 55%) mit Ölsäure substituiert [100]. Die Surfactant-Phospholipide werden ausschließlich in Typ-II-Zellen synthetisiert.

Der Anteil der Proteine an der Surfactanttrockenmasse beträgt etwa 10%. Diese teilen sich zu je etwa der Hälfte in nicht Surfactant-spezifische Plasmaproteine und Surfactant-spezifische Surfactantproteine auf. Derzeit sind vier spezifische Surfactantproteine (SP) bekannt, die als SP-A (35 kDa), SP-B (7 kDa), SP-C (5 kDa) und SP-D (43kDa) bezeichnet werden [102, 103, 104, 105, 106]. SP-A repräsentiert etwa 3-4%, SP-B und SP-C zusammen etwa 2% [104] der Surfactantmasse. Für SP-D wurde eine Konzentration von etwa 0,1% des Gesamt-Lavageproteins angegeben [107].

### **1.1.2.2 Metabolismus des Surfactants**

Die Phospholipide und die Surfactantproteine werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert [108, 109, 110, 111] und gelangen dann vom Golgi-Apparat in kleinen Vesikeln [112] zu den Lamellar-Körperchen. In diesen rundlich-ovalen, meist etwa 1µm im Durchmesser messenden Granula und in den kleinen Transport-Vesikeln findet aller Wahrscheinlichkeit nach die Vereinigung der Surfactantphospholipide und der Surfactantproteine statt [113]. Die Phospholipide liegen in den Lamellar-Körperchen in Form dicht gepackter, konzentrischer Membranen vor. Diese Erscheinungsform ist wahrscheinlich durch den hohen Calciumgehalt [114] und den niedrigen pH-Wert [115] dieser zellulären Organellen sowie durch Änderungen der Surfactantproteinkonzentration bedingt. Lamellar-Körperchen sind die intrazelluläre Speicherform des Surfactant. Vorsichtige Schätzungen ergaben, dass sich etwa 85% des dipalmitoylierten Phosphatidylcholin (DPPC) der Typ-II-

Zelle in den Lamellar-Körperchen befindet [116]. Während die Phospholipidkomposition und der relative Phospholipidgehalt der Lamellar-Körperchen weitgehend den extrazellulären Erscheinungsformen des Surfactant entsprechen, scheint der Surfactantproteingehalt unterschiedlich zu sein. So liegen SP-B und SP-C in den Lamellar-Körperchen in offensichtlich höherer Konzentration als SP-A vor [94].

Das durch Exozytose der Lamellar-Körperchen sezernierte Surfactant-Material bildet in der alveolären Hypophase das sogenannte tubuläre Myelin aus, eine gitterförmige Struktur mit sich in regelmäßigen Abständen kreuzenden Doppelmembranen, deren Abstand etwa 45nm - 50nm beträgt. In den Ecken dieser Kreuzungen befindet sich SP-A [117]. Voll ausgebildetes tubuläres Myelin kann nur bei gleichzeitiger Präsenz von SP-A und SP-B entstehen. Dabei scheint die Relation von SP-A zu SP-B Einfluss auf das Ausmaß der "Gitter"-Bildung zu haben [118]. In vitro Studien konnten eine beachtliche Synergie zwischen SP-A und SP-B bei der Fusion der Membranen einer synthetischen Lipidmischung (DPPC:PG = 7:3) feststellen [119]. Alle anderen denkbaren Surfactantprotein-Kombinationen führen nach Rekonstitution mit synthetischen PL-Gemischen in vitro zu eindeutig andersartigen Erscheinungsformen [118, 120]. Insbesondere hat sich gezeigt, dass SP-C weder SP-B ersetzen kann, noch dass es in Gegenwart von SP-A und SP-B selbst in höheren Konzentrationen irgendeinen Einfluß auf die Entstehung und Struktur des tubulären Myelins hat [118, 120].

Frisch sezerniertes Surfactantmaterial von kultivierten Typ-II-Zellen wie auch Lavagematerial kann nach der Dichte in ultraschwere, schwere und leichte Fraktionen getrennt werden, wobei in jüngerer Zeit die ultraschweren und schweren Surfactantsubfraktionen als *large surfactant aggregates* und die leichten Subfraktionen als *small surfactant aggregates* zusammengefasst werden. Die *large surfactant aggregates* stellen die direkte Vorläufer-Struktur des Oberflächenfilms dar [121, 97]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass nur die *large surfactant aggregates* volle biophysikalische Aktivität in vivo wie auch in vitro entfalten

[122, 123, 124]. Unter zyklischen Oberflächenveränderungen kann *in vitro* ein Übergang der *large* in die *small surfactant aggregates* beobachtet werden [121, 125, 123]. Für diese Konversion wurde neben zyklischen Oberflächenveränderungen ein 75 kDa großes, Serin-aktives Enzym verantwortlich gemacht, das als Esterase mit hoher Homologie zur ES-2 Leberesterase identifiziert werden konnte [126]. Das Substrat dieser Esterase war noch nicht sicher identifiziert, eigene experimentell gewonnene Daten sprechen dafür, dass SP-B durch dieses Enzym abgebaut wird [96, 127]. Lavagematerial, das nach Induktion einer Lungenverletzung in Kaninchen gewonnen wurde, zeigte im Vergleich zu Lavagematerial normaler Lungen unter zyklischen Oberflächenveränderungen einen beschleunigten Übergang in die leichten Fraktionen; dieser Effekt war nach Zugabe von SP-A in höheren Konzentrationen reversibel [123].

In Ruhe werden pro Stunde etwa 10% des dipalmitoylierten Phosphatidylcholin-Gehaltes aller Lamellar-Körperchen sezerniert [92]. Dieser Ruhewert ist durch verschiedene Stimuli wie tiefe Hyperventilation,  $\beta$ -adrenerge Agonisten, Cholinergika, Leukotriene, Prostaglandine und Adenosinnukleotide [92, 128, 113] weiter steigerbar, während eine Steigerung der Synthese aller Surfactantbestandteile nur durch Glukokortikoide zu erreichen ist [113]. Das sezernierte Surfactantmaterial kann auf drei unterschiedliche Arten wieder abgebaut werden. Erstens durch Wiederaufnahme von Surfactant durch die Typ II Zellen, zweitens durch Abbau in den Alveolarmakrophagen und drittens durch Abtransport entlang der Atemwege.

### **1.1.2.3 Funktion des Surfactants**

In wässriger Lösung adsorbieren Phospholipide an die Luft/Wasser-Grenzfläche und ordnen sich an dieser entsprechend ihrem amphiphilen Charakter mit den hydrophoben Fettsäureresten zur Gasphase und mit ihren hydrophilen Kopfgruppen zur wässrigen Hypophase hin aus. Die ungesättigten Phospholipide adsorbieren bei Körpertemperatur

wesentlich schneller als die bei dieser Temperatur immobilen, gesättigten Phospholipide wie dipalmitoyliertes Phosphatidylcholin [129, 95]. Die Anreicherung der Interphase mit Phospholipiden findet ihren Ausdruck in der Senkung der Oberflächenspannung, die bei zunehmendem Sättigungsgrad der Interphase ein Gleichgewicht erreicht. Das Gleichgewicht der Oberflächenspannung liegt für Phosphatidylcholin bei etwa 25 mN/m [130, 129] und ist somit deutlich geringer als der Oberflächenspannungswert von reinem Wasser (etwa 70 mN/m). Laterale Kompression eines solchen Filmes, also eine Reduktion der Oberfläche, führt zu einer weitergehenden Reduktion der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Surfactants. Gesättigtes Phosphatidylcholin (vor allem dipalmitoyliertes Phosphatidylcholin) hat im Vergleich zu ungesättigtem Phosphatidylcholin und anderen ungesättigten Phospholipiden eine kleinere Molekülgröße und ist immobil. Es kann daher bei Kompression dichter gepackt werden [130] und verbleibt bei Kompression wahrscheinlich auch in der Interphase, während die mobileren ungesättigten Phospholipide aus der Interphase herausgequetscht werden [95, 130, 129]. Ein solcherart hochgeordneter und dicht gepackter Film aus gesättigten Phosphatidylcholinmolekülen kann die Oberflächenspannung bis auf etwa 0 mN/m senken. Während der Expansion des Filmes wird dieser wahrscheinlich wieder mit Phospholipidmolekülen angereichert, die in die entstehenden Lücken des Filmes einrücken [130].

Eine durch Surfactant-Inaktivierung hervorgerufene Erhöhung der Oberflächenspannung in der Alveole begünstigt entsprechend dem LaPlace'schen Gesetz deren Kollaps vor allem in End-Expirationsstellung, da der Druck mit kleiner werdendem Kugelradius zunimmt. Das LaPlace'sche Gesetz besagt im Gegenzug, dass zur Antagonisierung dieser Kollapsneigung ein erhöhter Druck in den Luftwegen notwendig ist.

Eine Reduktion der Lungencompliance konnte sowohl beim IRDS [131, 132, 133] als auch beim ARDS (post mortem Analyse [134]) beobachtet werden. In tierexperimentellen Studien

fürte die Induktion einer Lungenschädigung zu einer Minderung der Compliance, die nach sekundärer Surfactantapplikation komplett oder partiell reversibel war [135, 136, 137, 138, 139].

Störungen des Surfactant-Systems verursachen regulär Störungen des Gasaustausches. Vor allem durch die therapeutische Surfactantapplikation beim IRDS, dem ja primär ein Mangel an Surfactant zu Grunde liegt, konnte die bedeutende Rolle des Surfactantsystems bei der Entwicklung von Gasaustauschstörungen herausgearbeitet werden [140, 141, 142, 131, 143, 144, 145]. Entsprechend wurden auch bei der Surfactantapplikation beim ARDS eine Verbesserung des Gasaustausches beobachtet [146, 147].

## **1.2 Die Redoxbalance im alveolären Kompartiment**

Der alveoläre Surfactant hat eine Vielzahl von Aufgaben zu erfüllen. Wegen ihrer großen Oberfläche und dem ständigen Kontakt mit der Umwelt ist die Lunge einer außergewöhnlich hohen Schadstoffexposition ausgesetzt. So hat die Lunge neben der schon erwähnten Neutralisation endogener Mediatoren auch die Aufgabe, sich mit exogenen Schadstoffen auseinanderzusetzen. Die der Lunge vorgeschalteten oberen Luftwegen und der Nasenrachenraum können nur Partikel bis zu einer bestimmten Größe abfangen, sodass kleinere Partikel und Moleküle bis in den Alveolarraum vordringen können. Zum Schutz vor Oxidation der funktionellen Anteile des Surfactants und der Zellen ist die *epitheliale lining fluid* (ELF) mit zahlreichen antioxidativ wirksamen Komponenten ausgestattet. Im Folgenden werden die Oxidantien und Antioxidantien in biologischen Systemen kurz vorgestellt.

### **1.2.1 Oxidantien**

Alle aeroben Organismen, die ihre Energie durch Sauerstoff gewinnen, erkaufen sich dies mit dem Nachteil der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die für ihre große Reaktionsfreude bekannt sind. So stellt  $O_2$  an sich mit seinen zwei freien Elektronen in der

äußeren Hülle schon ein Radikal dar. Beim Zellstoffwechsel entstehen darüber hinaus wesentlich reaktivere Sauerstoffderivate, deren Toxizität vom Organismus teilweise sogar genutzt wird. So dienen z.B. die reaktiven Sauerstoffspezies der Immunabwehr beim sogenannten „*respiratory burst*“ phagozytotischer Zellen.

#### **1.2.1.1 Singlet-Sauerstoff**

Singlet-Sauerstoff entsteht durch Änderung der Spinrichtung eines der äußeren freien Elektronen. Dies kann in biologischen Systemen durch die Lichtabsorption von Pigmenten und Weitergabe der Energie an Sauerstoff geschehen, der dadurch den höheren Energiestatus des Singlet-Sauerstoffs einnimmt und somit eine wesentlich höhere Reaktivität gegenüber anderen Molekülen aufweist. Kehrt der Sauerstoff wieder in die normale Elektronenkonfiguration zurück, kommt es durch Emission eines Photons zur Lumineszenz. Als Beispiel wäre die Porphyrin anzuführen, bei der in die Haut eingelagerte Pigmente zur Produktion von Singlet-Sauerstoff führen können [148].

#### **1.2.1.2 Superoxid-Radikale**

Durch Autooxidation von Hydrochinonen, Flavinen, Glutathion, Hämoglobin und anderen Thiolen sowie den Ionen von Übergangsmetallen [148] entsteht das Superoxid-Radikal  $O_2^-$  durch Ein-Elektronen-Transfer. Außerdem kommen noch physikalische Einflüsse wie Gammastrahlen u. a. in Betracht. Das Superoxid-Radikal hat die Eigenschaften einer schwachen Base und kann durch Wasserstoffionen zu Perhydroxyl  $HO_2^-$  protoniert werden. Des Weiteren kann es durch Disproportionierung zur Bildung von Wasserstoffperoxyd kommen [149].

Superoxid-Radikale können z.B. für  $Fe^{III}$  – und  $Cu^{II}$ - Ionen, Ferrizytochrome und Chinone reduzierend wirken. Darüber hinaus zeigen sie aber auch oxidative Wirkung, bei der Ascorbat und andere Moleküle, die acidische Wasserstoff-Protonen tragen, in Frage kommen. Als

Perhydroxyl-Radikal ist es durch Entfernung des bis-allyl-Hydrogens von polyungesättigten Fettsäuren in der Lage, die Lipid-Autooxidation zu initiieren [149].

### 1.2.1.3 Hydrogen-Peroxide

Durch spontane oder enzymatisch katalysierte Disproportionierung durch Superoxiddismutase (SOD) entsteht aus Perhydroxyl-Radikalen Wasserstoffperoxyd. Obwohl es selbst nur mäßig reaktiv ist, besitzt es für seine oxidative Bedeutung zwei wichtige Eigenschaften [149]:

Zum einen ist es durch biologische Membranen frei diffundabel, zum anderen dient es als Präcursor zur Bildung potenterer Oxidantien wie Hydroxyl-Radikalen und Oxoferryl-Komplexen.

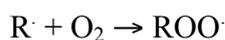
### 1.2.1.4 Hydroxyl-Radikale

Durch metallkatalysierte Reaktion (z.B. mit Fe<sup>III</sup>-Ionen) entsteht aus Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen das Hydroxyl-Radikal [149] (sogenannte Haber-Weiss-Reaktion):

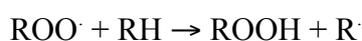
$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^- + HO\cdot$ . Mit einem Redoxpotential von +2,18 V ist es eines der reaktivsten Moleküle und für die Oxidation vieler Moleküle verantwortlich.

### 1.2.1.5 Peroxyl-Radikale

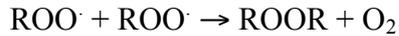
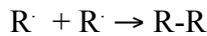
Außer den Superoxid-Radikalen können auch Kohlenstoffradikale (R $\cdot$ ) durch Ein-Elektronen-Transfer gebildet werden. Diese wiederum können durch molekularen Sauerstoff zu Peroxyl-Radikalen reagieren [149]:



Durch ihre Fähigkeit, mit ungesättigten Fettsäuren zu reagieren, sind sie zur Lipid-Peroxidation fähig:



Die Radikale können durch Terminationsreaktion auch zu stabilen, nicht radikalischen Molekülen, umgewandelt werden:



### 1.2.1.6 Oxoferryl-Komplex

Der sehr reaktive Oxoferryl-Komplex (Fe(IV)=O) kann durch Reaktion von Methämoglobin oder Metmyoglobin mit Wasserstoffperoxid entstehen. Er spielt eine bedeutende Rolle bei der Initiation der Lipidperoxidation, kann aber auch mit anderen Molekülen reagieren.

### 1.2.1.7 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid besitzt die Funktion eines Vasodilatators und wird daher auch EDRF (Endothel derived relaxing factor) genannt. Seine Halbwertszeit beträgt nur 1-10 Sekunden. Darüber hinaus kann Stickstoffmonoxid zu verschiedenen weiteren Stickstoffverbindungen reagieren [149]:



Stickstoffdioxid und Peroxynitrit wiederum können weiter reagieren:



Einerseits kann Stickstoffmonoxid also in der Funktion eines Antioxidans entsprechend Gleichung II Superoxidradikale binden, andererseits können Hydroxylradikale über die Zwischenstufe des Peroxynitrits entstehen, die eine schädigende Wirkung haben.

### 1.2.1.8 Andere Oxidantien

In der Umwelt existiert neben den erwähnten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Vielzahl oxidativ wirksamer Substanzen, denen der Organismus ausgesetzt ist. Diese können neben direkter oxidativer Schädigung zum Teil auch als Promotoren für die ROS-Produktion angesehen werden. Von Bedeutung sind vor allem [149] halogenierte Alkane und Alkene:

- Dioxine
- Pestizide
- Phorbol-Ester
- Paraquat und Diquat
- Chinone
- Chinolone
- Übergangsmetalle und Kationen-Komplexe
- (Zytostatika, z.B. Bleomycin)

### 1.2.2 Antioxidantien

#### 1.2.2.1 Ascorbinsäure

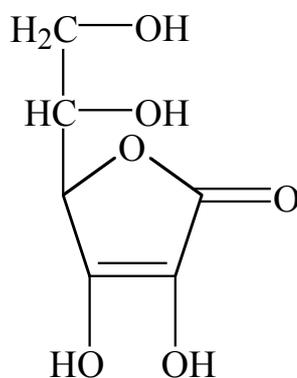


Abbildung 1: Ascorbinsäure

Ascorbinsäure (Vitamin C) gehört zu den wasserlöslichen Antioxidantien und kann von allen Tierspezies mit Ausnahme der Primaten und Meerschweinchen eigenständig aus Glucose synthetisiert werden [148]).

Besonders hohe Konzentrationen an Vitamin C findet man in verschiedenen Gemüsen (z.B. Paprika) und Obst (z.B. Zitronen). Im Organismus ist Vitamin C an verschiedenen enzymatischen Reaktionen beteiligt, wie Kollagenbiosynthese, Carnitinbiosynthese, Noradrenalinbiosynthese und anderen. Durch längerfristigen Vitamin C-Mangel kommt es zu einer schweren Störung des Bindegewebstoffwechsels, dem Krankheitsbild des Skorbut [150].

Vitamin C besitzt außerdem eine wichtige antioxidative Wirkung und ist für die Wiederherstellung von Tocopherol und reduzierten Thiolen verantwortlich. Es kann Ferrylmyoglobin ( $\text{Fe(IV)=O}$ ) reduzieren und mit Triplet-Carbonylen ( $[\text{RO}]^*$ ) reagieren [149].

Ascorbinsäure kann aber neben seinen antioxidativen Eigenschaften auch prooxidativ wirksam sein: In Anwesenheit von  $\text{Fe(II)}$ -Ionen können Hydroxylradikale entstehen.

### 1.2.2.2 Harnsäure (Urat)

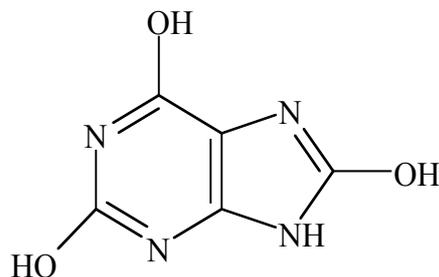


Abbildung 2: Harnsäure

Bei Primaten, Vögeln und einigen Reptilien entsteht die Harnsäure (Urat) als Endprodukt des Purinstoffwechsels. Da die Harnsäure in wässrigen Systemen nur mäßig löslich ist, kann es

durch eine Erhöhung ihrer Konzentration zum Ausfallen von Harnsäurekristallen und somit zum Krankheitsbild der Gicht kommen. Ursächlich kann sowohl eine erbliche Störung des Purinstoffwechsels (primäre Hyperurikämie) als auch das vermehrte Anfallen von Purinen (sekundäre Hyperurikämie) infolge von Zelluntergang oder Fehlernährung und die unzureichende Ausscheidung durch Niereninsuffizienz sein [148]. Heute weiß man, dass Urat auch eine funktionelle Bedeutung als Antioxidans spielt [45,46]. Es kann mit vielen Radikalen reagieren und dabei selbst zum Radikal werden. Ascorbinsäure ist in der Lage Urat zu „recyclen“, während Harnsäure selber Glutathionyl-Radikale reparieren kann [149].

### 1.2.2.3 Thiole

Thiole sind Moleküle mit einer Sulfhydrylgruppe, die in der Lage sind Radikale unter eigener Radikalbildung zu eliminieren. Die größte Bedeutung kommt dabei dem Glutathion (GSH) zu. Glutathion ist aus den drei Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamat aufgebaut, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wobei Glutamat diese Verbindung mit seiner  $\gamma$ -Carboxylgruppe eingeht.

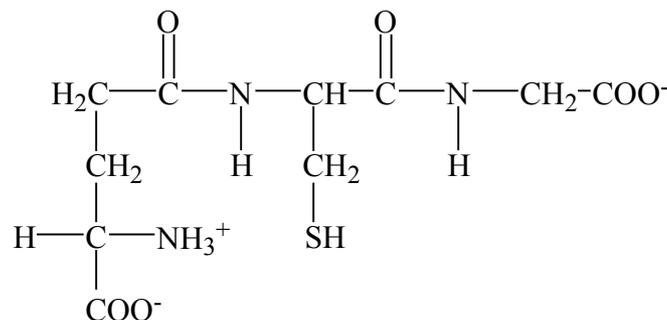


Abbildung 3: Glutathion

Glutathion kann mit Sauerstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffradikalen sowie dem Oxoferryl-Komplex reagieren. Dabei bildet sich das Glutathion-Dimer (GSSG), das unter Verbrauch von NADPH durch die Glutathion-Reduktase wiederum regeneriert werden und somit erneut als Antioxidans dienen kann [149 und 47].

#### 1.2.2.4 Tocopherol

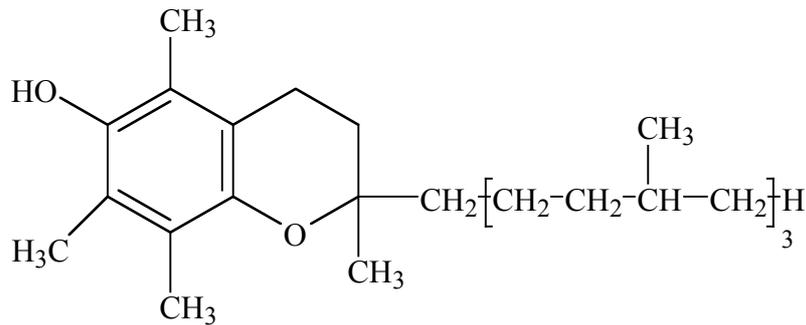


Abbildung 4:  $\alpha$ -Tocopherol

Die Gruppe der Tocopherole wird ausschließlich von Pflanzen synthetisiert und zeichnet sich durch einen Chromanring und eine isoprenoide Seitenkette aus [148]. Für den Menschen hat das  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E, siehe Abbildung) eine große Bedeutung. Erniedrigte Plasmaspiegel von Tocopherol stehen mit verschiedenen Krankheitsbildern im Zusammenhang, wie zum Beispiel bei parenteral ernährten Patienten, Frühgeborenen, Patienten mit hämolytischen Anämien oder Enteropathien mit Lipidresorptionsstörungen. Man nimmt die antioxidative Wirkung des Tocopherols als dessen Hauptfunktion an [148]. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften kann Vitamin E direkt an Biomembranen der Oxidation von Fettsäuren durch Radikale entgegenwirken. Das dabei entstehende Tocopherylradikal kann durch Ascorbinsäure oder Urat wieder regeneriert werden [149].

#### 1.2.2.5 Retinol

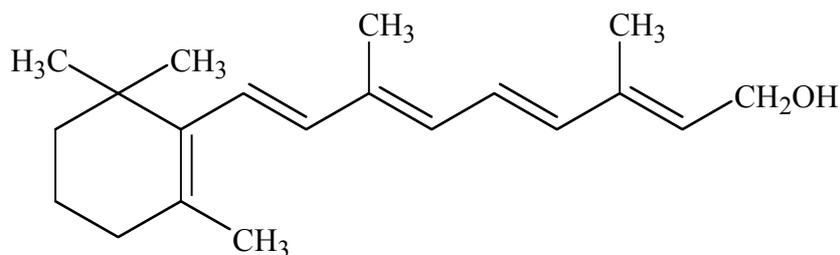
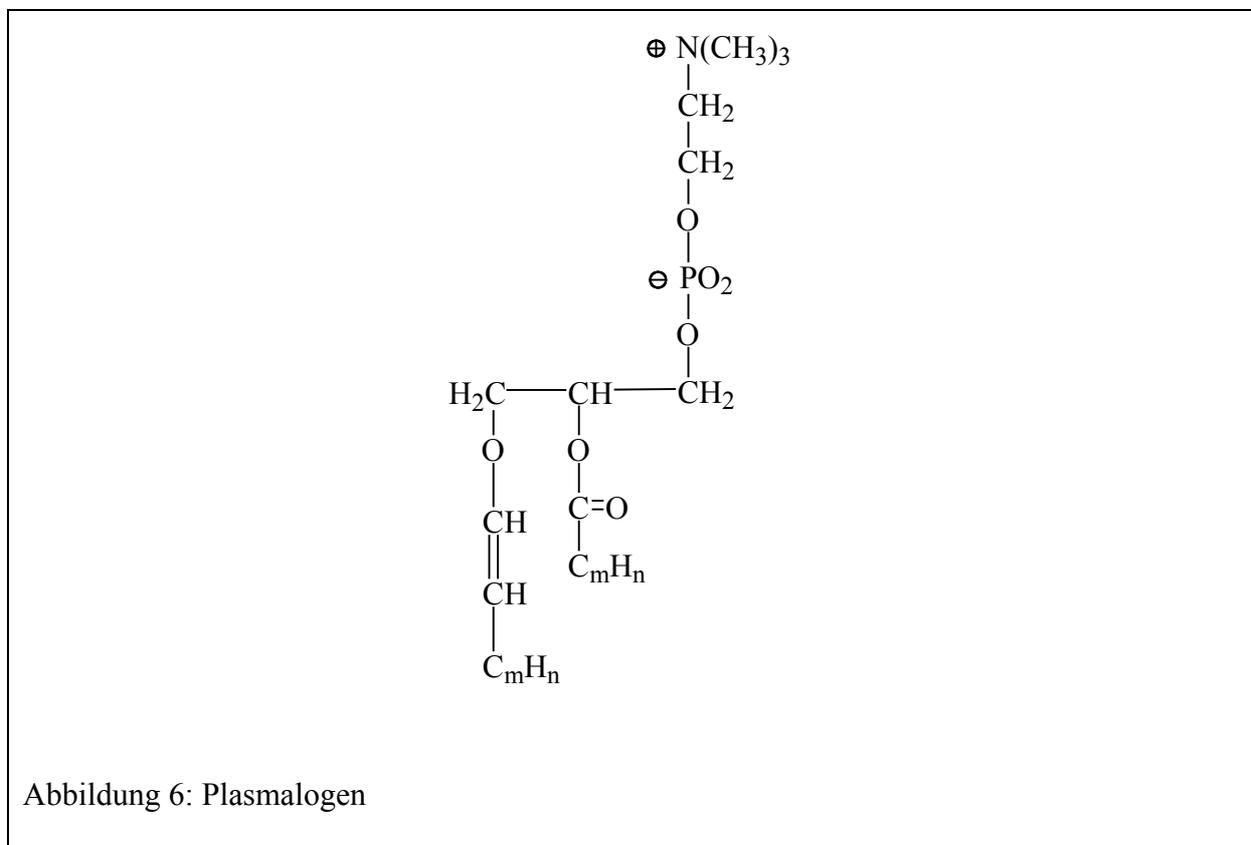


Abbildung 5: Retinol (Vitamin A)

Retinol (Vitamin A) ist chemisch gesehen ein Alkohol, der aus 4 Isopreneinheiten zusammengesetzt ist (siehe Abbildung 5) [148]. Das  $\beta$ -Carotin entstammt der Gruppe der Carotinoide und ist sein Provitamin. Für den Menschen stellen pflanzliche Produkte, insbesondere Karotten, Spinat u.a., die Hauptquelle dar. Das Vitamin A dient der Photorezeption im Auge und ist für die Erhaltung der Integrität der Haut und Schleimhäute verantwortlich.

### 1.2.2.6 Plasmalogene



Plasmalogene kommen in verschiedenen Zelllinien und Geweben vor. Beim Menschen findet man sie vor allem im Gehirn und im Herzen, aber auch Makrophagen und Neutrophile haben einen hohen Plasmalogengehalt [151]. Chemisch gesehen sind Plasmalogene Alkenyl-Acyl-Phospholipide.

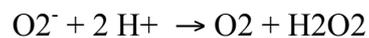
Plasmalogene sind, bedingt durch ihre reaktive Vinylethergruppe, antioxidativ wirksam und können mit aktivierten Sauerstoffspezies reagieren [48, 49, 50]. Dabei zerfallen die Plasmalogene zu 1-lyso-Phospholipiden, Ameisensäure und langkettigen Aldehyden.

### **1.2.2.7 Enzymatische Systeme**

Neben den oben erwähnten Radikal-Scavengern existiert noch eine "zweite antioxidative Verteidigung" [149]. Diese setzt sich aus einer Gruppe von Enzymen zusammen, die Schäden von Oxidantien und Radikalen reparieren, indem sie beschädigte Moleküle beseitigen oder diese reparieren. Einige Enzyme können auch Oxidantien direkt zu harmloseren Verbindungen umwandeln. Diese sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden:

#### **Superoxid-Dismutase (SOD)**

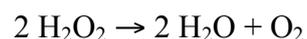
Beim Menschen kommt die Superoxid-Dismutase in zwei Formen vor: als Mangan-SOD in den Mitochondrien und als Kupfer-Zink-SOD in allen sonstigen Kompartimenten. Sie besitzt die Fähigkeit, in einer Dismutationsreaktion Superoxid-Radikale umzuwandeln:



Die SOD spielt vermutlich beim Schutz vor oxidativem Stress und bei der Lipid-Peroxidation eine große Rolle [149].

#### **Katalase**

Katalase ermöglicht den weiteren Abbau des Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff:



### **Selen-abhängige Glutathion-Peroxidase**

Die Peroxidasen dienen als Katalysator bei der Beseitigung von Peroxiden nach folgender Reaktion:



### **Glutathion-Transferase**

Die Enzymgruppe der Transferasen ist multifunktional und besitzt eine bedeutende Rolle bei der Detoxikation und Konjugation von Xenobiotica [149]. Ihre Peroxidase-Fähigkeit ist hauptsächlich für den Schutz vor Oxidantien von Bedeutung:



### **Tyrosinase**

Tyrosinase ist ein kupferhaltiges Enzym, das in der Lage ist, die Umwandlung von L-Tyrosin zu L-Dopa, einem Stoffwechselschritt der Melaninbiosynthese, zu katalysieren. Diese Reaktion wird von Superoxid-Radikalen um ein vielfaches beschleunigt und bewirkt eine Verbesserung des Schutzes vor Radikalen, die durch UV-Licht entstehen. Dieser Prozess hat somit in der Haut die größte Bedeutung.

#### **1.2.2.8 Antioxidativ wirksame Proteine**

Darüber hinaus können freie Radikale durch eine Metallionen-abhängige Reaktion entstehen. Diese kann durch die Bindung der Ionen an Proteine verhindert werden [149]. Für den Menschen sind vor allem Albumin mit seiner hohen Affinität zu Kupfer von Bedeutung, sowie Transferrin, das pro Molekül zwei Eisenmoleküle binden kann und das die quantitativ größte Bedeutung in der Bindung von Eisen besitzt. Das kupferhaltige Caeruloplasmin ist in der Lage, Eisen(II)-Ionen zu Eisen(III)-Ionen zu oxidieren und dessen Aufnahme in Apoferritin zu fördern.

## 1.2.3 Oxidative Abbauprodukte

### 1.2.3.1 Malondialdehyd

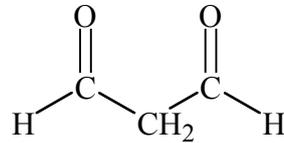


Abbildung 7: Malondialdehyd

Malondialdehyd entsteht *in vivo* als eines der Abbauprodukte bei der Peroxidation von Lipiden [152]. Malondialdehyd kann aufgrund seiner Reaktionsfähigkeit mit Thiobarbitursäure mittels Fluoreszenz-HPLC quantifiziert werden.

### 1.2.3.2 F<sub>2</sub>-Isoprostane

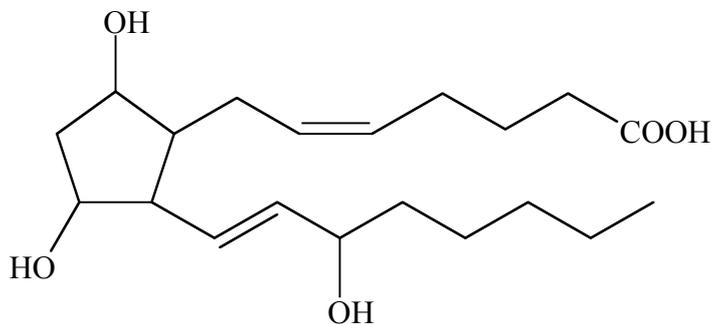


Abbildung 8: F<sub>2</sub>-Isoprostane

Isoprostane gehören zur Familie der Eicosanoide und werden durch die Reaktion von freien Radikalen mit der Arachidonsäure, einer ungesättigten Fettsäure, die u.a. Bestandteil von Zellmembranen ist, gebildet [15]. Die einzelnen Substanzen besitzen verschiedene biologische Aktivitäten wie unter anderem renale und pulmonale Vasokonstriktion und Bronchokonstriktion [153]. Im Organismus können bis zu 64 verschiedene Isoprostane

gebildet werden. In der Analytik spielt jedoch aufgrund seiner Stabilität vor allem das 8-Isoprostan (8-*epi*-PGF<sub>2</sub>α) eine Rolle [154].

Aufgrund seiner Spezifität für Lipidperoxidation und der relativ einfachen Messtechnik mittels ELISA spielt das 8-Isoprostan eine zunehmend große Rolle als Marker für oxidativen Stress.

#### **1.2.4 Normwerte antioxidativer Substanzen im Alveolarraum**

Der Alveolarraum wird von einer dünnen Flüssigkeitsschicht, dem *epithelial lining fluid* bedeckt. Die durchschnittliche Dicke dieser Schicht wurde bei Säugetieren auf 50 µm geschätzt [155]). Bis heute kann die absolute Menge an ELF nur geschätzt und nicht berechnet werden. Verschiedene Versuche mit exogenen (Methylenblau, <sup>99m</sup>Tc-DTPA) und endogenen (Albumin, Harnstoff) Markern [156] konnten keine befriedigenden Ergebnisse liefern. Daher existieren bis heute keine absoluten Normwerte für Konzentrationen antioxidativer Substanzen im ELF. Die „European Respiratory Society“ hat daher empfohlen, die Konzentration in der BAL sowie Einzelheiten zur Lavagetechnik (Anzahl Aliquots, instilliertes Volumen, Recovery, etc.) anzugeben.

Bisher gemessene Daten verschiedener Forschungsgruppen ergaben eine große Bandbreite an Messdaten gleicher Kollektive (siehe Tabelle 1) [157].

Antioxidans	BAL-Verfahren	Konzentration	Einheit	Erster Autor (Referenz)
$\alpha$ -Tocopherol	A	0,31±0,06	nmol · mg protein <sup>-1</sup>	Slade [158]
Ascorbinsäure	A	0,87±0,45 (0,15±0,08)	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup> ( $\mu$ g · mL <sup>-1</sup> )	Hatch [161]
	A	21,4±2,8	nmol · mg protein <sup>-1</sup>	Slade [158]
	B	0,50±0,13	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	Kelly [159]
Urat	C	0,29±0,17	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	Kelly [160]
	A	0,87±0,05 (0,15±0,01)	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup> ( $\mu$ g · mL <sup>-1</sup> )	Hatch [161]
	A	15,9±2,5	nmol · mg protein <sup>-1</sup>	Slade [158]
	B	0,33±0,09	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	Kelly [159]
	C	0,46±0,11	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	Kelly [160]
GSH	D	429±4*	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	Cantin [64]
	A	6,7±1,8 (2,1±0,5)	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup> ( $\mu$ g · mL <sup>-1</sup> )	Hatch [161]
	A	20,4±3,8	nmol · mg protein <sup>-1</sup>	Kelly [159]
	B	0,5±0,2	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	Kelly [159]
	C	0,9±0,2	$\mu$ mol · L <sup>-1</sup>	Kelly [160]

Tabelle 1: Konzentrationen von Antioxidantien in BAL-Flüssigkeit (\*: Konzentration in ELF)

Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung sind angegeben. A: Sechs 50 mL NaCl-Aliquots instilliert, die zurückerhaltene BAL sequentiell gesammelt und die Fraktionen 2-5 für die Analyse gepoolt; B: Zwei 20 mL Phosphatgepufferte NaCl-Aliquots instilliert und Lavage verworfen. Anschließend drei 60 mL-Aliquots instilliert, Recoveries gepoolt, filtriert, zentrifugiert (400 x g) und bei -70°C gelagert; C: Vier 50 mL NaCl-Aliquots appliziert, Recoveries gepoolt, filtriert, zentrifugiert (300 x g) und bei -70°C gelagert; D: Fünf 20 mL NaCl-Aliquots in drei separate Lungen-Segmente instilliert, Lavage gepoolt, filtriert, zentrifugiert (300 x g) und bei -70°C gelagert. [163].

### **1.3 Pathophysiologische Konsequenzen einer gestörten Redoxbalance im alveolären Kompartiment**

Bei einer Reihe von Lungenerkrankungen, insbesondere bei solchen mit inflammatorischem Hintergrund, wird dem auftretenden oxidativem Stress eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese zugeordnet. Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien ist von verschiedenen Autoren für das „*acute lung injury*“ (ALI) bzw. das „*acute respiratory distress syndrome*“ (ARDS) beschrieben worden [47, 162, 167], weiterhin belegen Untersuchungen eine Beteiligung von oxidativem Stress bei Asthma [36, 62, 168], zystischer Fibrose [47, 169], idiopathischer pulmonaler Fibrose [68, 170] und Sarkoidose [171].

Unter akut inflammatorischen Bedingungen, z.B. bei einem durch unterschiedliche Auslöser (Pneumonie, Sepsis, Trauma, Schock, Pankreatitis) induzierten ALI / ARDS kommt es durch Makrophagen und Neutrophile im Rahmen des sogenannten „respiratory burst“ zur Produktion und Freisetzung von freien Radikalen [172, 173]. Der pulmonalen Antwort geht initial eine systemische Aktivierung voraus [162], die sich in einer Aktivierung des pulmonalen Endothels und der alveolären und interstitiellen Makrophagen, einer Hochregulation von Adhensionsmolekülen und einer gesteigerten Produktion von Cytokinen und Chemokinen manifestiert. Eine Rolle können dabei oxidierte Phospholipide mit biologischer Aktivität (z.B. oxidiertes 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-Phosphatidylcholin, [174]) spielen, die unter anderem als Bestandteile von „low density“ Lipoproteinen (LDL) vorliegen. In der Folge wird eine massive Transmigration von Neutrophilen durch Endothel und Epithel in das alveoläre Kompartiment beobachtet, welche eine Freisetzung einer Vielzahl zytotoxischer und proinflammatorischer Komponenten wie proteolytische Enzyme, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS), Lipidmediatoren und andere proinflammatorische Zytokine verursachen. Dies alles resultiert in einer Einschränkung der

Schrankenfunktion des pulmonalen Epithels und Endothels und begünstigt die Entwicklung des ALI / ARDS.

Die Überlastung der antioxidativen Schutzbarriere durch die anfallenden ROS und RNS, ausgelöst sowohl durch den respiratory burst als auch in einem noch ungeklärten Ausmaß durch die notwendigerweise therapeutische Verabreichung hoher Sauerstoffkonzentrationen [76], konnte unter anderem bei ARDS-Patienten durch zahlreiche Autoren anhand des Nachweises oxidativer Umwandlungs- und Degradationsprodukte nachgewiesen werden. So fanden sich beispielsweise in der BAL erhöhte Werte für Nitrotyrosin [175, 176, 177], konjugierte Diene [178], Malondialdehyd [178], oxidiertes  $\alpha$ 1-Antitrypsin [179] und oxidiertes Glutathion [58]. Im Ausatemkondensat konnten Wasserstoffperoxid [180] und F<sub>2</sub>-Isoprostane [61] nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde ergaben auch die Analysen von BAL und Ausatemkondensat bei Patienten mit Asthma [62, 36, 168] und bei Patienten mit chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen [181, 68, 171].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei ALI / ARDS zu einer Erhöhung der globalen antioxidativen Aktivität des alveolären „*lining layers*“ kommt, was die Autoren hauptsächlich auf eine Induktion antioxidativer Enzyme zurückführten [182]. Krsek-Staples et al. [183] zeigten erhöhte Coeruloplasmin- und Transferrin-Spiegel in der BAL von ARDS-Patienten. Ebenso kam es bei Hyperoxie zur Toleranzentwicklung durch Enzyminduktion [81]. Comhair et al. [184] fanden eine erhöhte Aktivität der extrazellulären Glutathion-Peroxidase bei Asthmapatienten.

Über Veränderungen der primären antioxidativen Verteidigung, den niedermolekularen Antioxidantien im Alveolarraum, ist dagegen weniger bekannt. Während früher angenommen wurde, dass es unter inflammatorischen Bedingungen zu einem Abfall der Antioxidantien kommt (z.B. Pacht [66], Buhl [185] und Bowler [186]), gab es zuletzt vermehrt Hinweise darauf, dass die Konzentrationen der Antioxidantien bei oxidativem Stress, z.B. bei

Ozonbelastung, Zigarettenrauch oder Hyperoxie, ansteigen. Bei Ozonexposition fanden Kodavanti et al. [187] erhöhte Werte von GSH,  $\alpha$ -Tocopherol und Harnsäure in der BAL. Bekannt sind auch veränderte Glutathion-Spiegel im ELF von Rauchern: Bei chronischen Rauchern wurde eine Erhöhung der Glutathionkonzentration gefunden [64, 188], während bei akuter Zigarettenrauch-Exposition eine Depletion des Glutathions in der BAL festgestellt wurde [188]. Eine kurzzeitige Exposition mit Dieselabgasen führte zu einer signifikanten Zunahme des Ascorbinsäuregehaltes in BAL bei humanen Kontrollen [189]. Vento et al. [82] beschreiben eine Zunahme der globalen antioxidativen Kapazität in Trachealsekreten von mit Sauerstoff-beatmeten Frühgeborenen sowie eine hochsignifikante Zunahme von Urat. Die antioxidative Imbalance führt zu einem oxidativem Schaden mit konsekutiver Störung der alveolar-endothelialen Schranke (capillary leakage) [190, 191], verändertem Surfactant-Metabolismus [4] und –Homöostase [192] und beeinträchtigter Surfactant-Funktion, mit verringerter Herabsetzung der minimalen Oberflächenspannung [32, 33]. Infolge dieser Veränderungen kommt es bei ALI- und ARDS-Patienten häufig zu Alveolarödem und Alveolarkollaps. Im Folgenden sollen diese Veränderungen näher betrachtet werden:

#### Veränderungen der Surfactant-Eigenschaften durch ROS

Oxidativer Stress verursacht mannigfaltige Veränderungen der Komposition des Surfactants. Unter anderem wurden erhöhte Mengen an konjugierten Dienen und Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) nach in vitro–Oxidation von Surfactant gefunden, was auf eine Oxidation der Lipidkomponenten hinweist. Seeger et al. [33] untersuchten den Einfluss verschiedener Radikal-erzeugender Systeme auf Surfactant in vitro und konnten ebenfalls gestiegene Mengen an TBARS und organischen Hydroperoxiden feststellen. Hyperoxie verursachte eine Erniedrigung des Phosphatidylglycerol/Phosphatidylinositol-Verhältnisses (PG/PI-Ratio) [193]. Auch der Proteinanteil des Surfactants zeigt sich anfällig gegen

oxidativen Stress. So wurden nach oxidativem Stress gestiegene Werte für nitriertes SP-A gefunden [194, 195]. Von dieser Nitrierung sind vor allem die in der Nähe der Kohlenhydrat-erkennenden Domäne (CRD) gelegene Tyrosinreste des SP-A betroffen. In der Tat ist unter diesen Bedingungen auch die Fähigkeit des SP-A Lipide zu aggregieren und Kohlenhydrate zu erkennen reduziert, was auf reduzierte immunmodulierende und regulatorische Fähigkeiten des SP-A nach Oxidantienexposition hinweist [194, 58, 195]. Inkubation von Surfactant mit Peroxynitrit verursachte eine Schädigung der hydrophoben Surfactantproteine [196].

Als Resultat dieser vielfältigen Änderungen in der Komposition des Surfactants wurden Einschränkungen in der biophysikalischen Funktion des Surfactants beim ARDS von mehreren Autoren gefunden [32, 33, 196].

#### Veränderungen des Surfactant-Metabolismus durch ROS

Inkubation von Typ-II-Zellen mit sublethalen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid verursachte Einschränkungen in der Aktivität der mikrosomalen Fraktionen der CTP:Phosphorylcholine Cytidylyltransferase und der Cholin-Phosphotransferase [197], beides Schlüsselenzyme für die Phospholipid-Biosynthese in den Typ-II-Zellen.

Hyperoxie (100 % Sauerstoff für 64 h) bei Kaninchen verursacht eine um 60% verminderte Phosphatidylcholin-Synthese und eine Inhibition der Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase [198, 199]. Langanhaltende hyperoxische Exposition scheint dagegen eine Erhöhung der Surfactant-Phospholipide zu bewirken [4]. Guthmann et al. [34] konnten überzeugend demonstrieren, dass eine Depletion von Vitamin E zu einer Hemmung der Reacylierung von 2-Lyso-Phosphatidylcholin in alveolären Typ-II-Zellen und damit zu einer Einschränkung der DPPC-Synthese führt.

Minoo et al. [200] fanden im Tiermodell bei frühreifen Feten eine Hyperoxie-induzierte Erhöhung der mRNA des SP-B und SP-C, aber nicht des SP-A. Andere Autoren hingegen fanden Reduktionen aller Surfactantprotein-mRNA nach Hyperoxie [4].

#### Gestörte Surfactant-Homöostase

Jain et al. [192] konnten im Tiermodell nachweisen, dass oxidativer Stress die Sekretion der Lamellarkörperchen beeinträchtigt und die Mitochondrien der Typ-II-Zellen schädigt. Parallel dazu ließ sich eine Reduktion der Phosphatidylcholin-Synthese feststellen. Supplementation mit Ascorbinsäure schwächte die beobachteten Effekte signifikant ab. Tölle et al. [201] hingegen fanden in kultivierten Typ-II-Zellen nach Hyperoxie (80% Sauerstoff) keine Veränderungen im Sekretionsverhalten.

## 1.4 Therapie mit Antioxidantien

Systemische oder transpulmonale Supplementation von exogenen Antioxidantien konnte in einer Vielzahl von sowohl tierexperimentellen und zellphysiologischen Versuchsansätzen als auch in klinischen Studien bei einer großen Bandbreite von pulmonalen Krankheitsbildern sowohl das Redox-Gleichgewicht wiederherstellen und es wurden erste Anzeichen für klinische Effekte gefunden [202, 203]. Neben einer direkten Gabe von Antioxidantien rückt zunehmend auch die molekulare Manipulation von Antioxidantien-Genen in den Vordergrund [204].

In tierexperimentellen Modellen zur Lungentransplantation konnte so von einer großen Anzahl von Autoren ein protektiver Effekt durch Administration von Antioxidantien erreicht werden [205, 206]. Eine hyperoxische Lungenschädigung in Meerschweinchen konnte durch Gabe von N-Acetylcystein signifikant vermindert werden [207], ebenso die Symptome einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen [208]. Eine Überexpression der Superoxid-

Dismutase in Mäusen mit einer Virus-induzierten akuten Lungenschädigung führte zu einer Reduktion der Lungenschädigung und zu einer Senkung von inflammatorischen Parametern [209]. Immunotargeting von Katalase in pulmonale Epithelzellen bewirkte ebenfalls eine Verbesserung der physiologischen Situation in einem Ratten-Modell der Lungentransplantation [13]. Auch auf Zellebene konnten eindeutige Effekte gezeigt werden. Müller et al. [210] lieferten Hinweise, dass eine Administration von N-Acetylcystein bei einem Typ-II-Zellmodell mit NO<sub>2</sub>-Schädigung die eingeschränkte Sekretionsfähigkeit der Zellen deutlich verbessert. In anderen Schädigungsmodellen verbesserte auch die Gabe von Retinol und  $\alpha$ -Tocopherol die Syntheseleistung der Typ-II-Zellen [211, 34].

Erste klinische Studien zur Wirksamkeit von Antioxidantien-Supplementation wurden unter anderem bei Probanden mit Ozon-induzierter Lungenschädigung [212], bei Rauchern und Patienten mit chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen [213, 214] sowie bei chronisch interstitiellen Lungenerkrankungen, insbesondere bei der idiopathischen Lungenfibrose [215, 216, 217, 218], an begrenzten Patientenzahlen durchgeführt. Eine Reihe von Studien wurde ebenso bei Patienten mit akut inflammatorischen Lungenerkrankungen wie ARDS und beatmungspflichtiger Pneumonie durchgeführt [219, 220, 221, 222, 8]. Unter anderem konnten Nathens et al. [222] bei 559 Intensivpatienten nachweisen, dass eine gemeinsame Supplementation von Ascorbinsäure und Vitamin E die Wahrscheinlichkeit eines Organversagens verringert und die Verweildauer auf der Intensivstation verkürzt. Eine kombinierte Therapie mit Eicosapentaensäure und antioxidativ wirksamen Vitaminen konnte in einer anderen Studie mit ARDS-Patienten die Oxygenierung (paO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub>) signifikant verbessern.

Einschränkend ist allerdings anzumerken, dass im Rahmen größerer, randomisierter, Placebo-kontrollierter Studien mit Antioxidantiensupplementation bei verschiedenen

Lungenkrankheiten zwar in der Regel Verbesserungen einzelner biochemischer Marker und auch einzelner klinisch relevanter Parameter feststellbar war, dass aber eine signifikante und andauernde Verbesserung des Krankheitsverlaufs – z. B. anhand der Mortalitätsrate bei ARDS – nicht erreicht werden konnte.

## **2 Fragestellung**

Das pulmonale Ischämie/Reperfusionen-(I/R)-Syndrom wird häufig bei Lungentransplantationen beobachtet und ist unter anderem durch eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität sowie Störungen des Surfactantsystems und der Gasaustauschfunktion gekennzeichnet. Ein erhöhtes Auftreten freier Radikale, resultierend in einer Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes, spielt bei der Entstehung eine zentrale Rolle.

Oxidative Abbauprodukte wie Lipidperoxide, konjugierte Diene und reaktive Substanzen der Thiobarbitursäure (TBARS) sind im Lungengewebe während Ischämie-Reperfusionenversuchen regelmäßig erhöht. Antioxidantien sind notwendig um der Bildung freier Radikale vorzubeugen und deren schädigende Wirkung auf die DNA, Lipide und Proteine zu verhindern. Bisherige Versuche haben gezeigt, dass sowohl die zirkulierenden als auch die gewebsständigen Antioxidantien unter Ischämie-Reperfusionenversuchen der Lunge abfallen. Weitgehend ungeklärt ist jedoch, ob dieser oxidative Stress bereits während der Ischämie-Phase entsteht, erst im Laufe der Reperfusion oder während des gesamten Zeitraumes.

Ziel dieser Studie ist nun die Charakterisierung niedermolekularer Antioxidantien und oxidativer Marker sowie der Surfactanteigenschaften anoxisch und hyperoxisch ventilierter, isolierter Kaninchenlungen nach warmer Ischämie.

Es wurden im Detail folgende Fragestellungen untersucht:

-Wie ändern sich die physiologischen Daten der untersuchten Lungen unter den genannten Versuchsbedingungen?

-Wie sehen die ischämiebedingten Veränderungen der Antioxidantien und Oxidationsprodukte aus?

-Wie verhalten sich antioxidativ wirksame Moleküle (Glutathion, Vitamine E, A, C, Harnsäure und Plasmalogene), und antioxidative Enzymsysteme (Superoxid Dismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GSH-PX) und Katalase).

-Welche Veränderungen zeigen die Surfactantanalysen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Substanz	Lieferant
CO <sub>2</sub>	Messer-Griesheim Herborn, Deutschland
Ketanest 50®	Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland
Krebs-Henseleit-Puffer mit 4 Vol% Hydroxyethylstärke	Serag-Wiesner, Naila, Deutschland
NaCl 0,9%	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat 8,4%	Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Stickstoff 5.0	Messer Griesheim, Frankfurt, Deutschland
Xylazin (Rompun®)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Xylocain ® 2%	ASTRA Chemicals GmbH, Wedel/Holstein, Deutschland

<b>Substanz</b>	<b>Lieferant</b>	<b>Bestell-Nummer</b>
(±)-α-Tocopherol	Sigma, Deisenhofen	T-3251
1,1,3,3-Tetraethoxypropan	Sigma, Deisenhofen	10,838-3
All-trans-Retinol	Sigma, Deisenhofen	R-7632
All-trans-Retinol Acetat	Sigma, Deisenhofen	R-4632
Ammoniumheptamolybdat	Merck, Darmstadt	1180.0250
Aqua ad iniectabilia	Baxter, Unterschleißheim	SN-881514
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt	1.00127.0100
BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce, Bonn	45
BHT p.a.	Fluka, Deisenhofen	34750
Chloroform p.a.	Merck, Darmstadt	1.02445.2500
DTNB	Sigma, Deisenhofen	D-8130
GC-Säule GC-Sil 88, 0,25 x 50 m	Varian-Chrompack, Darmstadt	CP7488
Glutathion oxidiert (GSSG)	Sigma, Deisenhofen	G-4501
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma, Deisenhofen	G-6529
Glutathion-Reduktase	Sigma, Deisenhofen	G-3664
HPLC-Säule LiChrosorb RP 18, 5 µm, 250 x 4,6 mm	Merck, Darmstadt	1,50333
Isotone Kochsalzlösung	Baxter, Unterschleißheim	SN-881504
Isprostan ELISA-Kit	Cayman Chemicals, via Alexis, Grünberg	516351
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt	1.04873.1000
Metaphosphorsäure	Merck, Darmstadt	1.00546.0100
Methanol	Riedel-de-Haën	32213
Methanol (für HPLC)	Fluka, Buchs/Schweiz	52762
Mikrotiterplatte Polystyrol 96well	NUNC, Dänemark	
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt	1.08418.0250
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt	1.06579.0500
N-Ethylmaleimid	Sigma, Deisenhofen	E-1271
n-Hexan Uvasol	Merck, Darmstadt	1.04372.0500
Novesine		
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt	1.00519.1001
Phenobarbital Ketanest	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe	
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt	1.00573.1000
Thiobarbitursäure	Sigma, Deisenhofen	T-5500
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt	1008070250
Urat	Sigma, Deisenhofen	U-0881
Uvasol n-Heptan	Merck, Darmstadt	1.04366.0500
Vorsäulen Bakerbond SPE Octadecyl 500 mg, 8 ml	J. T. Baker	7334-06
Vorsäulen Chromabond C 18 ec 200 mg	Macherey-Nagel, Düren	730 012
β-NADPH	Sigma, Deisenhofen	N-6505

### 3.1.2 Geräte

Hersteller	Gerät / Material
Hugo Sachs Elektronik	Starling Beatmungspumpe, Cat/Rabbit Ventilator 6025
Fresenius	Peristaltikpumpe, roller pump BP 742
Combitrans	Druckaufnehmer
Hugo Sachs Elektronik	Messverstärker, Plugsys DBA 660
Kalensee	Perfusionssystemschläuche „arterielle Seite“ Tygon
Sorin Biomedica	Perfusionssystemschläuche „venöse Seite“, PVC
Braun	Thermopumpe, Frigomix 1495, Thermomix 1480
Hottinger Baldwin Messtechnik	Wägezelle, Typ U1
Hamilton	Hamilton Präzisionsspritze 50 $\mu$ l
Ethicon	Nahtmaterial, Mersilene 4,1 SH
Pall	Pall®-Filter 40 $\mu$ m Porengröße
Abott	Venenpunktionsbesteck, W.I.N. 25 G
Rikadenki Electronics	X-Y Schreiber, Rikadenki R 50 Series
Hettich	Zentrifuge RPC Rotanta
Hewlett-Packard Agilent	Workstation Kayak 600
Hewlett-Packard Agilent	G1315 A Dioden-Array-Detektor
Hewlett-Packard Agilent	G1316 A Säulenofen
Hewlett-Packard Agilent	G1312 A HPLC-Pumpe
Pharmacia	2249 HPLC-Pumpe
Kratos	Spectroflow 773 Detektor
Tecan	Spectra-Fluor-Plus Elisa-Photometer
Heraeus	Varifuge 3.0R
Chrompack	Gaschromatograph CP 9000 mit Autosampler 910
Mettler	Feinwaage AB54
Hewlett-Packard	1049 A Elektrochemischer Detektor
Gynkotek	Fluoreszenz Detektor

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Aufbau der Studie

In der vorliegenden Studie wurden zum einen die Ischämiedauer variiert und zum anderen die Zusammensetzung des verwendeten Atemgases. Als Ischämiedauer wurden Zeiten von zwei, drei und vier Stunden gewählt. Die verwendeten Gasmischungen bestanden bei den normoxischen Versuchsreihen aus einem Gemisch von 21% O<sub>2</sub>, 74% N<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, bei anoxischer Ventilation aus 95% N<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> und bei Hyperoxie aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>. Als Kontrollen dienten sowohl perfundierte Kontrollen als auch native bronchoalveoläre Lavagen. Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche gibt Tabelle 2.

Modus	FiO <sub>2</sub> während Ischämie	Gaszusammensetzung	Zeit [h]	n
Kontrolle normoxisch	0,21	21% O <sub>2</sub> , 74% N <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub>	2	3
			3	3
			4	3
Kontrolle hyperoxisch	0,95	95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub>	2	3
			3	3
			4	3
Ischämie anoxisch	0,00	95% N <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub>	2	3
			3	3
			4	3
Ischämie hyperoxisch	0,95	95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub>	2	3
			3	3
			4	3
Kontrolle nativ	-	-	-	6

Tabelle 2: Versuchsprotokoll

### **3.2.2 Isoliertes Lungenmodell**

Das Modell der isolierten Kaninchenlunge als isoliertes, blutfrei perfundiertes und artifiziiell ventiliertes Organ ist bereits zuvor beschrieben worden [166].

Mit leichten Modifikationen in verschiedenen Experimenten eingesetzt, bietet das isolierte, intakte Organ ein von den zentralnervösen, metabolischen und humoralen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängiges experimentelles System. Mit ihm können physiologische Organreaktionen untersucht werden, ohne die komplexen Beziehungen der interzellulären biochemischen Interaktionen zu stören. Das Modell ermöglicht die kontinuierliche Messwerterfassung der biophysikalischen Parameter pulmonalarterieller Druck, pulmonalvenöser Druck, Ventilationsdruck und Lungengewicht.

### 3.2.2.1 Versuchsaufbau

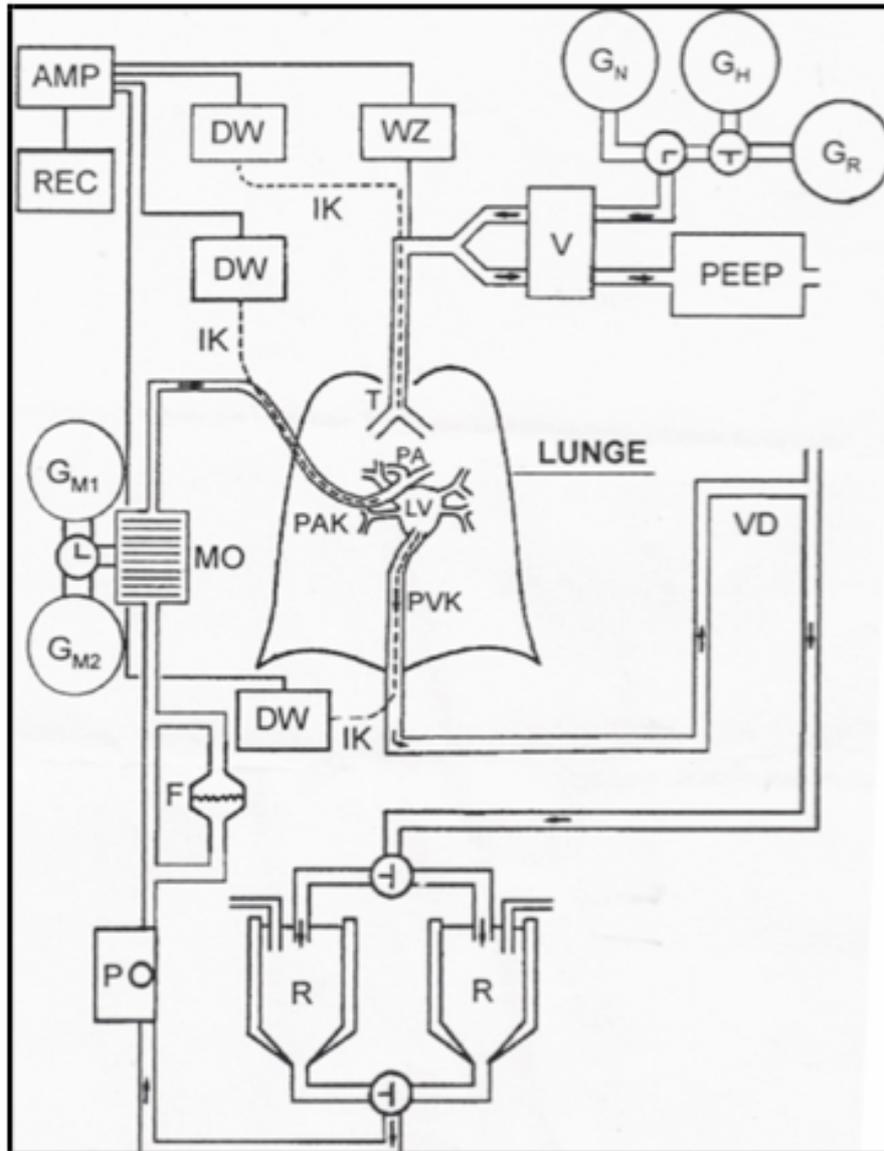


Abbildung 9:

Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus der isolierten Kaninchenlunge (modifiziert nach Weißmann et al 1995)

AMP: Messverstärker; DW elektromechanischer Druckwandler; F: Filter; GN, GH, GR: Gasgemische zur Ventilation der Lunge; IK: Innenkatheter; LV: linker Ventrikel; P: Peristaltikpumpe; PA: Pulmonalarterie; PAK: pulmonalarterieller Katheter; PVK pulmunalvenöser Katheter; PEEP: positiv endexpiratorischer Druck; R: Reservoirgefäß für Perfusionsmedium; REC: Schreiber und PC zur Registrierung der gemessenen Parameter; T: Trachea; V: Ventilator; VD: Vorrichtung zur Regulation des pulmonalvenösen Druckniveaus. Pfeile geben die Richtung des Perfusionsmediums und der Gase an.

Der Membranoxigenator (MO) war in diesem Versuchsaufbau entfernt worden.

Vor jedem Versuch wurde das zuvor sterilisierte System aufgebaut und mit 4 Litern steriler Kochsalzlösung (0,9%) und anschließend 2 Litern sterilem Perfusionsmedium nicht-rezirkulierend durchspült. Während des Spül- und Füllungsvorganges wurden alle Luftblasen aus dem System entfernt. Das blasenfreie System rezirkulierte unter laufender Kühlung auf 4 °C über 45 Minuten (bis zum Ende der Tierpräparation) mit einem in den Perfusatfluss eingeschalteten Filter, der entsprechende Partikelfreiheit sicherstellte.

Die Perfusion der Lunge erfolgte mittels einer Schlauch-Peristaltikpumpe, die einen pulsierenden Perfusatfluss erzeugte. In den Kreislauf waren zwei parallel geschaltete beheizte Perfusatbehälter mit je max. 300 ml Füllvolumen integriert, wodurch ein Perfusatwechsel ohne Unterbrechung der Perfusion sichergestellt wurde. Von diesen Behältern gelangte das Perfusionsmedium über die Pumpe und einen temporären Perfusatfilter zur Separation ausgespülter Zellen in den arteriellen Schenkel des Systems. Zusätzlich war eine Blasenfalle zur Verhinderung von Luftembolien im System integriert. Der arterielle Katheter wurde in der Pulmonalarterie fixiert. Das Perfusat passierte die Lungenstrombahn, floss danach über einen im linken Ventrikel fixierten Katheter und das Schlauchsystem zurück in den Perfusatbehälter. Es handelte sich folglich um ein rezirkulierendes System. Der linksventrikuläre Katheter war zur Regulation des pulmonalvenösen Drucks in seiner Höhe verstellbar.

In dem pulmonalarteriellen Katheter befand sich ein kleinlumiger hartwandiger Druckmesskatheter (Innendurchmesser 1 mm), dessen distale Öffnung in der Pulmonalarterie zu liegen kam. Dieser Katheter war luftblasenfrei mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllt und über eine Abzweigung im pulmonalarteriellen Schenkel des Schlauchsystems an einen elektromechanischen Druckwandler angeschlossen. Das elektrische Drucksignal wurde durch einen Messverstärker verstärkt und durch einen XY-Schreiber sowie zeitgleich mittels einer speziellen Software auf einem PC registriert. Das Perfusat wurde durch eine Thermopumpe

auf 38,5 °C erwärmt. Dieses erfolgte durch doppelwandige, von der Temperierflüssigkeit durchströmte Reservoirgefäße. Die Wärme- und Feuchtigkeitsverluste an der Lungenoberfläche wurden durch ihre Integration in ein ebenfalls angewärmtes und abgedecktes Gefäß minimiert. Ein Kühlgerät (Frigomix) senkte die Perfusatemperatur auf die für die initialen Präparationsschritte notwendigen 4 °C. Das gesamte Füllvolumen des Perfusionssystems betrug 350 ml. Die Perfusion erfolgte mit einem synthetischen sterilen Perfusionsmedium (Krebs-Henseleit-Puffer, Serag Wiessner AG) mit folgender Zusammensetzung:

- NaCl 125,0 mM
- KCl 4,0 mM
- CaCl<sub>2</sub> 2,4 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1 mM
- MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM
- Glucose 5,3 mM

Der pH-Wert des Perfusates wurde durch die Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> vor und während des Versuches im Bereich zwischen 7,35 und 7,45 eingestellt und dann konstant gehalten. Die Perfusion erfolgte initial mit einem Volumenfluss von 10 ml/min, der parallel zur Erwärmung des Organs auf 100 ml/min gesteigert wurde. Nach dem Erreichen der angestrebten Perfusionsgeschwindigkeit und Perfusatemperatur erfolgte eine Beobachtungsperiode (steady state periode). Die Ventilation der Lunge wurde mit einer Kleintierbeatmungspumpe (Harvard Respirator) durchgeführt. Als Beatmungsparameter wurden 30 ml Tidalvolumen, 30 min<sup>-1</sup> Beatmungsfrequenz und ein positiver endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule eingestellt. Die der Pumpe zugeführten Atemgase hatten folgende Zusammensetzungen (alle Angaben in Volumenprozent):

Normoxie: 21% O<sub>2</sub>, 74% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>

Hyperoxie: 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>

Anoxie: 95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>

### **3.2.2.2 Präparation der isolierten Lunge**

Kaninchen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 2,5 und 3,5 kg wurden mit einem Gemisch aus Ketanest® und Rompun® (im Verhältnis 3:2) analgosediert und mit Heparin à 1000 I.E./kg Körpergewicht antikoaguliert. Die Injektion erfolgte mittels Venenpunktionsbesteck in die bei jedem Kaninchen vorhandene Ohrtrandvene. Nach dem Erreichen einer ausreichenden Relaxation bei erhaltener Spontanatmung des Tieres wurde die ventrale Halsregion durch die Injektion von 2%igem Xylocain® etwa 3 cm unterhalb des Larynx lokal anästhesiert. Danach konnte die Trachea schmerzfrei durch schichtweises Präparieren unter Schonung der großen Gefäße und des Nervus vagus mobilisiert werden. Auf die Tracheotomie folgten die endotracheale Kanülierung und die Fixation der Kanüle durch Ligatur. Die Beatmung durch einen Harvard Respirator mit 30 ml Hubvolumen bei einer Frequenz von 30 min<sup>-1</sup> erfolgte initial mit Raumluft und einem endexpiratorischen Druck von 1 cm H<sub>2</sub>O. Bei nun gesicherter maschineller Beatmung wurde die Narkose über 10 min bis zur für die weitere Präparation notwendige Analgesie unter palpatorischer Kontrolle der Herzfrequenz vertieft. Daraufhin wurde die Haut durch schonend ausgeführte Schnitte über dem Sternum und entlang der Rippenbögen weiträumig mobilisiert. Über eine Inzision im Epigastrium erfolgte die Oberbauchlaparotomie, der Processus xiphoideus wurde mittels chirurgischer Klemme gefasst und das Abdomen durch Scherenschnitte entlang der Rippenbögen unter Schonung des Diaphragmas breit eröffnet. Nach stumpfer Lösung des Diaphragmas vom Sternum gelang die Eröffnung beider Pleurahöhlen ohne Lungenläsion. Es folgte die mediane Sternotomie und die stumpfe Entfernung des Thymusgewebes. Im nächsten Schritt wurde das Perikard eröffnet sowie Aorta und Arteria pulmonalis mit je einem Faden angeschlungen. Daraufhin wurde die Beatmung auf das normoxische Gasgemisch mit 4

% CO<sub>2</sub> umgestellt, um eine optimale pH-Wert-Einstellung unter bevorstehender kalter Perfusion der Lunge mit bikarbonatgepuffertem Perfusionsmedium zu erreichen. Nach Inzision in das schlagende rechte Ventrikelmyokard folgte das sofortige Einbringen und Fixieren des pulmonalarteriellen Katheters (Innendurchmesser 4 mm) ohne Unterbrechung der Lungenperfusion. Der Katheter war mit 4 °C kaltem Perfusat blasenfrei gefüllt vorbereitet, die Perfusion begann sofort mit einem Fluss von ca. 10 ml/min. Mit der beschriebenen Technik konnten Luftembolien in die pulmonale Strombahn verhindert werden. Unmittelbar nach Fixierung des pulmonalarteriellen Katheters wurde die linksventrikuläre Herzspitze mit einem Scherenschnitt reseziert, um den Aufbau eines Abflusswiderstand zu verhindern, der zur Erhöhung des pulmonalvaskulären Filtrationsdruckes mit konsekutivem Lungenödem hätte führen können. Danach erfolgte die Ligatur der Aorta proximal des Koronararterienabganges mittels des liegenden Fadens. Die Lunge war somit perfusions- und ventilationsseitig vollständig vom Tierkörper isoliert.

### **3.2.2.3 Integration des Organs in das Meßsystem**

Nach Ligatur und davon distaler Durchtrennung der Vena cava inferior und superior sowie der Aorta konnte das Herz-Lungen-Paket unter vorsichtiger Lösung des mediastinalen Bindegewebes atraumatisch explantiert und auf einem speziellen Präparationsgestell weiter vorbereitet werden. Reste des mediastinalen Bindegewebes wurden entfernt. Das linke Herzohr wurde ligiert, um schwankende Druckverhältnisse zu verhindern. Die Papillarmuskeln im linken Ventrikel wurden vorsichtig reseziert. Die Fixation eines in den linken Ventrikel eingeführten Katheters ( $\varnothing = 8$  mm) erfolgte mit einer intramyocardialen Tabaksbeutelnaht. Damit konnte zur vollständigen Integration der Lunge in das Perfusionssystem das Schlauchsystem geschlossen werden. Nach Sicherung aller Verbindungen wurde die Lunge an der Wägezelle hängend in einem temperierten Gefäß

platziert. Bei kontinuierlicher Registrierung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP), pulmonalvenösen Druckes (PVP), Ventilationsdruckes (VP) und der Lungenmasse erfolgte die stetige Steigerung des Perfusionsflusses auf 100 ml/min über einen Zeitraum von 7 Minuten. Die Perfusatemperatur wurde auf 37 °C hochgefahren. Bei einer Temperatur von 30 °C wurde der CO<sub>2</sub>- Anteil des Atemgases auf 5,3 % erhöht, um der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes im verwendeten Bikarbonat/CO<sub>2</sub>-Puffersystem Rechnung zu tragen. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die PEEP-Beatmung (1cm H<sub>2</sub>O) begonnen. Das Perfusionssystem wurde bis zu diesem Zeitpunkt nicht-rezirkulierend betrieben, das aus der Lunge austretende Perfusat von etwa einem Liter Volumen verworfen. Auf diese Periode des weitgehenden Freispülens der Lungenstrombahn von Blutresten folgte die Rezirkulationsphase über die gesamte Versuchsdauer ohne Austausch des Perfusionsmediums. Der Nullpunkt der Druckwandler wurde vor jedem Versuch auf der Höhe des Lungenhilus gegen atmosphärischen Druck abgeglichen.

Der pulmonalvenöse Druck wurde auf 2 mmHg eingestellt. Einschlusskriterien der Lungen zur Verwendung im Versuch waren eine homogene, nach Ausspülen des Blutes weiße Oberfläche ohne sichtbare Ödeme, Hämostase oder Atelektasen, Druck- und Gewichtskonstanz während des steady-state, Einhaltung der Normwerte für pulmonalarteriellen- (4 - 8mmHg) und Beatmungsdruck (6 – 11 mmHg) sowie vollständige Dichtigkeit des Schlauchsystems und der Verbindungsstellen zwischen diesem und dem Organ.

Nach diesem steady state erfolgte die zweimalige Kontrolle des mikrovaskulären Druckes. Hierzu wurden so genannte Clamping-Manöver durchgeführt, bei denen der arterielle und der venöse Katheter gleichzeitig mittels zweier Magnetklemmen für mehrere Sekunden verschlossen und die Änderungen von linksventrikulärem Druck (LVP) und pulmonalarteriellem Druck (PAP) registriert wurden. Anschließend wurde, genau eine Stunde

nach Integration der explantierten Lunge ins System, die Zeit auf Null gesetzt und die Ischämie durch Abschalten der Perfusion begonnen. Um einen positiven intravaskulären Druck während der Ischämie sicherzustellen, wurde am Beginn der Ischämie der Druck (PAP=LVP) auf 6 mm Hg eingestellt. Zur Absicherung wurden sowohl der arterielle als auch der venöse Katheter zusätzlich durch Klemmen verschlossen. Die Ventilation wurde fortgeführt, jedoch wurde gleichzeitig mit dem Beginn der Ischämie auf eine angewärmte und befeuchtete, anoxische (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) bzw. hyperoxische (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Gasmischung umgestellt, die auch während der gesamten Ischämie beibehalten wurde. Bei den normoxischen Kontrollen wurde das Gasmisch des initialen steady state beibehalten (21% O<sub>2</sub>, 74% N<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>).

#### **3.2.2.4 Bronchoalveoläre Lavage**

Alle bronchoalveolären Lavagen wurden am Ende des Ischämiezeitraumes, also ohne erneute Reperfusion, nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Die Lungen wurden mit drei mal 50 ml steriler, 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung mit einer Perfusorspritze lavagiert. Die gewonnene Lavage (BAL) wurde sofort bei 4°C und 300 g zehn Minuten lang abzentrifugiert, vom Sediment dekantiert, die Überstände unter permanenter Eiskühlung vereinigt und aliquotiert. Die für die antioxidativen Analysen bestimmten Aliquots wurden mit 0.01% BHT (butyliertes Hydroxytoluen) als Antioxidans versetzt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

#### **3.2.2.5 Native BAL-Kontrollen**

Durch fraktionierte, intravenöse Applikation eines Gemisches aus Ketanest ® und Rompun ® (im Verhältnis 3:2) in eine Ohrdravene wurden Kaninchen beiderlei Geschlechtes bis zum Atemstillstand und konsekutivem Herz-Kreislaufstillstand narkotisiert. Dabei wurden nur

solche Tiere ausgesucht, bei denen sich keine Anzeichen einer akuten bzw. chronischen Erkrankung zeigten. Über eine sofortige Tracheotomie wurde ein Tubus in die Trachea eingelegt. Mit einer Perfusorspritze wurde sodann die Lunge mit 3 x 50 ml steriler, 4 °C kalter, physiologischer Kochsalzlösung lavagiert, umgehend bei 4 °C und 300 g zehn Minuten lang zentrifugiert und die Überstände nach der obenstehenden Vorschrift aliquotiert. Die Aliquots wurden nach demselben, zuvor beschriebenen Prozess weiterverarbeitet, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### **3.2.2.6 Reinigung und Sterilisation der Systeme**

Die Reinigung nach jedem Experiment bestand aus mehrfacher gründlicher Spülung des gesamten Perfusionssystems. Anschließend wurde das System zerlegt und die einzelnen Systemkomponenten in einer Laborspülmaschine bei 60 °C unter Zugabe eines Detergens gereinigt. Die Trocknung der Schlauchsysteme erfolgte durch Ausblasen mit Druckluft. Anschließend wurden die Systeme gebrauchsfertig vormontiert, eingeschweißt und im Zentralsterilisator der Universitätsklinik Giessen sterilisiert. Die beiden Glas-Vorratsgefäße wurden nach dem Spülen bei 200°C für 4 Stunden sterilisiert.

### **3.2.3 Lipidextraktion nach Bligh und Dyer**

Die Separation wässrig gelöster Lipide, wie sie in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten (BAL) vorliegen, wurde mittels einer Zweiphasenextraktion mit Chloroform und Methanol nach der Methode von Bligh & Dyer [ 51 ] durchgeführt.

Die bei -80 °C aufbewahrten bronchoalveolären Lavagen (BAL) wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte die Extraktion in gläsernen Zentrifugenröhrchen. Zu Beginn der Extraktion wurden 0,8 Volumenanteile BAL mit 2

Teilen Methanol und 1 Teil Chloroform versetzt (siehe Tabelle 3). Die entstandene einphasige Lösung wurde in einem Zeitraum von 30 min mehrmals kräftig geschüttelt. Im folgenden zweiten Schritt erzielte man durch die Zugabe von je 1 Teil Chloroform und 1 Teil 0,9 %iger Kochsalz-Lösung nach mehrminütigem Schütteln die Phasentrennung. Zum Erreichen einer optimalen Phasengrenze wurde der Ansatz bei  $2000 \times g$  für 10 min zentrifugiert oder über Nacht bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  stehen gelassen. Die Chloroformphase wurde mit Pasteurpipetten abgetrennt und unter dem Stickstoffstrom getrocknet.

	Probe / 0,9 % NaCl	Methanol	Chloroform
1. Schritt	0,8	2	1
30 min, Schütteln			
2. Schritt	1	-	1
2 min Schütteln, $2000 \times g$			
Summe Volumina	1,8	2	2

Tabelle 3: Volumenanteile bei der Lipidextraktion nach Bligh & Dyer

### **3.2.4 Kolorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes**

Der Phospholipid-(PL)-Gehalt von BAL-Proben wurde nach der Methode von Rouser et al. [52] ermittelt. Eine Modifizierung dieses Verfahrens [151] erbrachte eine größere Sensitivität, womit die Detektionsgrenze nun bei ca.  $2 \text{ } \mu\text{g}$  Phospholipid entsprechend etwa  $100 \text{ ng}$  anorganischem Phosphor lag. Als Standard wurde in wässriger Lösung vorliegendes Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in 5 aufsteigenden Konzentrationen von  $0,2 \text{ } \mu\text{g}$  –  $5 \text{ } \mu\text{g}$  Phosphor ( $M_r = 31$ ) entsprechend  $4,7 \text{ } \mu\text{g}$  –  $120 \text{ } \mu\text{g}$  PL ( $M_r = 734$ , approximiert) verwendet. Alle Proben lagen in organischem Medium (Chloroform/MeOH 2/1 (v/v)) vor. Proben und

Standards wurden mit 200 µl 70 % Perchlorsäure versetzt und 60 min bei 200 °C in einem Thermoblock zur Freisetzung der Phosphatgruppe verkocht. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Zugabe von 1 ml 4,6 mM Ammoniumheptamolybdat und anschließend die Reduktion zum Farbkomplex durch Zugabe von 20 µl 650 mM Ascorbinsäure. Vollständige Farbentwicklung wurde durch 45 minütige Inkubation bei 60 °C erzielt. Die Messung der Proben und Standards erfolgte mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 698$  nm. Nach Abzug des Leerwertes konnten die Proben über eine lineare Regression aus den Werten der ermittelten Standards ausgewertet werden. Zur Berechnung des Phospholipidgehaltes wurde eine gemittelte relative Molekularmasse von  $M_r=734$  eingesetzt.

### **3.2.5 Quantitative Proteinbestimmung**

Das Gesamtprotein wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Pierce, Bonn) gemessen, basierend auf der Reaktion von  $\text{Cu}^+$  mit Bicinchoninsäure [53].

### **3.2.6 Gaschromatographische Bestimmung der Gesamt-Fettsäuren und der Plasmalogene**

Als Glycerolester gebundene Phospholipid-Fettsäuren und Plasmalogene (1-O-Alkenyl-2-Acyl-Phospholipide) wurden mit 2 N HCl in Methanol in Fettsäuremethylester bzw. Dimethylacetale umgewandelt, gaschromatographisch separiert und über Flammenionisationsdetektion quantifiziert.

#### **Probenvorbereitung bei der Fettsäureanalyse aus Gesamtlipiden**

Nach der Lipidextraktion (siehe Kapitel 3.2.3) wurde zur Analyse der Fettsäureverteilung von Gesamtlipiden der Lipidextrakt direkt in gasdichte Glasgefäße mit Teflondeckel

überführt, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und mit 1 ml Methylierungsreagenz (2 N HCl/MeOH) 12 h bei +100 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Hexan und kräftigem Schütteln erfolgte die Separierung der entstandenen Fettsäuremethylester (FAME) und Dimethylacetale (DMA) mit Hilfe von Pasteurpipetten aus der Hexanphase. Anschließend wurde die Hexanphase im Stickstoffstrom getrocknet und die Fettsäuremethylester von kontaminierenden Neutrallipiden mittels Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Proben und 50 µg eines FAME-Standards (Marker) wurden zu diesem Zweck auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel 60, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt) aufgetragen und bei +4 °C mit 100 % Toluol als mobile Phase entwickelt. 45 min später wurde die Platte mit kalter Luft (Fön) getrocknet und die FAME durch Besprühen mit Primulin-Lösung bei 254 nm detektiert. Die entsprechenden Gelabschnitte wurden von der DC-Platte entfernt und nach Zugabe von 10 µg 15:0-FAME als interner Standard in 3 ml Glassäulen, die mit Teflonfritten bestückt waren, mit 10 x 1 ml Chloroform (Uvasol, Merck, Darmstadt) extrahiert. Die Proben wurden im Stickstoffstrom konzentriert, in 1,1 ml Glasvials überführt, im Stickstoffstrom getrocknet, in 50 µl CHCl<sub>3</sub> gelöst und unter Stickstoff bei -18 °C bis zur weiteren Analytik dunkel gelagert.

### **Herstellung des Methylierungsreagenzes (2 N HCl in Methanol)**

Eine Gaswaschflasche mit Glassinterfritte wurde mit 200 ml Methanol (HPLC-Grade) gefüllt und danach gewogen. Eine Gasflasche mit Chlorwasserstoffgas (Reinheitsgrad 5.0) wurde mit einem Edelstahlventil bestückt. Zwischen HCl-Flasche und Gaswaschflasche wurde eine weitere Gaswaschflasche zwischengeschaltet, um ein mögliches Rückschlagen des Methanols in die HCl-Flasche zu verhindern. Die Gefäße wurden mit säurestabilen Siliconschläuchen verbunden. Das Einleiten des Gases fand unter einem Abzug und unter Eiskühlung statt. Der eingeleitete Gasfluss musste sorgfältig kontrolliert werden. Zu starker Fluss hatte ein

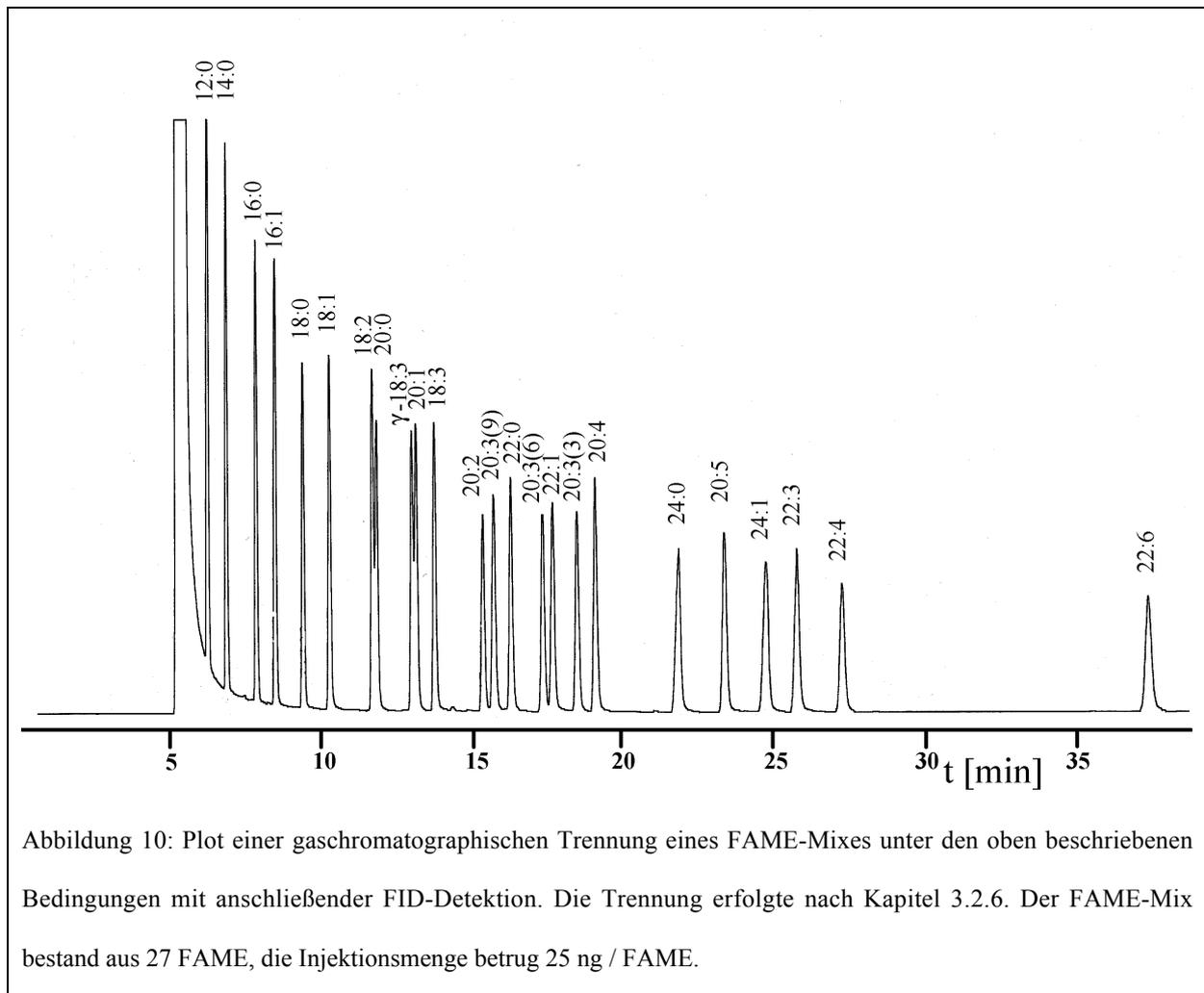
Verdampfen des Methanols und übermäßigen Verlust von HCl zur Folge, zu geringer Fluss verursachte ein Zurücklaufen des Methanols in die vorgeschaltete Gasflasche. Nach ca. 45 min wurde der Gasfluss unterbrochen und die Gaswaschflasche erneut gewogen. Durch Zugabe von Methanol wurde auf eine HCl-Konzentration von 2 N verdünnt. Anschließend wurde das Methylierungsreagenz auf seine Reinheit und seine Methylierungsfähigkeit getestet.

Dazu wurden 13,51 µg DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholin, entsprechend 10 µg 16:0-FAME) sowie 10 µg 16:0-FAME mit dem neu hergestellten Reagenz behandelt (Verfahren siehe oben). Beide Ansätze wurden mit je 10 µg 15:0-FAME versetzt. Mittels Gaschromatographie wurde dann der Wirkungsgrad aus dem Quotienten der Integratorflächen von 16:0-FAME aus DPPC/16:0-FAME berechnet. Der ermittelte Wirkungsgrad des Reagenzes betrug  $97,07 \pm 4,88 \%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 5 Reagenzansätze). Das Reagenz ist unter Feuchtigkeitsabschluss bei +4 °C mindestens sechs Monate haltbar.

### **Gaschromatographische Bedingungen**

Die Fettsäureanalytik wurde mit einem Chrompack CP 9000 Gaschromatographen mit Autosampler Modell 910 (Varian Chrompack, Darmstadt) durchgeführt. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Der Gaschromatograph war mit einer Kapillarsäule (CP - Sil 88, 50 m x 0,25 mm Innendurchmesser (ID), Varian Chrompack) bestückt. Die stationäre Phase der polaren Säule bestand aus 100 % Cyanopropylsilikon (225.000 theoretische Böden). Vor die 50 m lange Kapillarsäule wurde eine 2,5 m lange unpolare desaktivierte Vorsäule installiert. Der Trägergasfluss betrug 1 ml / min. Die Detektorgase hatten einen Flow von 300 ml / min (synthetische Luft), bzw. 30 ml / min (Wasserstoff). Die beiden Detektorgase wurden mit Aktivkohlefilter, das Trägergas mit je einem Feuchtigkeits- und Sauerstofffilter gereinigt (Varian Chrompack). Die Proben wurden je nach Konzentration mit einem Splitverhältnis von

1:5 – 1:25 angegeben. Die Trennung der Fettsäuren erfolgte mittels eines Temperaturgradienten und wurde täglich mit Hilfe eines FAME-Mixes, bestehend aus 27 Fettsäuremethylestern, kontrolliert (siehe Abbildung 10 und Tabelle 5). Über einen Flammenionisationsdetektor (FID) erfolgte die Detektion der zu analysierenden FAME. Die Signale wurden mit einer Integrationssoftware (Maitre Version 2.5, Varian Chrompack) ausgewertet. Die resultierenden Chromatogramme lieferten die zeitliche Abfolge von Detektorsignalen sowie Aussagen über die qualitative und quantitative Fettsäurezusammensetzung der jeweiligen Probe.



Die Auswertung der Fettsäureprofile wurde mit Microsoft EXCEL vorgenommen. Auf jeder DC-Platte wurde eine Leerkontrolle mituntersucht, da es sich nicht vermeiden ließ, dass

geringe Mengen an verunreinigenden Fettsäuren eingeschleppt wurden. Die Integratorfläche des internen Standards der Proben wurde mit der der Kontrollen korreliert und in den Kontrollen aufgetretene, eingeschleppte FAME-Peaks von denen der Probe subtrahiert. Die korrigierten Fettsäuremethylester-Flächen wurden durch für jede Fettsäure separat ermittelte Responsefaktoren dividiert.

Die Abbildung 10 zeigt den Plot eines Standard-Gemisches, welches gaschromatographisch analysiert wurde. Mit einem solchen Plot wurde jeden Tag die Probenanalytik begonnen, um eine Identifikation der Fettsäuremethylester über die Retentionszeiten der Standards zu ermöglichen. Tabelle 4 gibt außerdem die exakte Bezeichnung aller eingesetzten FAME wieder.

Peak Nr.	Symbol	$\omega$ -n	Name	Trivialname
1	12:0		Dodecansäure	Laurinsäure
2	14:0		Tetradecansäure	Myristinsäure
3	15:0		Pentadecansäure	
4	16:0		Hexadecansäure	Palmitinsäure
5	16:1	7	cis-9-Hexadecensäure	Palmitoleinsäure
6	17:0		Heptadecansäure	
7	18:0		Octadecansäure	Stearinsäure
8	18:1	9	cis-9-Octadecensäure	Oleinsäure
9	18:2	6	all-cis-9,12-Octadecadiensäure	Linoleinsäure
10	$\gamma$ -18:3	6	all-cis-6,9,12-Octadecatriensäure	$\gamma$ -Linoleinsäure
11	20:0		Eicosansäure	Arachinsäure
12	18:3	3	all-cis-9,12,15-Octadecatriensäure	Linolensäure
13	20:1	9	cis-11-Eicosensäure	
14	20:2	6	all-cis-11,14-Eicosadiensäure	
15	20:3(9)	9	all-cis-5,8,11-Eicosatriensäure	Meadsäure
16	20:3(6)	6	all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure	

17	22:0		Docosansäure	Behensäure
18	20:3(3)	3	all-cis-11,14,17-Eicosatriensäure	
19	20:4	6	all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure	Arachidonsäure
20	22:1	9	cis-13-Docosensäure	Erucinsäure
21	20:5	3	all-cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure	EPA
22	24:0		Tetracosansäure	Lignocerinsäure
23	22:3	3	all-cis-13,16,19-Docosatriensäure	
24	22:4	6	all-cis-7,10,13,16-Docosatetraensäure	
25	24:1	9	cis-15-Tetracosensäure	Nervensäure
26	22:5	3	all-cis-7,10,13,16,19-Docosapentaensäure	
27	22:6	3	all-cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure	DHA

Tabelle 4: Komposition des bei der GC-Analytik verwendeten FAME-Gemisches

### Analyse der Phospholipidklassen (PL-Profil)

Die Analyse des Phospholipidprofils wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, der sogenannten „high performance thin layer chromatography“ (HPTLC), durchgeführt. Hierbei wurden Aliquots (30 µg Phospholipide) der durch Zentrifugation der BAL bei 48.000 x g gewonnenen „Large Surfactant Aggregates“ der bereits erwähnten Bligh&Dyer-Extraktion unterzogen, um nach ihrer Wiederaufnahme in 50 µl CHCl<sub>3</sub> / MeOH 2/1 (vol/vol) unter Zuhilfenahme eines Applikators (Linomat IV, Camag<sup>®</sup>) auf Silica 60 Dünnschichtplatten (Merck<sup>®</sup>) aufgetragen zu werden. Eine aus acht unterschiedlichen Phospholipidklassen (PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lyso-Phosphatidylcholin, PG = Phosphatidylglycerol, SPH = Sphingomyelin, PI = Phosphatidylinositol, PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin) bestehende Lösung stellte bei dieser Analyse den Standard dar, der in sieben unterschiedlichen Konzentrationen (Konz.) auf dieselbe Dünnschichtplatte gegeben wurde.

Jede Laufkammer wurde 30 Minuten lang mit dem Laufmittel (Chloroform : MeOH : Eisessig: Aqua dest. = 50 : 37,5 : 3,5 : 2 vol/ vol/ vol/ vol) äquiliibriert. Nachdem die Dünnschichtplatte in die Kammer eingebracht wurde, folgte die Trennung der Phospholipide über eine Dauer von 20 Minuten. Die auf der Dünnschichtplatte separierten Phospholipide ließen sich selektiv mit Molybdänblau-Farbstoff anfärben. Dafür war im Anschluss an die Trocknung ein zehn-sekundenlanges, vertikales Eintauchen der Dünnschichtplatte in eine mit Molybdänblau-Reagenz gefüllte Kammer erforderlich. Zur Anfärbung der einzelnen Phospholipide war eine 15-minütige Lagerung der mit Färbereagenz bearbeiteten Dünnschichtplatte an einem dunklen Ort notwendig. Hiernach wurde ein eventueller Überschuss des Färbereagenzes durch ein 30 Sekunden dauerndes Schwenken der Dünnschichtplatte in Aqua destillata entfernt und bis zum endgültigen Eindringen der Feuchtigkeit erneut für 15-20 Minuten an einem dunklen Ort gelagert. Mittels eines Kaltluftföns konnte die Dünnschichtplatte nun getrocknet werden und unter Benutzung eines TLC-II-Scanners [Camag®] bei 700nm für die Phospholipid-Analyse densitometriert werden. Unter Berücksichtigung der in 7 Konzentrationen aufgetragenen Standards erfolgte dann computergestützt die Quantifizierung der einzelnen Phospholipide. In Abhängigkeit der untersuchten Phospholipide zeigte sich eine unterschiedliche Varianz für diese Methode. Diese lag zwischen 0,745% für PC, 1,16% für PG und 7,34% für LPC.

### **SP-B- und SP-C-ELISA**

Für SP-B- und SP-C-ELISAs wurden Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfchen aus Polystyrol der Firma Nunc, Wiesbaden Typ Polysorb® F96 verwendet. SP-C und dimeres SP-B vom Kaninchen diente als Standard und wurde hierzu über eine LH-60-Chromatographie aus Kaninchenlavagen isoliert und anschließend dessen Proteinkonzentration mittels Bradford

Assay bestimmt. Die zu erwartende hohe Reinheit des Proteins wurde in der Gelelektrophorese und im Western Blot bestätigt.

Die Proben für SP-B-ELISA wurden mit 1-Propanol und PBS so verdünnt, dass das Verhältnis von 1-Propanol zu PBS 1:1 in einem Probenvolumen von 250 µl betrug. Die SP-B-Standards wurden ebenfalls mit 1-Propanol/PBS 1:1 seriell verdünnt, ausgehend von einer Konzentration von 100 ng/well bis 3.125 ng/well. Die Proben und Standards für SP-C-ELISA wurden in 80% Isopropanol, pH 3.0 gelöst. Die serielle Verdünnung der Standards erfolgte analog zu den SP-B-Standards.

Alle Proben und Standards wurden als Doppelbestimmungen eingesetzt. Sämtliche Verdünnungen erfolgten in 2 ml Reaktionsgefäßen der Firma Eppendorf, Hamburg.

Nach dem Aufbringen der Proben wurden die Mikrotiterplatten über Nacht bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Trifluorethanol (Aldrich, Steinheim) pro Nöpfchen hinzugegeben und, um das SP-C und SP-B optimal an die Oberfläche der Platte zu binden, bei 37 °C über drei Stunden getrocknet. Daraufhin wurden die Phospholipide selektiv mit Diisopropylether / 1-Butanol 3/2 (beide Merck, Darmstadt, im Falle von SP-B) bzw. Methanol (Merck, Darmstadt, im Falle von SP-C) ausgewaschen. Hierzu wurden 200 µl Diisopropylether / 1-Butanol (SP-B-ELISA) bzw. Methanol (SP-C-ELISA) pro Nöpfchen hinzugegeben und die Platte 20 min lang vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die Platte nochmals kurz mit Diisopropylether / 1-Butanol bzw. Methanol, und dann dreimal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 0,5 % Tween 20, pH 7,6) gewaschen.

Zum Blockieren noch vakanter Bindungsstellen auf der Platte wurde 2 h mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert.

Nach dreimaligem Spülen mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 0.5% Tween 20 erfolgte für SP-B-ELISA die Aufgabe des SP-B-Antikörpers 8B5E (monoklonal) von der Maus gegen porcines SP-B. Hierzu wurde die Antikörperstammlösung (1 mg/ml) in 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% BSA im Verhältnis 1:200 verdünnt. Für SP-C-ELISA wurde als erster Antikörper ein polyklonaler SP-C-Antikörper (Kaninchen anti Mensch, Altanapharma, Konstanz), der 1:2000 in Blockpuffer verdünnt worden war, verwendet. Davon wurden 200 µl pro well pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 0.5% Tween (200 µl/well) wurden 200 µl einer 1:1000-Verdünnung von biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper vom Schaaf (Amersham-Buchler, Braunschweig) für SP-B-ELISA, bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper vom Esel 1:1000 verdünnt für SP-C-ELISA, in 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% BSA aufgetragen und 120 min bei RT inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen wiederum mit 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 0.5% Tween 20 entfernt.

Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde die Avidin/Biotin-Peroxidase-Technik (AB-Komplex, Dako, Hamburg) eingesetzt. Dazu wurden ein Tropfen Avidinlösung und ein Tropfen biotinylierter Meerrettichperoxidaselösung in 5 ml PBS gegeben und 30 min lang äquilibriert. 200 µl einer Verdünnung aus einem Tropfen dieser Lösung mit 10 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.6 / 1% BSA (4 Tropfen /10 ml für SP-C-ELISA) wurden 120 min auf den Platten inkubiert, anschließend wurde wieder dreimal gewaschen.

Die enzymatische Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6)] (ABTS) als Substrat eingeleitet. Dazu wurden 20 mg ABTS und 10 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 30 ml Substratpuffer (60 mM Natriumacetat-Trihydrat, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat pH 4.2) gelöst und 200 µl dieser Lösung pro well pipettiert. Nach der Farbentwicklung (60 min RT) erfolgte die spektralphotometrische

Auswertung bei 405 nm oder 450 nm. Die Standardkurven wurden durch rechnergestützte Cubic-Spline-Interpolation gewonnen.

### **Biophysikalische Charakterisierung des Surfactant**

Der biophysikalischen Analyse des Surfactant ging eine Isolierung der Präkursorfraktion des alveolären Oberflächenfilms, der sogenannten „large surfactant aggregates“ (LSA) voraus. Hierzu wurde die BAL-Flüssigkeit einer Ultrazentrifugation unterworfen (1h, 48000 x g, 4°C) und das resultierende LSA-Pellet durch erneute Phospholipid-Bestimmung auf einen Phospholipidgehalt von 2 mg/ml eingestellt. Hierdurch konnte auch der prozentuale Anteil der LSA-Fraktion an den Gesamt-Phospholipiden in der BAL ermittelt werden.

Die Oberflächenspannungsmessungen der solcherart isolierten LSA erfolgte mit dem von Enhorning 1977 erstmals beschriebenen „pulsating bubble surfactometer“. Hierbei steht eine Surfactantprobe in einer Messzelle über eine Kapillare mit der Raumluft in Verbindung. Es wird eine Luftblase über diese Kapillare angesogen und auf einen vorgegebenen Radius mittels Okular justiert. Nach dem Laplace'schen Gesetz kann die bestehende Oberflächenspannung (mN/m) an der Grenzfläche zwischen der wässrigen Lösung und der luftgefüllten Blase aus dem gemessenen Druck in Wassersäule und unter Berücksichtigung der vorgegebenen Blasenradien berechnet werden. Wichtige Voraussetzung für eine korrekte Messung ist die kontinuierliche, visuelle Kontrolle des Luftblasenradius in dieser modellhaften Alveole und eine Anpassung des Blasenradius. Es wurden 2 Parameter erfasst: Nach schlagartigem Anstellen der Blase auf den minimalen Blasenradius wurde nach 12 sec. der Equilibrium-Oberflächenspannungswert nach Adsorption (ads) gemessen. Weiterhin wurde nach Pulsation der Blase für 5 min mit einer Frequenz von 20 x/min der minimale Oberflächenspannungswert (min) ermittelt.

### 3.2.7 Messung des reduzierten und oxidierten Glutathions

Sowohl das oxidierte Glutathion (GSSG) als auch das Gesamt-Glutathion (GSX) wurden simultan mittels eines "enzymatischen Recycling-Assays", der erstmalig von Tietze [54] beschrieben wurde, bestimmt. Hierzu wurde eine Adaption des Testverfahrens nach Baker et al. [55] angewandt, welche hinsichtlich der GSSG – Bestimmung weiter modifiziert wurde.

Abbildung 20 zeigt den schematischen Ablauf der Reaktion. Reduziertes Glutathion (GSH) reduziert DTNB zu TNB (Gleichung 1), das im Test als Chromophor fungiert. Anschließend wird das nun oxidierte Glutathion durch die Glutathion-Reduktase (unter Oxidation des NADPH) zurückreduziert (Gleichung 2) und steht für die erste Reaktion erneut zur Verfügung ("Enzymatischer Recycling-Assay"). Zur Bestimmung von oxidiertem Glutathion wird das GSH mittels N-Ethylmaleimid (NEM) quantitativ als stabiles Addukt gebunden (Gleichung 3) und dieses mittels Festphasenextraktion nach Jaeschke et al. [164] abgetrennt. Die Konzentration von GSH wird nach der Gleichung  $GSH = GSX - 2GSSG$  berechnet.

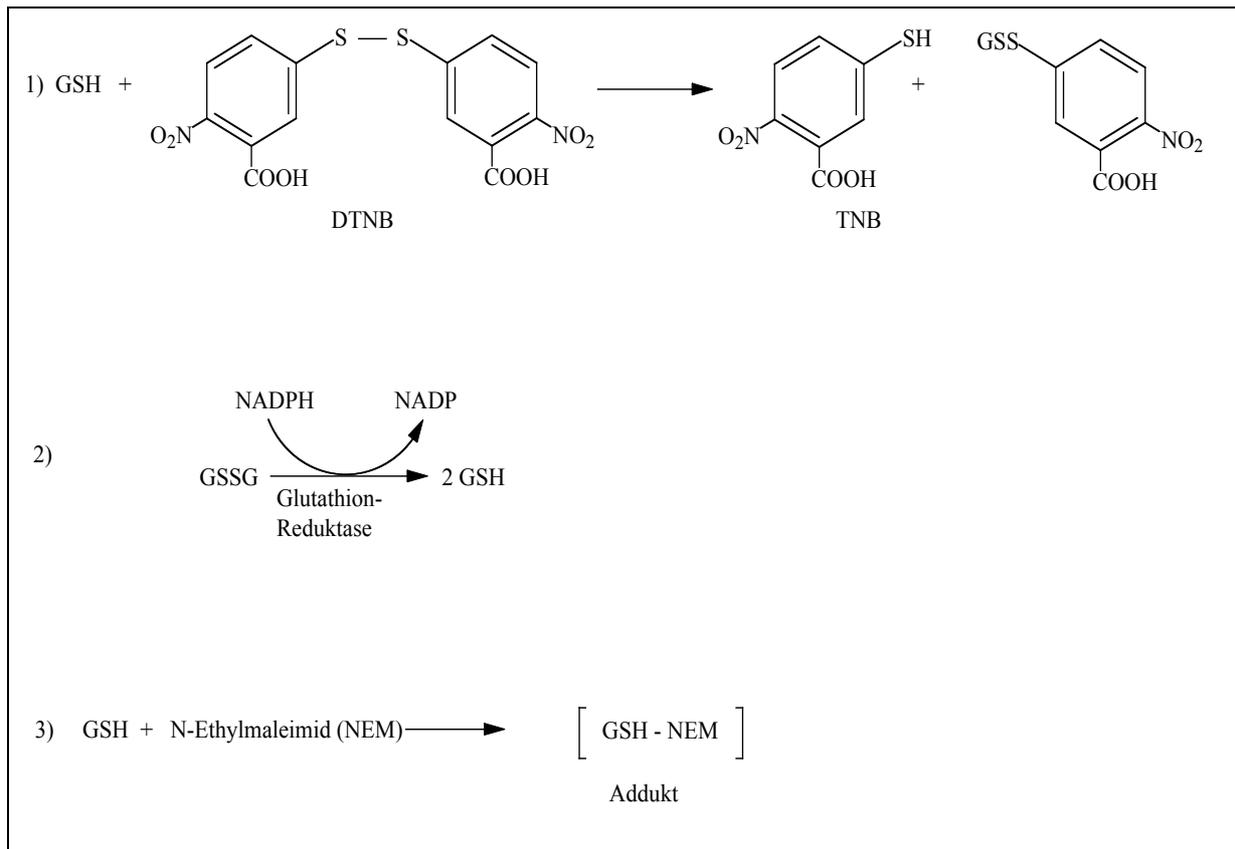


Abbildung 20 : Reaktionen des Glutathion-Assays

### 3.2.7.1 Herstellung der Standards und der Reaktionslösungen

Standards: 20 mg oxidiertes Glutathion (GSSG) wurden in 100 ml 0,9 % NaCl-Lösung gelöst.

Die erreichte Konzentration von 327 nmol/ml wurde 1:100 mit 0,9 % NaCl verdünnt und ergab Standard 1. Danach konnten die Standards entsprechend folgender Vorschrift seriell verdünnt werden:

Standard	nmol GSSG / ml	Verdünnung
1	3,27	1000 µl Standard 1
2	1,64	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 1
3	0,82	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 2
4	0,41	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 3
5	0,205	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 4
6	0,103	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 5
7	0,052	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 6
8	0,026	1000 µl 0,9 % NaCl + 1000 µl Standard 7

Tabelle 5: Serielle Verdünnung der GSSG-Standards

Die Standards wurden maximal 3 Tage bei +4 °C im Kühlschrank gelagert.

Reaktionslösungen: Zuerst erfolgte die Herstellung des Reaktionspuffers: 907 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1190 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 1 mM Ethylendinitrioloessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) (1 ml einer Lösung von 372 mg  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  = 100 mM) wurden in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Anschließend wurde der Puffer mit 25 %iger NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,5 titriert.

Danach wurde eine 1 mM 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB)-Lösung (3,963 mg in 10 ml des oben angesetzten Puffers) und eine 1 mM  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Lösung (8,334 mg in 10 ml des oben angesetzten Puffers) hergestellt.

Die NADPH-Lösung wurde hierbei maximal 3 Tage im Kühlschrank bei +4°C gelagert.

Unmittelbar vor Messung der Proben erfolgte die Herstellung der Reaktionslösung mit 2,8 ml 1mM DTNB, 3,75 ml 1 mM NADPH sowie 5,85 ml Puffer. Zusätzlich wurden 19 Units GSH-Reduktase zugegeben. Es ergaben sich Endkonzentrationen von 0,23 mM DTNB, 0,30 mM NADPH und 1,5 Units/ml Glutathion-Reduktase.

### **3.2.7.2 Probenvorbereitung für die GSSG-Bestimmung**

Herstellung des Puffers und der GSH-Blockierlösung: 4535 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 5950 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst (Konzentration Na-K-P-Puffer: 100 mM, pH = 6,5). Für die Blockierlösung wurden 187,5 mg N-Ethylmaleimid (NEM) in 30 ml Puffer gelöst (Konzentration NEM: 50 mM).

Probenvorbereitung: Für die Messung des GSSG wurden jeweils 400  $\mu\text{l}$  der Standards 1 bis 8, 12 Proben sowie 2 Blanks (0,9 % NaCl-Lösung), ein externer Standard (Kaninchen-BAL mit bekannter Konzentration) zur Validierung der Messung und ein GSH-Standard (6,4 nmol/ml) zur Überprüfung der Effizienz der Blockierung in 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Blockierlösung. Nach einer Minute Schütteln ließ man die Cups bei Raumtemperatur für 60 Minuten reagieren. Alle 20 Minuten wurde hierbei erneut geschüttelt. Während der Inkubation wurden die Vorsäulen (Chromabond 18 ec 200 mg) mit jeweils 6 ml MeOH gespült, danach mit 6 ml des Puffers äquilibriert. Daraufhin wurden jeweils 400  $\mu\text{l}$  der Probe in die Vorsäulen gegeben. Die restlichen 400  $\mu\text{l}$  wurden aufgegeben und in 1,5 ml Eppendorfcups aufgefangen. Danach wurde mit 1 ml des Puffers gespült, das Eluat wurde ebenfalls im selben Cup gesammelt.

Die Vorsäulen wurden nach Benutzung mit 6 ml MeOH gespült und insgesamt maximal fünfmal verwendet.

### **3.2.7.3 Durchführung der Messung**

Die Messungen für GSX und für GSSG wurden nacheinander auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Standards und Proben wurden hierzu nach folgendem Schema auf 96-Well-Mikrotiterplatten verteilt:

In die linke Hälfte pipettierte man entsprechend unten aufgeführter Tabelle 100  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Proben für die GSSG-Messung (jeweils Doppelbestimmungen), in die rechte

Hälfte wurden spiegelverkehrt jeweils 50 µl der Proben für die Gesamt-Glutathion-(GSX)-Messung aufgegeben.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	STD <b>1</b>	STD <b>1</b>	Leerwert	Leerwert	GSH	GSH	Probe 12	Probe 12	Probe 6	Probe 6	STD <b>8</b>	STD <b>8</b>
2	STD 2	STD 2	Leerwert	Leerwert	EXT. STD	EXT. STD	Probe 11	Probe 11	Probe 5	Probe 5	STD 7	STD 7
3	STD 3	STD 3	Probe 1	Probe 1	Probe 7	Probe 7	Probe 10	Probe 10	Probe 4	Probe 4	STD 6	STD 6
4	STD 4	STD 4	Probe 2	Probe 2	Probe 8	Probe 8	Probe 9	Probe 9	Probe 3	Probe 3	STD 5	STD 5
5	STD 5	STD 5	Probe 3	Probe 3	Probe 9	Probe 9	Probe 8	Probe 8	Probe 2	Probe 2	STD 4	STD 4
6	STD 6	STD 6	Probe 4	Probe 4	Probe 10	Probe 10	Probe 7	Probe 7	Probe 1	Probe 1	STD 3	STD 3
7	STD 7	STD 7	Probe 5	Probe 5	Probe 11	Probe 11	EXT. STD	EXT. STD	Leerwert	Leerwert	STD 2	STD 2
8	STD 8	STD 8	Probe 5	Probe 5	Probe 12	Probe 12	GSH	GSH	Leerwert	Leerwert	STD 1	STD 1

Tabelle 6: Anordnung der Standards und Proben auf der Mikrotiterplatte

Zuerst erfolgte die Messung des GSX auf der rechten Hälfte: Zu dem Probenvolumen von 50 µl pipettierte man mit einer ELISA-Transferpipette 100 µl Reaktionslösung. Es wurden vier Messpunkte über einen Zeitraum von drei Minuten bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Danach wurden die Proben für GSSG auf der linken Seite der Mikrotiterplatte pipettiert (100 µl Probe + 100 µl Reaktionslösung) mit vier Messpunkten auf sechs Minuten verteilt (dies

war aufgrund der niedrigeren GSSG-Konzentrationen und der somit geringeren Signalstärke notwendig; die Messdauer kann bei Bedarf auch noch weiter erhöht werden).

Abschließend erfolgte die Berechnung einer Standardkurve mittels der Standards abzüglich der Leerwerte, mit deren Hilfe schließlich die Konzentrationen der Proben berechnet wurden.

Die Berechnung des reduzierten Glutathions wurde mittels folgender Gleichung durchgeführt:

$$\text{GSH} = \text{GSX} - [2 \times \text{GSSG}].$$

### **3.2.8 Quantifizierung von Retinol und $\alpha$ -Tocopherol**

Retinol (Vitamin A) und  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) wurden simultan mittels HPLC und Dioden-Array-Detektion in Anlehnung an das Verfahren von Catignani und Bieri [56] bestimmt.

#### **3.2.8.1 Herstellung der Standards**

Es wurden Standardlösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt (alle Verdünnungen erfolgten in Methanol):

Retinol-Acetat: 1 mg/ml, 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml

Retinol: 500  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 0,5  $\mu$ g/ml, 50 ng/ml, 5 ng/ml

$\alpha$ -Tocopherol: 5 mg/ml, 50  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 0,5  $\mu$ g/ml, 50 ng/ml

Aus diesen Standards wurden zur Erstellung der Standardkurven die sechs folgenden Mischungen (jeweils Doppelbestimmungen) in HPLC-Vials zusammenpipettiert, im Stickstoffstrom getrocknet und in 100  $\mu$ l Methanol wieder gelöst.

Standardmix (je 2x)	Retinol-Acetat [ng]	Retinol [ng]	$\alpha$ -Tocopherol [ng]
1	100	25,0	250
2	100	10,0	100
3	100	5,0	50
4	100	2,5	25
5	100	1,0	10
6	100	0,5	5

Tabelle 7: Substanzmengen von Retinol und  $\alpha$ -Tocopherol zur Herstellung der Standards

Nach Aufgabe auf die HPLC und Messung erfolgten dann mit Hilfe der Chemstation-Software die Berechnung der Standardkurven und die Festlegung von Retinol-Acetat als internem Standard.

### 3.2.8.2 Probenvorbereitung

2 ml Probe wurden 100  $\mu$ l einer 1  $\mu$ g/ml all-trans-Retinol-Acetat-Lösung in MeOH (entsprechend 100 ng total) als interner Standard (zur Kompensation von Extraktionsverlusten) und anschließend 2 ml Hexan zugegeben (bei konzentrierteren Proben wurden auch kleinere Ausgangsvolumina eingesetzt). Danach wurde die Probe 45 sec. kräftig geschüttelt und zur Ausbildung einer optimalen Phasengrenze 10 min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Es erfolgte die Isolierung der Hexanphase mit einer Pasteurpipette und das Trocknen im Stickstoffstrom. Die getrocknete Probe wurde in 100  $\mu$ l Methanol gelöst und bis zur Analyse, die am selben Tag erfolgte, lichtgeschützt bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.8.3 Chromatographische Bedingungen

Die Analyse erfolgte über eine LiChrosorb RP-18 Säule (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt) bei einer konstanten Temperatur von 40 °C und einem Flow von 1 ml/min. Die mobile Phase bestand aus 97 % MeOH und 3 % H<sub>2</sub>O. Die Detektion erfolgte mittels eines

Dioden-Array Detektor bei den Adsorptionsmaxima beider Analyten von 292 nm ( $\alpha$ -Tocopherol) und 324 nm (Retinol). Die Peakreinheit der beiden Analyten wurde anhand der UV-Spektren überprüft.

### **3.2.9 Quantifizierung von Ascorbinsäure und Harnsäure**

Ascorbinsäure (Vitamin C, AA) und Harnsäure (Uric Acid, UA) wurden simultan mittels HPLC und elektrochemischer Detektion in Anlehnung an die Verfahren von Iriyama et al. [57] bestimmt.

#### **3.2.9.1 Herstellung der Standards und Erstellen der Standardkurve**

10 mg Ascorbinsäure (AA) wurden in 10 ml 2 %iger Metaphosphorsäure (MPS) und 10 mg Harnsäure in 0,5 ml 1 M NaOH und 9,5 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurden beide Standards mit 2 %iger MPS zweimal um Faktor 10 verdünnt (entsprechend einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml). Je 2 ml dieser Standards wurden gemischt (finale Konzentration AA und UA 5 $\mu$ g/ml) und mit 2 %iger MPS – Lösung daraus folgende Standards hergestellt:

- A 1  $\mu$ g/ml
- B 0,5  $\mu$ g/ml
- C 0,1  $\mu$ g/ml
- D 0,025  $\mu$ g/ml

Mit diesen Verdünnungen wurde die Standardkurve entsprechend Tabelle 8 erstellt: (jeweils zwei Läufe pro Stufe).

Verdünnung	Volumen [ $\mu$ l]	Absolute Menge AA/UA [ng]
A	50	50
A	25	25
B	25	12,5
C	50	5
C	25	2,5
D	50	1,25
D	25	0,625
D	10	0,25

Tabelle 8: Verdünnungen zur Erstellung der AA/UA-Standardkurve

### 3.2.9.2 Vorbereitung der Proben

In 1,8 ml HPLC-Vials wurden 450  $\mu$ l Probe, 50  $\mu$ l 16 % MPS und 100  $\mu$ l Heptan geben und 45 Sekunden kräftig geschüttelt. Danach wurden die Proben bei 4000 rpm 5 Minuten zentrifugiert.

Bis zur Analyse am selben Tag wurden die Proben bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.2.9.3 HPLC – Bedingungen

A. Vorbereitung der HPLC: Vor Installation der Säule und Beginn der Messungen musste das HPLC-System erst gereinigt und passiviert werden. Dieser Vorgang betraf alle Bestandteile (inklusive der Kapillaren des Injektors) außer der Detektorzelle und der Säule. Hierzu wurden bei maximaler Flussrate von 5 ml/min folgende Spülungen durchgeführt:

1. 20 Minuten H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
2. 15 Minuten Isopropanol
3. 15 Minuten H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
4. 30 Minuten 37,8 %ige (=6 molare) Salpetersäure

Anschließend wurde das System so lange mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült, bis ein pH-Wert von 7,0 am Systemausgang erreicht war. Nach einer Äquilibration von 30 Minuten mit der mobilen Phase (siehe unten) bei maximalem Flow wurden Säule und Detektorzelle wieder installiert

und das komplette System bei einem Fluss von 1 ml/min für eine Stunde mit der mobilen Phase weiter äquilibriert.

Dieser Vorgang wurde nach jeder Benutzung der HPLC-Anlage durch andere Messungen wiederholt.

B. ECD-Parameter: Der Detektor wurde im Amperometrie-Modus bei einem Potential von 800 mV (Limits –400 bis 1400 mV) betrieben. Die Polarität war auf Oxidation eingestellt bei einer Messbereichsskala von 500 nA. Die Messzelle war mit einer Ag/AgCl-Arbeits Elektrode und einer Solid-State-Referenzelektrode ausgestattet.

C. Herstellung der mobilen Phase: Das HPLC-System wurde mit einem 0,2 M  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 2,0 als mobile Phase gefahren. Hierzu wurden in ca. 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$  27,22 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gelöst und anschließend mit ortho-Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,0 titriert. Der Puffer wurde anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1000 ml eingestellt.

D. Messung der Proben: Das HPLC-System (stationäre Phase LiChrosorb RP-18, 5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt) wurde bei einem Flow von 1 ml/min und einer konstanten Temperatur von 40°C gefahren. Die Detektion der Proben erfolgte mittels eines elektrochemischen Detektors 1049A (Agilent, Waldbronn). Zur Aufnahme der Probe wurde die Hexan-Phase mit einer Hamilton-Spritze durchstoßen und 50  $\mu\text{l}$  der unteren Phase injiziert. Bei zu hoher Konzentration der Proben (ECD-Messbereich über 500 nA) wurde weniger Volumen aufgeben bzw. die Probe verdünnt.

#### **3.2.9.4 Quantifizierung von Malondialdehyd**

Malondialdehyd (MDA) wurde nach Draper und Hadley (165) bei 90 °C im sauren Medium mit Thiobarbitursäure (TBA) umgesetzt. Das entstandene pinkfarbene Addukt ( $\text{MDA}[\text{TBA}]_2$ ) wurde bei 532 nm Excitation und 553 nm Emission mittels HPLC und fluoreszenzspektrometrischer Detektion gemessen.

Das geringe Vorkommen von MDA in bronchoalveolärer Lavage (BAL) sowie das Auftreten von farbigen Störkomponenten machten sowohl eine Konzentration als auch eine Reinigung der Proben durch Vorsäulen notwendig.

### **3.2.9.5 Präparation des MDA-Standards**

1 mmol 1,1,3,3 Tetraethoxypropan (Tetraethylacetal von Malondialdehyd, 220,3 mg) wurden zur Freisetzung des Malondialdehyds in 100 ml 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2h lang bei Raumtemperatur gerührt.

Das so freigesetzte MDA wurde 1:1000 (v/v) mit Aqua dest. verdünnt (resultierende Konzentration = 1 µM = 0,72 mg/l = 720 ng/ml).

### **3.2.9.6 Präparation des MDA-TBA-Addukts**

Benötigte Reagenzien: Es wurde 10 % Trichloressigsäure (10 g TCA auf 100 ml Aqua dest.) sowie eine Lösung von 670 mg TBA in 100 ml Aqua dest. hergestellt (letztere wurde aufgrund ihrer schweren Löslichkeit auf 37 °C erhitzt und im Ultraschallbad beschallt).

Probenvorbereitung: 1000 µl Probe wurden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und danach in 100 µl Wasser resuspendiert. 200 µl 10 %ige TCA und 300 µl 0,67 %ige TBA wurden hinzugefügt, anschließend wurde die Probe in ein Glasgefäß mit Schraubverschluss umpipettiert und 10 Minuten bei 90-100 °C reagieren gelassen.

Nach dem Abkühlen folgte eine Zentrifugation der Probe für 10 Minuten bei 4000 rpm. Vorsäulen (Baker Octadecyl 7334-06, 8 ml) wurden mit 15 ml MeOH gespült und mit 15 ml Aqua dest. äquilibriert. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und mit 4 ml Aqua dest. gespült. Schließlich wurde das MDA-TBA-Addukt mit 2 ml MeOH eluiert und in einem Eppendorf-Cup aufgefangen. Im letzten Schritt trocknete man die Probe erneut in einer Vakuumzentrifuge und löste sie dann in 200 µl Aqua dest. zur HPLC-Analytik.

### **3.2.9.7 HPLC-Analytik**

Die stationäre Phase bestand aus einer LiChrosorb RP-18-Säule (10 µm, 250 x 4,6 mm, Merck, Darmstadt) mit einer mobilen Phase aus 18% Methanol in Wasser. Der Flow betrug 0,5 ml/min bei einer durch einen Säulenofen konstant gehaltenen Temperatur von 40 °C. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm und einer Emissionswellenlänge von 553 nm.

Von den Proben wurde ein Volumen von 150 µl in die HPLC-Anlage aufgegeben (auf vollständiges Lösen wurde geachtet, in einzelnen Fällen wurde die Probe im Ultraschall behandelt und danach zentrifugiert). Nach etwa 10-20 Proben wurde die Säule etwa 1 h mit 100 % MeOH gespült.

### **3.2.10 Quantifizierung von 8-Isoprostanen**

8-Isoprostane wurden mittels eines kommerziell erhältlichen Elisa-Kits der Firma Cayman gemessen.

#### **3.2.10.1 Vorbereitung der Reagenzien**

Zur Herstellung des EIA-Puffers wurde das Puffer-Konzentrat des Kits in einem Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Anschließend wurden für den Waschpuffer 5ml Konzentrat mit Aqua dest. 1:400 zu einem Gesamtvolumen von 2 l verdünnt und mit 1ml Tween 20 vermischt. Der 8-Isoprostan-AchE-Tracer und das 8-Isoprostan-Antiserum des Kits wurden dann jeweils in 6 ml EIA-Puffer gelöst.

#### **3.2.10.2 Herstellung der Standards**

Nach der Equilibrierung einer Pipettenspitze mit Ethanol wurde diese benutzt, um 100 µl 8-Isoprostan-Standard in einen Eppendorf-Cup zu pipettieren. Danach wurde mit 1800 µl Aqua dest. verdünnt. Daraus resultierte eine Konzentration von 2,5 ng/ml.

Der Standard wurde nun in folgender serieller Reihe verdünnt:

Cup 1:  $900\mu\text{l EIA-Puffer} + 100\mu\text{l Stock} = 250\text{pg/ml} = 12,5\text{pg/well}$

Cup 2:  $500\mu\text{l EIA-Puffer} + 500\mu\text{l Cup 1} = 125\text{pg/ml} = 6,25\text{pg/well}$

Cup 3:  $500\mu\text{l EIA-Puffer} + 500\mu\text{l Cup 2} = 62,5\text{pg/ml} = 3,125\text{pg/well}$

usw. bis Cup 8

### **3.2.10.3 Probenvorbereitung**

Zur Präparation der Proben erfolgte die Herstellung eines 1M Acetat-Puffers (pH=4.0). Dafür wurden 38ml einer 1M NaAcetat x 3 H<sub>2</sub>O-Lösung (3,18g in 100 ml Wasser) mit ca. 40 ml 1M Essigsäure (1M Essigsäure = 5,775 ml Eisessig ad 100 ml Wasser) unter pH-Meter-Kontrolle auf einen pH-Wert von 4.0 titriert. 1 ml der Proben (BAL) wurde anschließend 1:1 mit dem Acetat-Puffer versetzt.

Die Festphasenextraktion erfolgte mit Macherey-Nagel Chromabond C18ec-Säulen (3 ml / 200 mg, Cat. Nr. 730 012) in einer Vakuumkammer unter Wasserstrahlvakuum. Zuerst wurden die Säulen mit 5 ml MeOH (Fluka HPLC grade) gespült, danach mit 5 ml Aqua dest. äquilibriert. Nach Probenauftrag (2 ml total) wurde zuerst mit 5 ml Aqua dest., anschließend mit 5 ml Hexan (Merck Uvasol) gespült. Die Elution erfolgte mit 5 ml Essigsäureethylester (Ethylacetat) Merck Uvasol in Reagenzgläser. Die Proben wurden unter Stickstoff getrocknet, in definiertem Volumen (200  $\mu\text{l}$ ) EIA-Puffer gelöst und in Eppendorf-Cups überführt. Für die Messung wurden 50 $\mu\text{l/well}$  pipettiert (entspricht 250  $\mu\text{l BAL/well}$ ) und der resultierende Wert aufgrund der Konzentrierung durch die Festphasenextraktion durch 5 dividiert (= pg/ml).

Die Säulen wurden nach Spülen mit 5 ml MeOH maximal dreimal wiederverwendet.

### **3.2.10.4 Messung der Proben**

Auf einer 96 Well ELISA-Platte wurden acht Wells für die Standards sowie jeweils ein Well zur Messung der TA (Total Activity), NSB (Non-Specific Binding), MB (Maximum

Binding) und ein Blank-Well reserviert. Die restlichen 84 Wells standen für Proben zur Verfügung.

Je 100 µl EIA Puffer wurden in die NSB-Wells, 50 µl EIA Puffer in die MB-Wells gegeben. 50 µl der 8-Isoprostanstandards wurden in Einfach- oder Doppelbestimmung in die jeweiligen Wells pipettiert. Ebenso wurden 50 µl jeder Probe in Einfach- oder Doppelbestimmung auf die Platte gegeben.

Der 8-Isoprostan AchE Tracer wurde bis auf TA und den Blank-Wells in jedes Well pipettieren (jeweils 50 µl). Danach wurden 50 µl des 8-Isoprostan Antiserums zu jedem Well geben (ausgenommen TA, NSB und den Blank-Wells).

Nach Abdeckung der Platte und Inkubation bei Raumtemperatur für 18 Stunden wurde anschließend die Platte dekantiert und fünfmal mit dem Waschpuffer gespült.

Jeweils 200 µl Ellman's Reagenz (Zur Herstellung eines der 100 dtn Vials der Ellman's Reagenz des Kits in 20 ml A. dest. lösen) in jedes Well pipettieren (Mehrkanalpipette) und zusätzlich in den TA-Well 5 µl Tracer geben.

Die Platte dann ca. 2 h unter Schütteln bei RT inkubieren und schließlich bei einer Wellenlänge von 405 nm messen.

### **3.3 Statistische Auswertung**

Daten aus dem Bereich der Methodenentwicklung (Kap. 3.2. und 4.1.) sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (Mean  $\pm$  SD). Alle Ergebnisse aus der Analyse biochemischer Proben sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt (Mean  $\pm$  SE). Teilweise wurde auch der Median berechnet.

Die statistische Analyse auf Unterschiede zwischen ischämischen Lungen und nativen Kontrollen erfolgte mit Hilfe von SPSS (SPSS Inc., Vers. 9.0).

Dazu wurde zunächst für jeden einzelnen Parameter per Kruskal-Wallis-H-Test die prinzipiellen Signifikanzunterschiede innerhalb aller Kollektive ermittelt (einfaktorielle Rangvarianzanalyse), gefolgt von der Durchführung eines non-parametrischen (Mann-Whitney-U-Test). Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Dargestellt sind die Signifikanzniveaus im Text jeweils mit \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

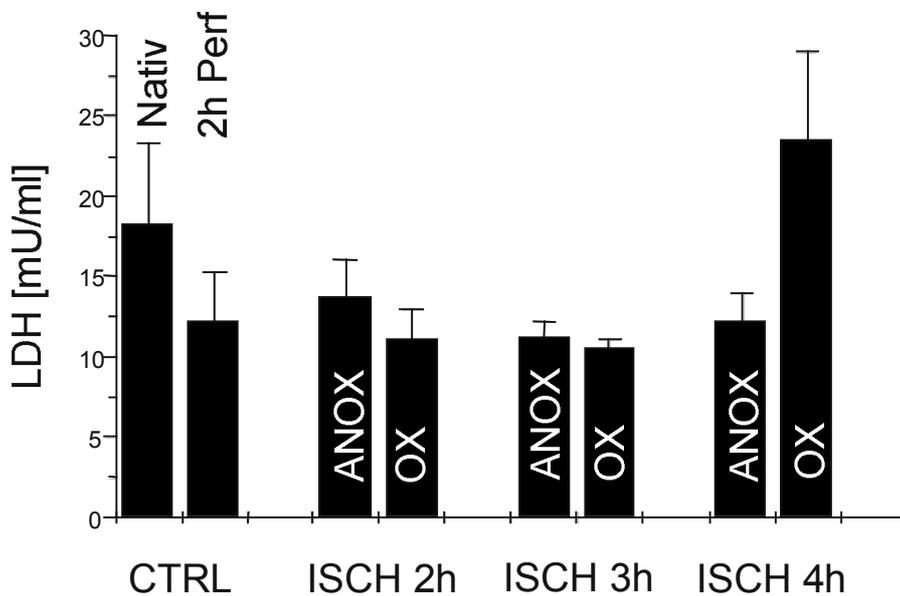
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Physiologische Daten**

In den durchgeführten Versuchsreihen waren die Gewichtsverläufe der einzelnen Lungen über die gesamte Versuchsdauer weitestgehend konstant. Am Versuchsende bestand sowohl zwischen ischämischen und perfundierten Lungen als auch zwischen normoxisch und hyperoxisch ventilierten Lungen kein wesentlicher Gewichtsunterschied.

Im Einzelnen erreichten perfundierte Kontroll-Lungen eine Gewichtszunahme von  $0,12 \pm 0,02$  g unter Normoxie und  $1,55 \pm 0,51$  g unter Hyperoxie. Im Gegensatz dazu wurde ein geringer Gewichtsverlust in allen ischämischen Lungen verzeichnet. Nach vier Stunden anoxisch bzw. hyperoxisch ventilierter Ischämie betrug der Gewichtsverlust  $2,67 \pm 0,29$  g bzw.  $1,67 \pm 0,44$  g. Dieser geringe Gewichtsverlust ist darauf zurückzuführen, dass trotz Platzierung der Lungen in einem befeuchteten und temperierten Organgefäß immer ein geringer Feuchtigkeitsverlust durch Exsudation an der Lungenoberfläche auftritt. Bei den perfundierten Lungen wird dieser Effekt durch die fortwährende Perfusion ausgeglichen und führt daher zu keinem Gewichtsverlust. Die ischämischen Lungen dagegen haben bei abgeschalteter Perfusion keinen derartigen Kompensationsmechanismus und verzeichnen einen geringgradigen Gewichtsverlust.

Als Marker für einen zellulären Schaden der verwendeten Organe und eine erhöhte transendotheliale/epitheliale Durchlässigkeit wurden die Gesamteiweiß- und LDH-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage herangezogen. Wie in Tabelle 10 und Abbildung 11 zu sehen ist, gab es diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, was darauf hinweist, dass nach Ischämie im Vergleich zu den perfundierten Kontrollen kein ausgesprochener Zellschaden vorlag und auch keine erhöhte Plasmaproteindurchlässigkeit in das alveoläre Kompartiment bestand.



**Abbildung 11:** Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) in der bronchoalveolären Lavage (BAL) un behandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundierter und normoxisch ventilierter Lungen (2h perf.) und anoxisch (ANOX) bzw. hyperoxisch (OX) ventilierter Lungen unter Ischämie (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert±Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen.

## 4.2 Antioxidantien und Oxidationsprodukte in BAL

Die ischämiebedingten Veränderungen der Antioxidantien und Oxidationsprodukte sind in Tabelle 9 zusammengefasst und werden im Folgenden separat dargestellt.

Tabelle 9 : Antioxidantien und Oxidationsprodukte

	n	F <sub>2</sub> -Iso- prostane [pg/ml]	GSSG [μM]	GSH [μM]	GSX [μM]	Plasmalo- gene [μg/ml]
Kontrolle unbehandelt	6	5,7±1,3	0,22±0,02	1,32±0,22	1,75±0,25	2,94±0,21
Kontrolle 2h perf. Normoxie	6	6,3±0,6	0,29±0,02	1,96±0,06*	2,54±0,11*	3,08±0,12
Kontrolle 3h perf. Normoxie	6	8,0±1,2	0,34±0,03*	1,87±0,19	2,56±0,23	2,53±0,35
Kontrolle 4h perf. Normoxie	6	18,2±3,1**	0,58±0,03**	1,95±0,34	3,11±0,29*	2,34±0,34
Kontrolle 2h perf. Hyperoxie	5	13,3±2,3*	0,49±0,04**	2,14±0,05**	3,11±0,05**	2,31±0,20
Kontrolle 3h perf. Hyperoxie	5	13,1±2,5*	0,53±0,01**	1,32±0,05	2,38±0,04	2,93±0,34
Kontrolle 4h perf. Hyperoxie	5	9,6±0,8*	0,47±0,09	1,95±0,24	2,33±0,21	3,28±0,24
Ischämie 2h Anoxie	6	19,9±4,3**	0,32±0,05	2,63±0,37	3,26±0,46*	4,53±0,15**
Ischämie 3h Anoxie	5	17,7±3,3**	0,31±0,04	5,05±0,82***	5,68±0,71***	5,36±0,27***
Ischämie 4h Anoxie	6	23,5±5,0**	0,40±0,06**	4,41±1,05**	5,21±1,16**	4,04±0,11**
Ischämie 2h Hyperoxie	5	23,0±4,9**	0,49±0,04**	2,37±0,35*	3,35±0,26**	2,28±0,42
Ischämie 3h Hyperoxie	6	22,2±5,6**	0,81±0,09***	2,74±0,18**	4,37±0,34***	4,83±0,31***
Ischämie 4h Hyperoxie	6	27,3±6,2**	0,83±0,07***	2,01±0,25*	3,67±0,39**	3,14±0,29

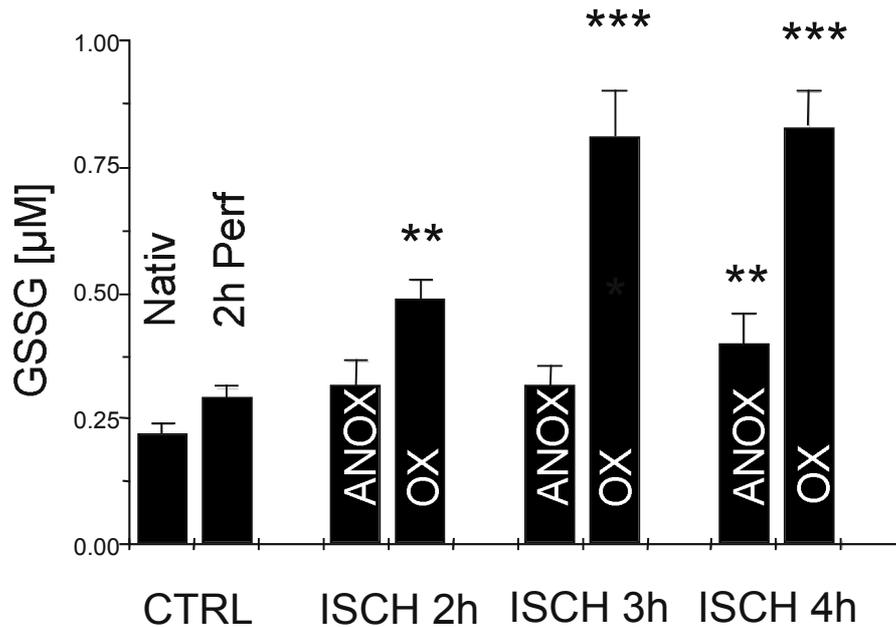
	n	Vitamin A [ng/ml]	Vitamin E [ng/ml]	Vitamin C [ng/ml]	Harnsäure [ng/ml]
Kontrolle unbehandelt	6	1,15±0,18	35,5±7,6	326±41	17,9±1,0
Kontrolle 2h perf. Normoxie	6	1,35±0,22	49,5±5,7	388±27	32,7±4,6**
Kontrolle 3h perf. Normoxie	6	2,14±0,59	39,1±0,6	418±32	35,7±3,1**
Kontrolle 4h perf. Normoxie	6	1,56±0,14	51,2±1,2*	382±14	35,9±0,5**
Kontrolle 2h perf. Hyperoxie	5	1,27±0,20	43,2±0,1	282±4	27,9±5,0*
Kontrolle 3h perf. Hyperoxie	5	0,98±0,05	41,3±0,4	336±12	33,9±2,4**
Kontrolle 4h perf. Hyperoxie	5	1,56±0,09*	50,5±8,7	161±12**	34,1±4,1**
Ischämie 2h Anoxie	6	4,35±0,45***	53,8±1,5*	375±40	41,0±4,1**
Ischämie 3h Anoxie	5	3,20±0,59*	70,1±5,8**	509±49*	81,6±13,4***
Ischämie 4h Anoxie	6	2,57±0,23**	52,6±3,7*	443±74*	105,7±19,8***
Ischämie 2h Hyperoxie	5	2,25±0,34*	58,9±7,7*	325±29	29,0±1,4**
Ischämie 3h Hyperoxie	6	2,06±0,41*	59,6±4,7*	447±52*	35,9±2,5**
Ischämie 4h Hyperoxie	6	4,54±1,11**	54,4±3,5*	426±42*	73,2±3,4***

Angegeben sind die Konzentrationen von F<sub>2</sub>-Isoprostan, oxidiertem Glutathion (GSSG), reduziertem und Gesamtglutathion (GSH resp. GSX), der Plasmalogengehalt, die Konzentrationen von Retinol (Vitamin A),  $\alpha$ -tocopherol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C) und Harnsäure in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001 verglichen mit nativen Kontrollen.

#### 4.2.1 Oxidiertes Glutathion

In den ischämischen Lungen wurde ein leichter Anstieg der Konzentration des oxidierten Glutathions (GSSG) (Abbildung 12 und Tabelle 9) in der bronchoalveolären Lavage während

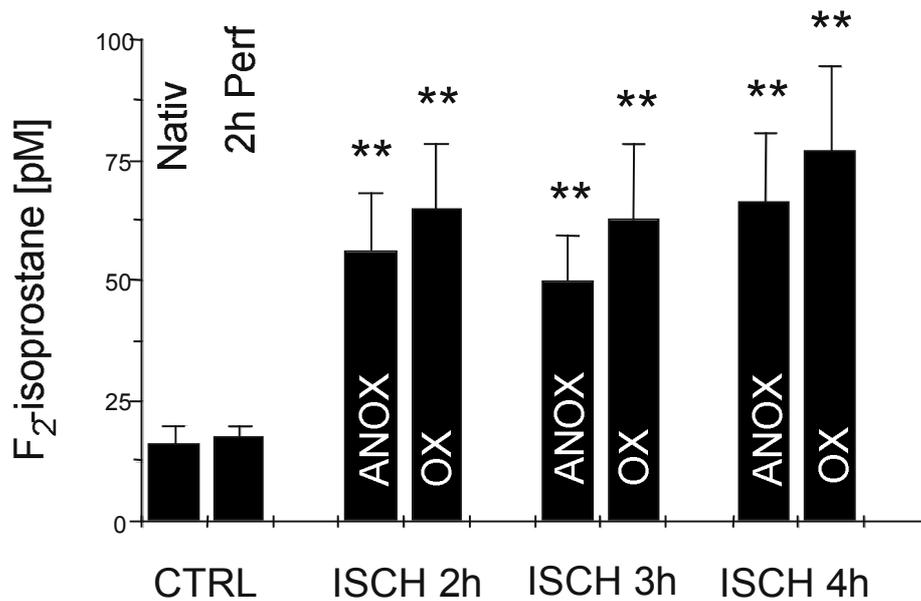
anoxischer Ventilation und viel deutlicher unter hyperoxischer Ventilation im Vergleich mit normoxisch (2h:  $0,29 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) oder hyperoxisch (2h:  $0,49 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ) ventilerten oder nativen ( $0,22 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) Kontrollen verzeichnet.



**Abbildung 12:** Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) in bronchoalveolärer Lavage un behandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundiert und normoxisch ventilierter Lungen (2h perf) und anoxisch (ANOX) und hyperoxisch (OX) ventilierter ischämischer Lungen (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert±Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  im Vergleich zu un behandelten Kontrollen.

#### 4.2.2 F<sub>2</sub>-Isoprostane

Die Konzentration der F<sub>2</sub>-Isoprostane war in ischämischen Lungen sowohl während anoxischer (2 h:  $56,1 \pm 12,1 \text{ pM}$ ; 4 h:  $66,3 \pm 14,1 \text{ pM}$ ;  $p < 0,01$ ) als auch hyperoxischer (2 h:  $64,9 \pm 13,8 \text{ pM}$ ; 4 h:  $77,0 \pm 17,5 \text{ pM}$ ;  $p < 0,01$ ) Ventilation im Vergleich zu normoxisch oder hyperoxisch (4 h:  $27,0 \pm 2,0 \text{ pM}$ ) ventilerten oder nativen ( $16,0 \pm 4,0 \text{ pM}$ ) Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 13 und Tabelle 9).



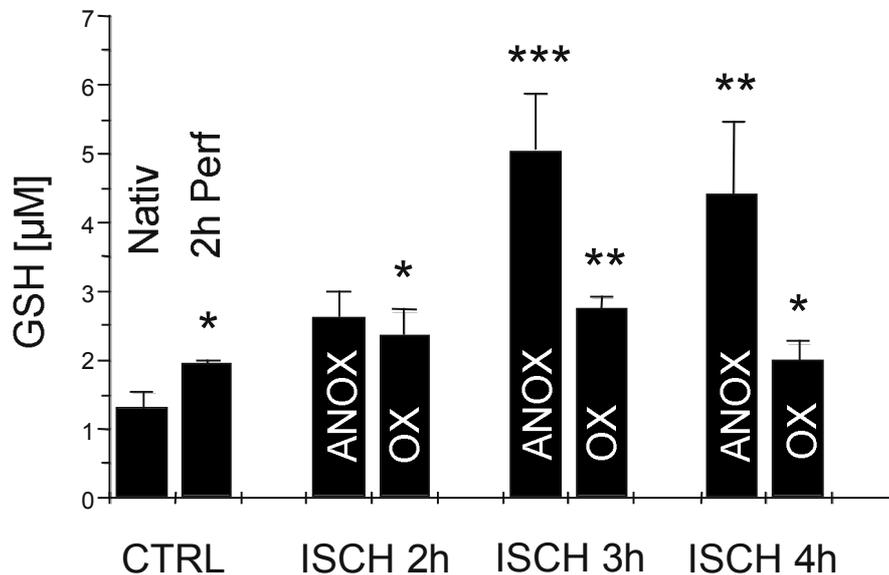
**Abbildung 13:** Konzentration von F<sub>2</sub>-Isoprostanen in bronchoalveolärer Flüssigkeit unbehandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundiert und normoxisch ventilierter Lungen (2h perf) und anoxisch (anox) und hyperoxisch (ox) ventilierter, ischämischer Lungen (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert±Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \*\*=p<0,01 verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

#### 4.2.3 Reduziertes Glutathion

Die Konzentration des reduzierten Glutathions (GSH) lag in zweistündigen normoxisch ventilerten Kontrollen bei  $1,96 \pm 0,06 \mu\text{M}$  und bei  $2,14 \pm 0,05 \mu\text{M}$  nach 2 h hyperoxischer Ventilation. In nativen Kontrollen lag die GSH-Konzentration bei  $1,32 \pm 0,22 \mu\text{M}$ .

Im Vergleich dazu stiegen die GSH-Werte während anoxischer Ventilation ischämischer Lungen deutlich an mit einem vierfachen Anstieg nach drei Stunden (Abbildung 14).

Verglichen mit den zweistündigen normoxischen Kontrollen fand in der Gruppe hyperoxisch ventilierter Lungen lediglich ein geringfügiger Anstieg der GSH-Konzentration nach zwei und drei Stunden hyperoxischer Ischämie statt (Abbildung 14 und Tabelle 9). Im Vergleich zu den hyperoxisch ventilerten Kontrollen fand sich kein Anstieg der GSH-Konzentration.

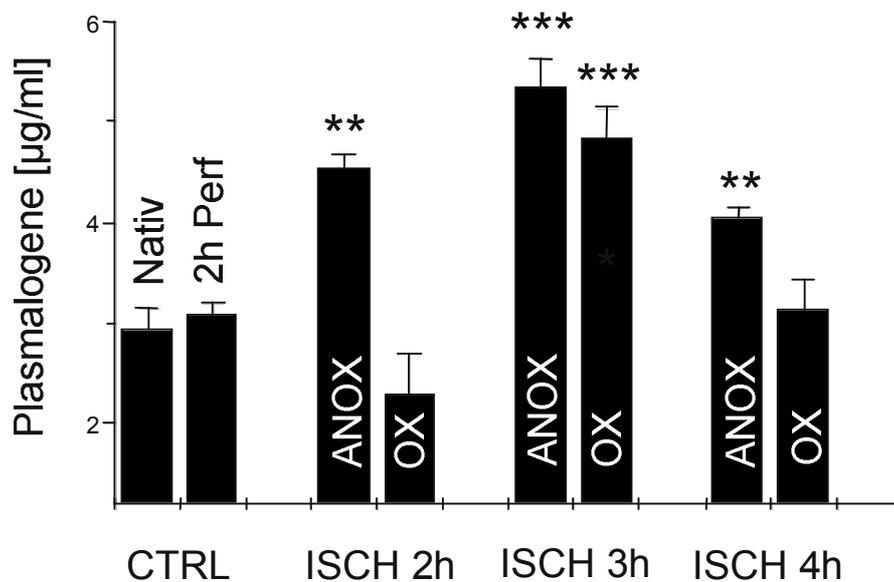


**Abbildung 14:** Konzentration von reduziertem Glutathion (GSH) in bronchoalveolärer Flüssigkeit un behandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundiert und normoxisch ventilierter Lungen (2h perf) und anoxisch (ANOX) und hyperoxisch (OX) ventilierter, ischämischer Lungen (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert±Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 verglichen mit un behandelten Kontrollen.

#### 4.2.4 Plasmalogene

Die Plasmalogenkonzentration lag in nativen Lungen durchschnittlich bei  $2,94 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$  und zeigte in hyperoxisch und normoxisch ventilierten, perfundierten Kontrollen keine signifikanten Änderungen (Abbildung 15 und Tabelle 9). Im Einzelnen lagen die Plasmalogenwerte in normoxisch ventilierten Kontrollen bei  $3,08 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$  (2 h),  $2,53 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$  (3 h), und  $2,34 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$  (4 h) und in hyperoxisch ventilierten Kontrollen bei  $2,31 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$  (2 h),  $2,93 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$  (3 h), und  $3,28 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$  (4 h). Unter ischämischen Bedingungen wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der Plasmalogenkonzentration sowohl in anoxisch als auch in hyperoxisch ventilierten Lungen

verzeichnet. Die Spitzenwerte wurden dabei nach drei Stunden beobachtet, fielen im weiteren Verlauf wieder ab und erreichten nach vier Stunden wieder Kontrollwerte (Abbildung 15).



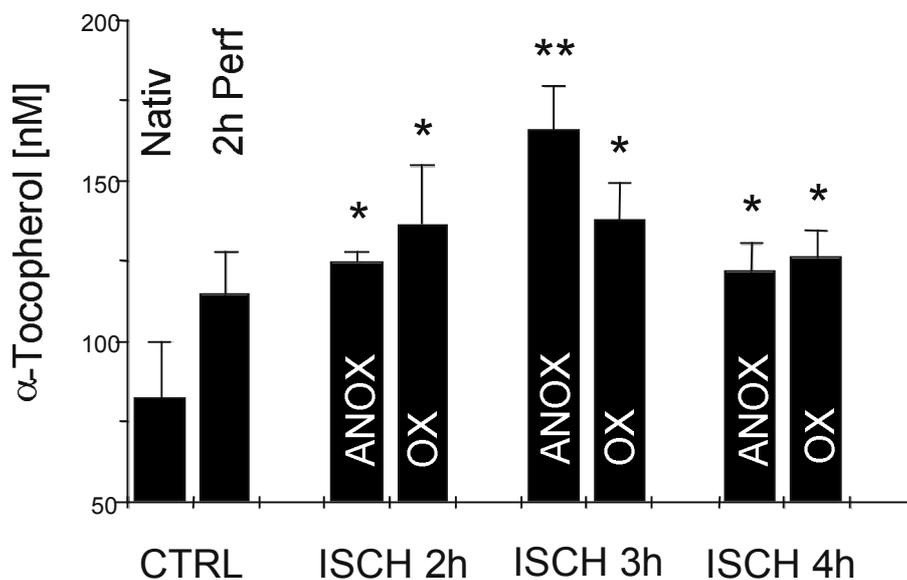
**Abbildung 15:** Relativer Gehalt von Plasmalogenen (1-O-alkenyl-2-acyl-phospholipids) in Phosphatidylcholin gewonnen aus bronchoalveolärer Lavage unbehandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundierter und normoxisch ventilierter Lungen (2h perf) und anoxisch (ANOX) und hyperoxisch (OX) ventilierter, ischämischer Lungen (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert±Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

#### 4.2.5 Alpha-Tocopherol

Ein Anstieg der von  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration (Vitamin E) wurde ebenfalls in den ischämischen Lungen bei anoxischer und hyperoxischer Ventilation beobachtet, mit Maximalwerten, die nach drei Stunden auftraten (Abbildung 16 und Tabelle 9). Verglichen mit den nativen Kontrollen ( $82,4 \pm 17,7$  nM) waren diese Veränderungen signifikant und auch im Vergleich mit normoxisch (2h:  $114,9 \pm 13,2$  nM; 3h:  $90,8 \pm 1,4$  nM; 4h:  $118,9 \pm 2,8$  nM)

und hyperoxisch (2h:  $100,3 \pm 0,2$  nM; 3h:  $95,9 \pm 0,9$  nM; 4h:  $117,3 \pm 20,2$  nM) ventilierten Kontrollen erhöht.

Jedoch waren die  $\alpha$ -Tocopherol-Werte in den hyperoxischen ischämischen Lungen verglichen mit den hyperoxischen Kontrollen nur geringfügig erhöht ( $p < 0,05$ ; Abbildung 16, Tabelle 9).

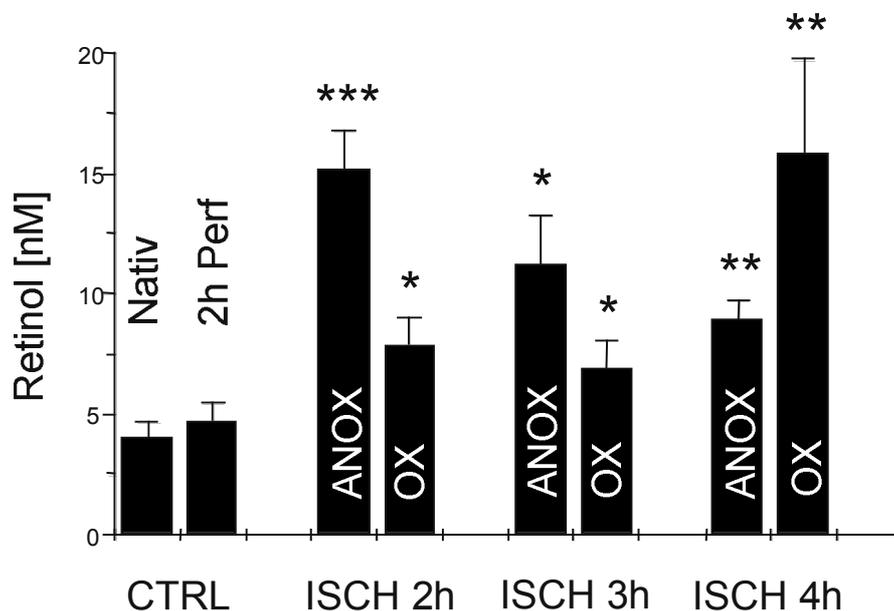


**Abbildung 16:** Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) in bronchoalveolärer Lavage un behandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundierter und normoxisch ventilierter Lungen (2h perfundiert) und anoxischer (anox) und hyperoxisch (ox) ventilierter ischämischer Lungen. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

#### 4.2.6 Retinol

Verglichen mit den nativen Lungen ( $4,0 \pm 0,6$  nM) änderte sich die Retinolkonzentration (Vitamin A) in der bronchoalveolären Lavage auch bei den normoxischen (2h:  $4,7 \pm 0,8$  nM; 4h:  $5,5 \pm 0,5$  nM) und hyperoxischen (2h:  $4,4 \pm 0,7$  nM; 4h:  $5,5 \pm 0,3$  nM) Kontrollen nicht.

Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg in den ischämischen Lungen während anoxischer Ventilation mit einem Maximalwert nach zwei Stunden ( $15,2 \pm 1,6$  nM;  $p < 0,001$ ). Interessanterweise stieg die Retinolkonzentration während hyperoxischer Ventilation über die vierstündige Versuchsdauer allmählich an und gipfelte vier Stunden nach Beginn der ischämischen Phase ( $15,9 \pm 3,9$  nM  $p < 0,01$ ; Abbildung 17, Tabelle 9).



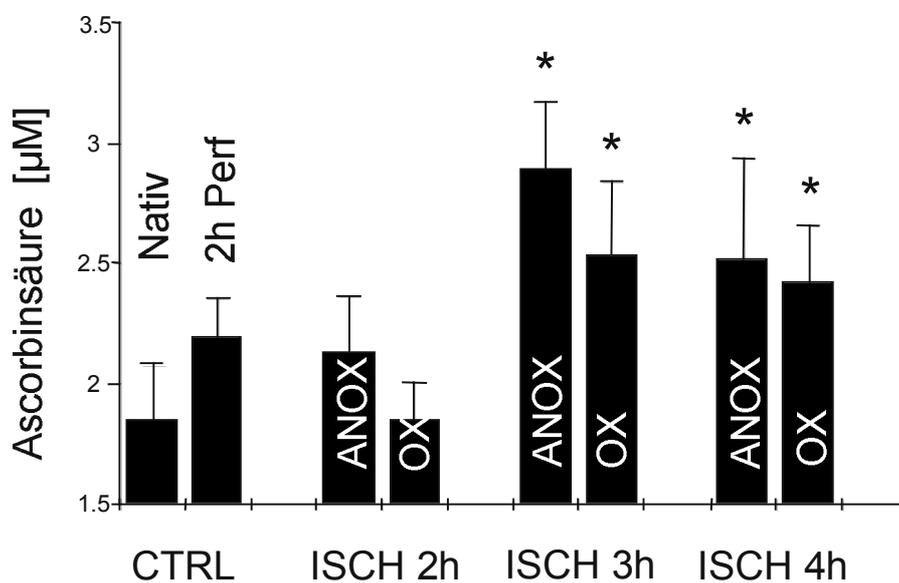
**Abbildung 17:** Konzentration von Retinol (Vitamin A) in bronchoalveolärer Lavage un behandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundierter und normoxisch ventilierter Lungen (2h perfundiert) und anoxischer (ANOX) und hyperoxisch (OX) ventilierter ischämischer Lungen (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich mit un behandelten Kontrollen.

#### 4.2.7 Ascorbinsäure

Native Kaninchenlungen zeigten Ascorbinsäurekonzentrationen von  $1,9 \pm 0,2$   $\mu$ M. Die Werte waren in allen normoxisch ventilerten, perfundierten Kontrollen und nach zwei und drei Stunden bei hyperoxisch ventilerten, perfundierten Kontrollen unverändert; jedoch

verminderte sich die Ascorbinsäurekonzentration bei den hyperoxisch ventilierten, perfundierten Kontrollen nach vier Stunden ( $0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,01$ ) verglichen mit den nativen Kontrollen.

Dagegen stiegen die Werte nach drei- und vierstündiger Ischämie sowohl unter anoxischer (3h:  $2,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ; 4h:  $2,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ) als auch unter hyperoxischer (3h:  $2,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ; 4h:  $2,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ) Ventilation leicht an (Abbildung 18, Tabelle 9).



**Abbildung 18:** Konzentration von Ascorbinsäure (Vitamin C) in bronchoalveolärer Lavage unbehandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundierter und normoxisch ventilierter Lungen (2h perf) und anoxisch (ANOX) und hyperoxisch (OX) ventilierter, ischämischer Lungen (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \* $p < 0,05$  verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

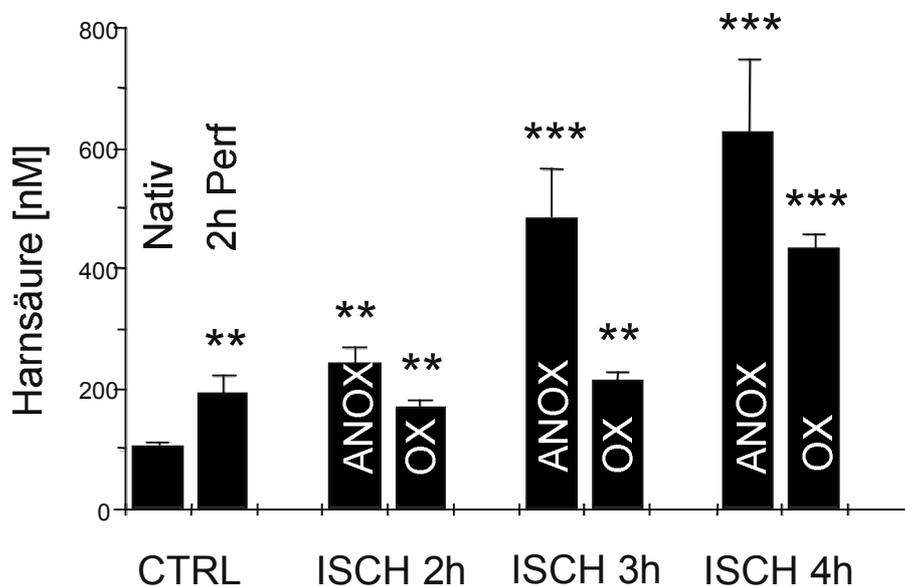
#### 4.2.8 Harnsäure

Die Harnsäurekonzentrationen lagen bei nativen Kontrollen durchschnittlich bei  $106 \pm 6 \text{ nM}$ .

Bei den normoxisch (2h:  $195 \pm 27 \text{ nM}$ ;  $p < 0,01$ ; 4h:  $214 \pm 3 \text{ nM}$ ;  $p < 0,01$ ) bzw. hyperoxisch (2h:  $166 \pm 30 \text{ nM}$ ;  $p < 0,05$ ; 4h:  $203 \pm 24 \text{ nM}$ ;  $p < 0,01$ ) ventilerten, perfundierten Kontrollen lagen diese Werte nahezu doppelt so hoch.

Anoxische Ischämie ergab einen signifikanten Anstieg nach drei ( $485 \pm 79$  nM;  $p < 0,001$ ) und nach vier Stunden ( $629 \pm 117$  nM;  $p < 0,001$ ) (Abbildung 19 und Tabelle 9).

Nach zwei- bis dreistündiger, hyperoxisch ventilierter Ischämie stiegen die Harnsäurekonzentrationen im Vergleich zu den nativen Lungen leicht an, blieben aber gegenüber normoxisch ventilierten, perfundierten Kontrollen unverändert. Nach vier Stunden konnte schließlich ein signifikanter Anstieg festgestellt werden ( $435 \pm 20$  nM;  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 19:** Konzentration von Harnsäure in bronchoalveolärer Lavage un behandelter Kontrollen (nativ), Puffer-perfundierter und normoxisch ventilierter Lungen (2h perf) und anoxisch (ANOX) und hyperoxisch (OX) ventilierter, ischämischer Lungen (ISCH). Alle Daten sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardfehler von jeweils 5-6 Versuchen. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  verglichen mit un behandelten Kontrollen.

### 4.3 Surfactantanalyse

Die Quantifikation der Gesamphospholipidkonzentration in der bronchoalveolären Lavage ergab nur geringfügige Veränderungen zwischen ischämischen Lungen und Kontrollen (Tabelle 10)

Hierzu passend zeigten nahezu alle anderen untersuchten Parameter, einschließlich der Phospholipidklassenprofile und der Surfactantproteine, nur geringe Veränderungen in Abhängigkeit von Ischämie oder dem Beatmungsmodus (Tabelle 10) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolllungen.

Im Gegensatz dazu war der Grad der Palmitoylierung von Phosphatidylcholin sowohl bei anoxisch als auch bei hyperoxisch ventilerten, ischämischen Lungen geringfügig reduziert und diese Verringerung stellte sich in der hyperoxisch ventilerten Gruppe als signifikant heraus ( $p < 0,01$  verglichen mit nativen Lungen nach vier Stunden) (Tabelle 10).

In Übereinstimmung mit den nur geringen Veränderungen in der biochemischen Komposition konnte in den Surfactantisolaten kein Verlust der biophysikalischen Aktivität festgestellt werden: Unter allen hier gewählten Versuchsbedingungen blieb die minimale Oberflächenspannung ( $\gamma_{\min}$ ) und die Adsorption ( $\gamma_{\text{ads}}$ ) unverändert zu gesunden Kontrolllungen (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Surfactantdaten

	n	PL [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Protein [ $\mu\text{g/ml}$ ]	PPQ	LSA [%]	PC [%]	PG [%]
Kontrolle unbehandelt	6	122 $\pm$ 10	611 $\pm$ 32	0,200 $\pm$ 0,007	65,5 $\pm$ 3,9	86,1 $\pm$ 0,9	6,8 $\pm$ 0,8
Kontrolle 2h perf. Normoxie	6	124 $\pm$ 5	619 $\pm$ 28	0,203 $\pm$ 0,010	58,4 $\pm$ 1,7	88,9 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,2
Kontrolle 3h perf. Normoxie	6	139 $\pm$ 4	574 $\pm$ 62	0,258 $\pm$ 0,030	73,5 $\pm$ 8,0	86,3 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4
Kontrolle 4h perf. Normoxie	6	118 $\pm$ 10	592 $\pm$ 27	0,197 $\pm$ 0,008	74,8 $\pm$ 3,6	86,2 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 0,8
Kontrolle 2h perf. Hyperoxie	5	123 $\pm$ 10	549 $\pm$ 56	0,236 $\pm$ 0,029	73,9 $\pm$ 2,8	83,3 $\pm$ 0,4 *	7,4 $\pm$ 0,4
Kontrolle 3h perf. Hyperoxie	5	135 $\pm$ 12	488 $\pm$ 69	0,312 $\pm$ 0,054	71,1 $\pm$ 5,4	86,9 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,1
Kontrolle 4h perf. Hyperoxie	5	158 $\pm$ 16* *	658 $\pm$ 82	0,323 $\pm$ 0,034**	69,9 $\pm$ 0,8	88,2 $\pm$ 0,3 *	5,4 $\pm$ 0,6
Ischämie 2h Anoxie	6	146 $\pm$ 5	492 $\pm$ 50	0,314 $\pm$ 0,036**	73,5 $\pm$ 2,8	87,6 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,5
Ischämie 3h Anoxie	5	123 $\pm$ 5	535 $\pm$ 16	0,230 $\pm$ 0,005*	62,2 $\pm$ 3,6	85,4 $\pm$ 0,7	6,2 $\pm$ 0,9
Ischämie 4h Anoxie	6	164 $\pm$ 4 **	594 $\pm$ 31	0,282 $\pm$ 0,021**	72,5 $\pm$ 2,6	89,4 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 0,5
Ischämie 2h Hyperoxie	5	116 $\pm$ 11	653 $\pm$ 4	0,178 $\pm$ 0,017	76,6 $\pm$ 1,2	85,9 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 0,8
Ischämie 3h Hyperoxie	6	159 $\pm$ 13	547 $\pm$ 18	0,293 $\pm$ 0,030	65,7 $\pm$ 1,1	87,8 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,3
Ischämie 4h Hyperoxie	6	125 $\pm$ 7	404 $\pm$ 59**	0,353 $\pm$ 0,058**	74,6 $\pm$ 4,6	84,4 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 1,1

	n	16:0 [% of PC FA]	Unsat. FA [% of PC FA]	$\gamma$ min [mN/m]	$\gamma$ ads [mN/m]	SP-B [ng/ml]	SP-C [ng/ml]
Kontrolle unbehandelt	6	65,3±0,8	29,9±0,8	1,5±0,2	24,9±0,5	1090±233	675±101
Kontrolle 2h perf. Normoxie	6	66,9±0,5	26,2±0,8	2,0±0,5	25,1±0,2	1263±42	776±10
Kontrolle 3h perf. Normoxie	6	64,4±1,1	25,2±0,7 **	1,4±0,7	25,1±1,0	1225±81	824±69
Kontrolle 4h perf. Normoxie	6	64,4±0,7	28,8±0,8	1,5±0,5	24,4±0,3	1307±147	825±77
Kontrolle 2h perf. Hyperoxie	5	66,3±1,0	22,6±0,6 **	2,0±0,6	26,3±1,1	1153±135	650±66
Kontrolle 3h perf. Hyperoxie	5	63,6±1,3	26,2±1,0	1,8±0,9	26,1±0,8	1276±73	615±71
Kontrolle 4h perf. Hyperoxie	5	60,9±0,8	30,8±1,2	0,8±1,5	25,0±0,8	1550±39	530±67
Ischämie 2h Anoxie	6	64,6±1,1	28,6±1,2	1,6±0,4	24,0±0,3	1327±22	557±76
Ischämie 3h Anoxie	5	62,4±1,8	30,2±0,5	3,1±1,0	25,6±0,7	1182±20	527±32
Ischämie 4h Anoxie	6	59,9±2,7	32,4±1,2	2,1±0,3	25,9±1,1	1625±165	547±65
Ischämie 2h Hyperoxie	5	65,9±0,8	28,2±0,7	1,4±0,5	23,1±0,2*	1372±72	821±74
Ischämie 3h Hyperoxie	6	66,6±0,4	27,4±1,2	2,0±0,7	24,4±0,5	1390±50	716±51
Ischämie 4h Hyperoxie	6	60,8±0,1 **	33,7±0,5 *	3,0±1,0	24,6±0,1	1235±53	715±137

Angegeben sind die Phospholipid und Proteinkonzentrationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL), das Phospholipid-Protein Verhältnis (PPQ), die relative Konzentration von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglycerol (in % aller PL), der relative Gehalt der *large surfactant aggregates* (LSA, in % aller Phospholipide), der relative Gehalt an Palmitinsäure (16:0) und an ungesättigten Fettsäuren (unsat. FA) in Prozent (w/w) aller Phosphatidylcholin Fettsäuren, die Konzentration der Surfactantproteine SP-B und SP-C und die minimale Oberflächenspannung ( $\gamma$  min) und die Adsorptionseigenschaften ( $\gamma$  ads) der LSA. Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$  verglichen mit nativen Kontrollen.

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, die antioxidative Kinetik und den oxidativen Stress im alveolären Kompartiment während hyperoxischer und anoxischer Ischämie zu charakterisieren. Das hier benutzte Lungenmodell war zu diesem Zweck besonders geeignet, da durch die Puffer-Perfusion der Lungen eine Kontamination mit Bestandteilen des rezirkulierenden Blutes, wie Redox-Komponenten und Neutrophilen, ausgeschlossen werden konnte. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass oxidativer Stress in ischämischen Lungen sowohl während hyperoxischer als auch während anoxischer Ventilation entsteht und dass unter beiden Beatmungsmodi eher ein Anstieg als ein Abfall der antioxidativen Komponenten im alveolären Kompartiment zu verzeichnen ist.

### 5.1 Oxidationsprodukte im alveolären Raum nach Ischämie

Ischämie mit anoxischer Ventilation ergab einen Anstieg des Oxidationsproduktes F<sub>2</sub>-Isoprostan, was, trotz Fehlen von Sauerstoff im Atemgas, auf eine angestiegene oxidative Belastung im alveolären Kompartiment hinweist.

Hyperoxische Ventilation ergab einen vielfachen Anstieg der GSSG- und F<sub>2</sub>-Isoprostan-Konzentration. Diese Daten stimmen gut mit einer älteren Studie von Fisher et al. [6] überein, die erhöhte Spiegel konjugierter Diene und Thiobarbitursäure-reaktiver-Substanzen (TBARS) im Lungengewebe nach Hyperoxie fand. Jedoch fanden dieselben Autoren unter anoxischer Ventilation keine Anstiege dieser Konzentrationen, was im Gegensatz zu unseren gewonnenen Daten steht.

Anstiege der GSSG-Konzentrationen wurden ebenso regelmäßig in verschiedenen akut entzündlichen und chronischen Lungenkrankheiten, wie z.B. ARDS [58] und Asthma bronchiale [59] beobachtet. F<sub>2</sub>-Isoprostane sind oxidantieninduzierte Abbauprodukte arachidonsäurehaltiger Phospholipide, die zuverlässig mittels Massenspektrometrie und ELISA Techniken gemessen werden können [60]. Wir haben dieses analytische Vorgehen wegen seiner hohen Sensitivität als Parameter der Lipidperoxidation gewählt und weil andere gewöhnlich verwendete Assays für Lipidperoxidation wie TBARS-Assays und HPLC-basierte Analysen langkettiger Aldehyde wegen möglicher Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen zu Fehlbestimmungen neigen. Becker et. al. [15] berichteten über erhöhte F<sub>2</sub>-Isoprostan-Gewebekonzentration nach 45-180 minütiger, hyperoxisch ventilierter Ischämie. Zusätzlich zeigten Patientenstudien, dass extrazelluläre F<sub>2</sub>-Isoprostan-Konzentrationen bei verschiedenen Lungenkrankheiten, wie ARDS [61] oder Asthma bronchiale [62], erhöht waren.

## **5.2 Alveoläre Antioxidantien während Ischämie**

Insgesamt wurden erhöhte Werte aller untersuchter, niedermolekularer Antioxidantien nach zwei- bis vierstündiger Ischämie, sowohl unter anoxischer als auch unter hyperoxischer Ventilation beobachtet. Die GSH-Konzentration, die maßgeblich die antioxidative Kapazität

im ELF bestimmt, war nach 3 h anoxischer Ventilation um das 4-fache erhöht. Überraschenderweise verursachte auch hyperoxische Ventilation eine bedeutende Zunahme des GSH. Das Gesamt-Glutathion (GSH + 2 \* GSSG) war sowohl in hyperoxisch als auch in anoxisch ventilerten Lungen im Vergleich zu nativen Kontrollen signifikant erhöht. Diese Daten stimmen mit vorhergegangenen Arbeiten überein, die zeigen, dass die GSH-Konzentration in der BAL bei Exposition gegenüber oxidativem Stress, wie Hyperoxie [63] oder Tabakrauchinhalation [64] und bei Patienten mit Asthma [65] erhöht ist. Diese Daten unterscheiden sich jedoch von den Ergebnissen, die in Patientenstudien mit ARDS [66], Asthma [67] und idiopathischer Lungenfibrose [68] gewonnen wurden, in denen eine Abnahme der GSH-Konzentration festgestellt wurde.

Neben GSH stellen Ascorbinsäure und Harnsäure die häufigsten Antioxidantien in der BAL dar und sind bevorzugte Ziele von Oxidantien wie zum Beispiel Stickstoffdioxid [69 und 70]. Im Gegensatz zu dem Menschen sind Kaninchen zur Synthese der Ascorbinsäure fähig, es ist aber nicht klar ob, und in welchem Ausmaß dies in der Lunge geschieht. Es ist weithin bekannt, dass Ischämie für den Abbau von ATP und die Anhäufung von Harnsäure als Produkt des Purinkatabolismus verantwortlich ist. Kaninchen können im Gegensatz zu Menschen Harnsäure in Allantoin und Harnstoff umwandeln, was die relative geringe Zunahme der Harnsäurekonzentration während Ischämie erklären könnte, die in unserer Studie beobachtet wurde. Plasmalogene und die lipophilen Antioxidantien Vitamin A und Vitamin E sind integrale Bestandteile des pulmonalen Surfactants und werden durch die alveolaren Typ II Zellen synthetisiert und abgesondert [71 und 72]. Wegen ihrer Vinyläthergruppe können Plasmalogene als starke Antioxidantien dienen [73 und 74]. Bisher ist, mit Ausnahme einer Studie von Rüdiger et al. [75], kein Zusammenhang zwischen alveolären Plasmalogenen und dem pathophysiologischen Zustand beschrieben worden. Die

Zunahme des relativen Plasmalogengehaltes könnte eine Änderung im Surfactantmetabolismus anzeigen.

Zusammengefasst weist die beobachtete Zunahme von GSSG und F2-Isoprostan während hyperoxischer Ventilation daraufhin, dass die Zunahme der Antioxidantien nicht ausreichend war, den Angriff von Oxidantien im alveolären Kompartiment abzuwehren, was zu schweren alveolären Schädigungen bei der darauf folgenden Reperfusion führen kann.

### **5.3 Regulation von Antioxidantien im alveolären Kompartiment, Rolle des Sauerstoffes**

Es ist bis jetzt weitgehend unbekannt, welcher Mechanismus die alveoläre antioxidative Antwort auf Ischämie vermittelt. Sowohl die zellulären Ursachen als auch die Regulation niedermolekularer Antioxidantien im alveolären Kompartiment sind bislang noch nicht systematisch untersucht worden. Es ist wahrscheinlich, dass alle Antioxidantien in den Lungenepithelzellen [5] synthetisiert werden, aber sowohl passiver als auch aktiver Transport vom vaskulären Kompartiment kann ebenso eine Rolle spielen. Da jedoch die Lungen, die in dieser Studie verwendet wurden, während des Versuchs durch die Puffer-Perfusion keinen Kontakt zu Blutbestandteilen hatten, ist ein signifikanter Einfluss von aus dem Blut stammenden Antioxidantien im Alveolarraum unwahrscheinlich. Diese Annahme wird dadurch weiter bestärkt, dass der kapilläre Filtrationskoeffizient in allen untersuchten Lungen normal war, bevor die Ischämie begonnen wurde und dass die BAL-Proteinwerte im aktuell gewählten Beobachtungszeitraum unverändert blieben. So konnte unter diesen Bedingungen eine Erhöhung der endothelialen und epithelialen Permeabilität ausgeschlossen werden. Zusätzlich hätte noch ein erhöhter Zellschaden und Zelltod im alveolären Raum mit konsekutiver Freisetzung intrazellulärer Antioxidantien auftreten können. Wir konnten jedoch keinen signifikanten Anstieg von Zell-Lysemarkern, wie zum Beispiel LDH, in der

bronchoalveolären Lavage feststellen, wodurch ein wesentlicher Einfluss über diesen Weg ausgeschlossen werden konnte. Zusammengefasst scheint eine erhöhte Freigabe und/oder Synthese die hier beschriebene Zunahme der alveolären Antioxidantien als Antwort auf Ischämie zu erklären.

Erhöhte inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen werden bei einer Vielzahl von Lungenkrankheiten wie ALI, ARDS, akuten Lungenverletzungen oder chronisch interstitiellen Lungenkrankheiten, wie etwa bei der idiopathischen Lungenfibrose, benötigt. Es ist bekannt, dass Hyperoxie eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite im Lungengewebe [76] verursacht. Andererseits ist Sauerstoff ein wichtiges metabolisches Substrat und dazu fähig, die Produktion von Antioxidantien in den alveolaren Typ II-Zellen zu induzieren. Es besteht allgemeine Übereinkunft darüber, dass die Antioxidantienkonzentration nach Ischämie und Reperfusion in Organen wie Myokard [77] und Gehirn [78] verringert ist. In der Lunge sind die Gegebenheiten jedoch etwas komplizierter, da wegen der Anwesenheit von Sauerstoff im alveolären Raum hier Ischämie nicht zwangsläufig Anoxie bedeutet. Im Gegensatz zu anderen Organen haben mehrere Studien über die erhöhten pulmonalen Antioxidantienniveaus nach Hyperoxie berichtet. Vorausgehende Exposition der Tiere gegenüber subletalem oxidativem Stress, einschließlich Ozon, Hypoxie und Hyperoxie, ergab erhöhte Antioxidantienniveaus [79, 80, 81 und 82] und Toleranz bei der darauf folgenden Hyperoxie [83]. Zusammengenommen können diese Erkenntnisse die Fähigkeit der Lunge zur Anpassung im Verlauf des oxidantieninduzierten Lungenschadens anzeigen.

Obleich beträchtliche Bemühung unternommen wurden die Regulation der Antioxidantien im alveolären Kompartiment, besonders des GSH [84 und 85], zu verstehen, sind die Mechanismen, die die GSH-Freisetzung auslösen, bislang nicht vollständig verstanden. GSH ist in erhöhten Mengen in bronchoalveolären Lavagen chronischer Raucher nachweisbar, was

auf eine beschleunigte Syntheserate, z.B. durch Hochregulation der  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase ( $\gamma$ -GCS), dem geschwindigkeitslimitierendem Enzym der GSH-Biosynthese, über oxidantienempfindliche Transkriptionsfaktoren wie Aktivatorprotein 1 (Ap-1) hinweist. Es wurde gezeigt, dass oxidativer Stress, der durch Hyperoxie verursacht wurde (95% O<sub>2</sub>), in den alveolaren Zellen Typ II zu einem schnellen, 2,5-fachen, Anstieg der intrazellulären GSH-Konzentration innerhalb der zweistündigen Exposition [86] führte. Zusätzlich nahm die Aktivität der  $\gamma$ -GCS um den Faktor 2,5 nach vierstündiger Exposition zu. Eine andere Arbeit ergab, dass die Exposition von Lungen gegenüber Oxidantien zu einer Hochregulation der  $\gamma$ -GCS-mRNA-Expression [87] führte. Es ist unseren Daten zufolge offensichtlich, dass der Anstieg der Antioxidantien, insbesondere der Plasmalogene, Harnsäure und Retinol, bei hyperoxisch ventilierter Ischämie verzögert stattfindet. Der Grund dafür könnte ein erhöhter Verbrauch sein.

#### **5.4 Pulmonaler Surfactant**

Unter den hier verwendeten Bedingungen (2-4 h warme Ischämie) wurden nur geringfügige Veränderungen der biochemischen Surfactantzusammensetzung und der biophysikalischen Funktion beobachtet. Dieses steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Veldhuizen et al. [30], die keine signifikanten Veränderungen des Surfactants nach zwei Stunden, jedoch nach zwölf Stunden kalter Ischämie fanden, was zeigt, dass das Auftreten von Surfactantveränderungen von der Dauer der Ischämie abhängig ist. Demgegenüber konnten wir keine signifikanten Veränderungen im Surfactantsystem bei 24-stündiger kalter Ischämie [31] feststellen. Ein morphometrisches Herangehen von Ochs et al. [29] ergab, dass Surfactantveränderungen nach Ischämie-Reperfusion nicht vornehmlich durch eine Durchlässigkeit von Plasmabestandteilen verursacht werden, dass sie aber stattdessen für eine erhöhte alveolär-kapilläre Durchlässigkeit verantwortlich seien. Somit wurde die wichtige

Rolle des Surfactantsystems innerhalb der durch Ischämie-Reperfusion verursachten Lungenschädigungen unterstrichen. In der vorliegenden Untersuchung fanden wir eine signifikante Verringerung des Palmitinsäuregehaltes des Phosphatidylcholins und eine kompensatorische Zunahme anderer ungesättigter Fettsäuren besonders nach vierstündiger, hyperoxischer Ventilation ischämischer Lungen, aber auch bei anoxischer Ventilation. In einem Tiermodell, in dem der linke Lungenflügel von Hunden transplantiert wurde, fanden wir einen drastischen Verlust der Palmitinsäureanteile des Phosphatidylcholins nach 24 h kalter Ischämie und 12 h Reperfusion [31]. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, dass die Phosphatidylcholinbiosynthese, insbesondere die Palmitinsäureaufnahme in Phosphatidylcholin, in den alveolaren Typ II Zellen unter oxidativem Stress beeinträchtigt ist [34, 88 und 89]. Es wurde nicht nur herausgefunden, dass die Verringerung des relativen Anteils der Palmitinsäure des Phosphatidylcholins und die begleitende Zunahme ungesättigter Fettsäuren allgemeine Eigenschaften sowohl bei Patienten mit ARDS und schwerer Pneumonie [90] als auch – in geringerem Ausmaß - bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose [91] sind, sondern dass die Abnahme der Palmitinsäure direkt mit der Zunahme der minimalen Oberflächenspannungswerte der large surfactant aggregates (LSA) und der Abnahme der Compliance bei diesen Patienten verbunden ist. In der vorliegenden Studie war die Abnahme der Palmitoylierung des Phosphatidylcholins allerdings zu schwach ausgeprägt, um eine Beeinträchtigung der biophysikalischen Aktivität des Surfactants zu verursachen.

## 6 Zusammenfassung

Die Zunahme freier Radikale scheint eine zentrale Rolle in der Entstehung des pulmonalen Ischämie-Reperfusionsschadens zu spielen, in dem sie zu einer endothelialen-alveolären Schrankenstörung und negativen Beeinflussung des pulmonalen Surfactant führt. Die Fortsetzung der Ventilation während Ischämie bewirkt einen signifikanten Schutz vor Ischämie-Reperfusionsschäden. Die Auswirkung der alveolären Sauerstoffversorgung auf die Lungenschädigung und die Entstehung freier Radikale während der Ischämie war jedoch noch weitestgehend unklar.

Wir untersuchten den Einfluss von hyperoxischer und anoxischer Ventilation auf den alveolären antioxidativen Status (Konzentrationen von GSSG, GSH, F<sub>2</sub>-Isoprostan, Plasmalogenen, den Vitaminen A, C, E und Harnsäure) und die Surfactanteigenschaften (Gesamtphospholipidkonzentration, Phospholipidklassenprofile und Surfactant Apoproteine) während Ischämie in isolierten Kaninchenlungen. Als Kontrollen dienten normoxisch und hyperoxisch ventilierte perfundierte Lungen und native Lungen.

Die biochemischen und biophysikalischen Surfactant-Eigenschaften veränderten sich unter den gewählten Versuchsbedingungen nur geringgradig bzw. gar nicht. Marker für oxidativen Stress (GSSG und 8-Isoprostan) waren insbesondere bei hyperoxischer Ischämie signifikant erhöht. Sowohl unter anoxischer als auch unter hyperoxischer Ischämie fand sich eine teilweise signifikante Erhöhung der Antioxidantien, die besonders nach 3h (Anoxie) bzw. 4h (Hyperoxie) ausgeprägt war.

Der alveoläre antioxidative Status war sowohl während anoxischer als auch während hyperoxischer ventilierter warmer Ischämie erhöht. Ursache hierfür könnte eine adaptive Antwort auf oxidativen Stress während der Ischämiephase sein.

Sowohl in den anoxisch als auch in den hyperoxisch ventilerten ischämischen Lungen, wurden Indikatoren für erhöhten oxidativen Stress im alveolären lining fluid gemessen. Interessanterweise stiegen die alveolären Konzentrationen sowohl von hydrophilen als auch lipophilen Antioxidantien eher an, anstatt unter diese Bedingungen abzusinken. Die Signalübertragungswege, die dieser alveolären antioxidativen Antwort zugrunde liegen bedürfen weiterer Erklärung.

## Summary

Increases in free radicals are believed to play a central role in the development of pulmonary ischemia/reperfusion (I-R) injury, leading to microvascular leakage and deterioration of pulmonary surfactant. Continued ventilation during ischemia offers significant protection against I-R injury, but the impact of alveolar oxygen supply both on lung injury and on radical generation is still unclear. We investigated the influence of hyperoxic and anoxic ventilation during ischemia on alveolar antioxidant status and surfactant properties in isolated rabbit lungs. Normoxic and hyperoxic ventilated, buffer-perfused lungs and native lungs served as controls. As compared with controls, biophysical and biochemical surfactant properties were not altered in anoxic as well as hyperoxic ventilated ischemic (2, 3, and 4 h) lungs. Assessment of several antioxidants (reduced glutathione (GSH),  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E), retinol (vitamin A), ascorbic acid (vitamin C), uric acid, and plasmalogens (1-O-alkenyl-2-acyl-phospholipids)) in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) revealed a significant increase in antioxidant compounds under anoxic and hyperoxic ventilation, with maximum levels occurring after 3 h of ischemia.

We conclude that oxidative stress is increased in the lung alveolar lining layer during ischemia, during both anoxic and hyperoxic ventilation. This is paralleled by an increase rather than a decrease in alveolar antioxidant levels, suggested to reflect an adaptive response to oxidative stress during ischemia.

## **Anmerkungen**

Teile der vorliegende Studie wurde in *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 36, No. 1, pp. 78-89, 2004, Copyright 2003 Elsevier Inc. veröffentlicht.

Diese Studie wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 547) unterstützt.

## 7 Literatur

1. Neergaard K. v.. Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamte Exp Med*, 1929: **66**: 373-394.
2. Clements J. A.. Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957: **95**: 170-172.
3. Pattle R. E.. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature (Lond)*, 1955: **175**: 1125-1126.
4. Putman, E., Golde v., G. L. M., Haagsman, P. H.. Toxic oxidant species and their impact on the pulmonary surfactant system. *Lung*, 1997: **175**: 75-103.
5. Hefner, E. J., Repine, E. J.. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*, 1989: **140**: 531-554.
6. Fisher, A. B.; Dodia, C.; Tan, Z.; Ayene, I.; Eckenhoff, R. G. Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J. Clin. Invest.* 1991: **88**: 674-679.
7. Matot, I.; Manevich, Y.; Al-Mehdi, A. B.; Song, C.; Fisher, A. B. Fluorescence imaging of lipid peroxidation in isolated rat lungs during nonhypoxic lung ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2003: **15**: 785-790.
8. Pacht E. R., DeMichele S. J., Nelson J. L., Hart J., Wennberg A. K., Gadek J. E. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 2003: **31**: 491-500.
9. Williams, A.; Riise, G. C.; Anderson, B. A.; Kjellstrom, C.; Schersten, H.; Kelly, F. J. Compromised antioxidant status and persistent oxidative stress in lung transplant recipients. *Free Radic. Res.* 1999: **30**: 383-393.
10. Matot, I.; Manevich, Y.; Al-Mehdi, A. B.; Song, C.; Fisher, A. B. Fluorescence imaging of lipid peroxidation in isolated rat lungs during nonhypoxic lung ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 2003: **15**: 785-790.
11. Kennedy, P. T.; Rao, V. N.; Hopkins, C.; Pennington, L.; Tolley, E.; Hoidal, R. J. Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J. Clin. Invest.* 1989: **83**: 1326-1335.

12. Inci, I.; Inci, D.; Dutly, A.; Boehler, A.; Weder, W. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* 2002; **73**: 220-225.
13. Kozower, B. D.; Christofidou-Solomidou, M.; Sweitzer, T. D.; Muro, S.; Buerk, D. G.; Solomides, C. C.; Albelda, S. M.; Patterson, G. A.; Muzykantov, V. R. Immunotargeting of catalase to the pulmonary endothelium alleviates oxidative stress and reduces acute lung transplantation injury. *Nat. Biotechnol.* 2003; **21**: 392-398.
14. Fisher, A. B.; Dodia, C.; Tan, Z.; Ayene, I.; Eckenhoff, R. G. Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J. Clin. Invest.* 1991; **88**: 674-679.
15. Becker, P. M.; Sanders, S. P.; Price, P.; Christman, B. W. F<sub>2</sub>-isoprostane generation in isolated ferret lungs after oxidant injury or ventilated ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; **25**: 703-711.
16. Akashi, A.; Nakahara, K.; Kamiike, W.; Matsumura, A.; Hatanaka, N.; Kawashima, Y.; Yoshida, Y.; Tagawa, K. Attenuation of warm ischemic injury of rat lung by inflation with room air - assessment of cellular components and the surfactant in the bronchoalveolar lavage fluid in relation to changes in cellular adenosine triphosphate. *Transplantation* 1993; **55**: 24-30.
17. Minamiya, Y.; Tozawa, K.; Kitamura, M.; Saito, S.; Ogawa, J. Platelet-activating factor mediates intercellular adhesion molecule-1-dependent radical production in the nonhypoxic ischemia rat lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998; **19**: 150-157.
18. Sanders, S. P.; Bassett, D. J.; Harrison, S. J.; Pearse, D.; Zweier, J. L.; Becker, P. M. Measurements of free radicals in isolated, ischemic lungs and lung mitochondria. *Lung* 2000; **178**: 105-118.
19. Schutte, H.; Lockinger, A.; Seeger, W.; Grimminger, F. Aerosolized PGE<sub>1</sub>, PGI<sub>2</sub> and nitroprusside protect against vascular leakage in lung ischaemia-reperfusion. *Eur. Respir. J.* 2001; **18**: 15-22.
20. Hohlfeld, J. M.; Struber, M.; Ahlf, K.; Hoeper, M. M.; Fraund, S.; Krug, N.; Warnecke, G.; Harringer, W.; Haverich, A.; Fabel, H. Exogenous surfactant improves survival and surfactant function in ischaemia-reperfusion injury in minipigs. *Eur. Respir. J.* 1999; **13**: 1037-1043.

21. Featherstone, R. L.; Chambers, D. J.; Kelly, F. J. Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; **69**: 237-242.
22. Friedrich, I.; Spillner, J.; Lu, E. X.; Bartling, B.; Barnscheid, M.; Sablotzki, A.; Schade, U.; Reidemeister, J. C.; Silber, R. E.; Gunther, A.; Borgermann, J. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model. *J. Heart Lung Transplant.* 2001; **20**: 985-959.
23. Schutte, H.; Hermle, G.; Seeger, W.; Grimminger, F. Vascular distension and continued ventilation are protective in lung ischemia / reperfusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; **157**: 171-177.
24. Okuda, M.; Furuhashi, K.; Nakai, Y.; Muneyuki, M. Decrease of ischemia-reperfusion related lung oedema by continuous ventilation and allopurinol in rat perfusion model. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1993; **53**: 625-631.
25. Hamvas, A.; Park, C. K.; Palazzo, R.; Liptay, M.; Cooper, J.; Schuster, D. P. Modifying pulmonary ischemia-reperfusion injury by altering ventilatory strategies during ischemia. *J. Appl. Physiol.* 1992; **73**: 2112-2119.
26. Fisher, W. P.; Huang, T. Y.; Kennedy, P. T.; Piantadosi, A. PO<sub>2</sub>-dependent hydroxyl radical production during ischemia-reperfusion lung injury. *Am. J. Physiol.* 1993; **265**: L279-L285.
27. Zhao, G.; al-Mehdi, A. B.; Fisher, A. B. Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.* 1997; **273**: L1112-L1117.
28. Haddad, J. J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir. Res.* 2002; **3**: 1-27.
29. Ochs, M.; Nenadic, I.; Fehrenbach, A.; Albes, J. M.; Wahlers, T.; Richter, J.; Fehrenbach H. Ultrastructural alterations in intraalveolar surfactant subtypes after experimental ischemia and reperfusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; **160**: 718-724.
30. Veldhuizen, R. A.; Lee, J.; Sandler, D.; Hull, W.; Whitsett, J. A.; Lewis, J. F.; Possmayer, F.; Novick, R. J. Alteration in pulmonary surfactant composition and activity after experimental lung transplantation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; **148**: 208-215.

31. Gunther, A.; Balsler, M.; Schmidt, R.; Markart, P.; Olk, A.; Borgermann, J.; Splittgerber, F.; Seeger, W.; Friedrich, I. Surfactant abnormalities after single lung transplantation in dogs - impact of bronchoscopic surfactant administration. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004; **127**: 344-54..
32. Gilliard, N.; Heldt, G. P.; Lored, J.; Redl, H.; Merritt, T. A.; Spragg, R. G. Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. *J. Clin. Invest.* 1994; **93**: 2608-2615.
33. Seeger, W.; Lepper, H.; Wolf, D. H.; Neuhof, H. Alteration of alveolar surfactant function after exposure to oxidative stress and to oxygenated and native arachidonic acid in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; **835**: 58-67.
34. Guthmann, F.; Kolleck, I.; Schachtrup, C.; Schlame, M.; Spener, F.; Rustow, B. Vitamin E deficiency reduces surfactant lipid biosynthesis in alveolar type II cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; **34**: 663-673.
35. Kelly, F. J.; Buhl, R.; Sandstrom, T. Measurement of antioxidants, oxidants and oxidation products in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur. Respir. Rev.* 1999; **9:66**: 93-98.
36. Kelly, F. J.; Mudway, I.; Blomberg, A.; Frew, A.; Sandstrom, T. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* 1999; **354**: 482-483.
37. Slade, R.; Crissman, K.; Norwood J.; Hatch G. Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats. *Exp. Lung Res.* 1993; **19**: 469-484.
38. Van der Vliet, A.; O'Neill, C. A.; Cross, C. E.; Koosra, J. M.; Volz, W. G.; Halliwell, B.; Louie, S. Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *Am. J. Physiol.* 1999; **276**: L289-L296.
39. Roch-Ramel, F.; Peters, G. Urinary excretion of uric acid in non-human mammalian species. In: Kelley, W. N.; Weimer, I. M., eds. *Handbook of experimental pharmacology, Vol. 51, Uric acid*; Berlin: Springer; 1978.
40. Wright J. R., Clements J. A.. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis*, 1987; **136**: 426-444.
41. Corbet A., Bedi H., Owens M., Tausch W.. Surfactant protein-A inhibits lavage-induced surfactant secretion in newborn rabbits. *Am J Med Sci*, 1992; **304**: 246-251.

42. King, R. J.: Isolation and chemical composition of pulmonary surfactant. In: Robertson, B. et al.: Pulmonary Surfactant. Elsevier, 1984, 1-15
43. Davis, J. M.; Veness-Meehan, K.; Notter, R. H.; Bhutani, V. K.; Kendig, J. W.; Shapiro, D. L.: Changes in pulmonary mechanics after the administration of surfactant to infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1988; **319**: 476-9[JS1]
44. Merritt, T. A.; Hallman, M.; Bloom, B. T.; Berry, C.; Benirschke, K.; Sahn, D.; Key, T.; Edwards, D.; Jarvenpaa, A. L.; Pohjavuori, M.; I, a.: Prophylactic treatment of very premature infants with human surfactant. *N Engl J Med* 315 (1986), S. 785-90
45. Becker, B. F.. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*, 1993; **14**: 615-631.
46. Becker B. F., Reinholz N., Leipert B., Raschke P., Permanetter B., Gerlach E.. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest*, 1991; **100**: 176S-181S.
47. Rahman I., MacNee W.. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation.. *Eur Respir J*, 2000; **16**: 534-554.
48. Zoeller R. A., Morand O. H., Raetz C. R. H.. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem*, 1988; **263**: 11590-11596.
49. Morand O. H., Zoeller R. A., Raetz C. R. H.. Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *J Biol Chem*, 1988; **263**: 11597-11606.
50. Sindelar P. J., Guan Z., Dallner G., Ernster L.. The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, 1999; **26**: 318-324.
51. Bligh E. G., Dyer W. J.. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959; **37**: 911-917.
52. Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A.. Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 1970; **5**: 494-496.
53. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C.. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985; **150**: 76-85.

54. Tietze F.. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 1969: **27**: 502-522.
55. Baker M. A., Cerniglia G. J., Zaman A.. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem*, 1990: **190**: 360-365.
56. Catignani G. L., Bieri J. G.. Simultaneous determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem*, 1983: **29**: 708-712.
57. Iriyama K., Yoshiura M., Iwamoto T., Ozaki Y.. Simultaneous determination of uric and ascorbic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem*, 1984: **141**: 238-243.
58. Bunnell, E.; Pacht, E. R. Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**: 1174-1178; 1993.
59. Kelly, F. J.; Mudway, I.; Blomberg, A.; Frew, A.; Sandstrom, T. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* **354**: 482-483; 1999.
60. Proudfoot, J.; Barden, A.; Mori, T. A.; Burke, V.; Croft, K. D.; Beilin, L. J.; Puddey, I. B. Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation-A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **272**: 209-215; 1999.
61. Carpenter, C. T.; Price, P. V.; Christman, B. W. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* **114**: 1653-1659; 1998.
62. Montuschi, P.; Corradi, M.; Ciabattoni, G.; Nightingale, J.; Kharitonov, S. A.; Barnes, P. J. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**: 216-220; 1999.
63. Jenkinson, S. G.; Black, R. D.; Lawrence, R. A. Glutathione concentrations in rat lung bronchoalveolar lavage fluid: effects of hyperoxia. *J. Lab. Clin. Med.* **112**: 345-351;
64. Cantin, A. M.; North, S. L.; Hubbard, R. C.; Crystal, R. G. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J. Appl. Physiol.* **63**: 152-157; 1987.

65. Smith, L. J.; Houston, M.; Anderson, J. Increased levels of glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 1461-1464; 1993.
66. Pacht, E. R.; Timerman, A. P.; Lykens, M. G.; Merola, A. J. Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* **100**: 1397-1403; 1991.
67. Kelly, F. J.; Mudway, I.; Blomberg, A.; Frew, A.; Sandstrom, T. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet* **354**: 482-483; 1999.
68. Rahman, I.; Skwarska, E.; Henry, M.; Davis, M.; O'Connor, C. M.; FitzGerald, M. X.; Greening, A.; MacNee, W. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 60-68; 1999.
69. Kelly, F. J.; Blomberg, A.; Frew, A.; Holgate, S. T.; Sandstrom, T. Antioxidant kinetics in lung lavage fluid following exposure of humans to nitrogen dioxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**: 1700-1705; 1996.
70. Kelly, F. J.; Tetley, T. D. Nitrogen dioxide depletes uric acid and ascorbic acid but not glutathione from lung lining fluid. *Biochem. J.* **325**: 95-99; 1997.
71. Rana, F. R.; Harwood, J. S.; Mautone, A. J.; Dluhy, R. A. Identification of phosphocholine plasmalogen as a lipid component in mammalian pulmonary surfactant using high-resolution <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy. *Biochemistry* **32**: 27-31; 1993.
72. Rustow, B.; Kolleck, I.; Guthmann, F.; Haupt, R.; Kunze, D.; Stevens, P. Synthesis and secretion of plasmalogens by type-II pneumocytes. *Biochem. J.* **302**: 665-668; 1994.
73. Zoeller, R. A.; Morand, O. H.; Raetz, C. R. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J. Biol. Chem.* **263**: 11590-11596; 1988.
74. Sindelar, P. J.; Guan, Z.; Dallner, G.; Ernster, L. The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 318-324; 1999.
75. Rudiger, M.; von Baehr, A.; Haupt, R.; Wauer, R. R.; Rustow, B. Preterm infants with high polyunsaturated fatty acid and plasmalogen content in tracheal aspirates develop bronchopulmonary dysplasia less often. *Crit. Care Med.* **28**: 1572-1577; 2000.

76. Freeman, B. A.; Crapo, J. D. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* **256**: 10986-10992; 1981.
77. Haramaki, N.; Stewart, D. B.; Aggarwal, S.; Ikeda, H.; Reznick, A. Z.; Packer, L. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* **25**: 329-339; 1998.
78. Sato, P. H.; Hall, E. D. Tirilazad mesylate protects vitamins C and E in brain ischemia-reperfusion injury. *J. Neurochem.* **58**: 2263-2268; 1992.
79. Kodavanti, U. P.; Costa, D. L.; Dreher, K. L.; Crissman, K.; Hatch, G. E. Ozone-induced tissue injury and changes in antioxidant homeostasis in normal and ascorbate-deficient guinea pigs. *Biochem. Pharmacol.* **17**: 243-251; 1995.
80. Jackson, R. M.; Frank, L. Ozone-induced tolerance to hyperoxia in rats. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**: 425-429; 1984.
81. Clerch, L. B.; Massaro, D. Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. *J. Clin. Invest.* **91**: 499-508; 1993.
82. Vento, G.; Mele, M. C.; Mordente, A.; Romagnoli, C.; Matassa, P. G.; Zecca E.; Zappacosta, B.; Persichilli, S. High total antioxidant activity and uric acid in tracheobronchial aspirate fluid of preterm infants during oxidative stress: an adaptive response to hyperoxia? *Acta Paediatr.* **89**: 336-342; 2000.
83. Baker, R. R.; Holm, B. A.; Panus, P. C.; Matalon, S. Development of O<sub>2</sub> tolerance in rabbits with no increase in antioxidant enzymes. *J. Appl. Physiol.* **66**: 1679-1684; 1989.
84. Haddad J. J. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. *Cell. Signal.* **14**: 799-810; 2002.
85. Rahman, I.; Bel, A.; Mulier, B.; Donaldson, K.; MacNee, W. Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **275**: L80-L86; 1998.
86. Rahman, I.; MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* **16**: 534-554; 2000.
87. Rahman, I.; Bel, A.; Mulier, B.; Lawson, M. F.; Harrison, D. J.; MacNee, W.; Smith, C. A. Transcriptional regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit by oxidants in human alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**: 832-837; 1996.

88. Crim, C.; Simon, R. H. Effects of oxygen metabolites on rat alveolar type II cell viability and surfactant metabolism. *Lab. Invest.* **58**: 428-437; 1988.
89. Haagsmann, H. P.; Schuurmans, E. A.; Batenburg, J. J.; Van Golde, L. M. Synthesis of phosphatidylcholine in ozone-exposed alveolar type II cells isolated from adult rat lung. Is glycerolphosphate acyltransferase a rate-limiting enzyme? *Exp. Lung Res.* **14**: 1-17; 1988.
90. Schmidt, R.; Meier, U.; Yabut-Perez, M.; Walmrath, D.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Gunther, A. Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and severe pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**: 95-100; 2001.
91. Schmidt, R.; Meier, U.; Markart, P.; Grimminger, F.; Velcovsky, H. G.; Morr, H.; Seeger, W.; Gunther, A. Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. *Am. J. Physiol.* **283**: L1079-L1085; 2002.
92. Crystal, R. G.; West, J. B. et al.: *The Lung Bd.* 3.1.10. Raven Press, 1991, S. 247-261
93. Hamm, H.; Fabel, H.; Bartsch, W.: The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. *Clin Invest* 70 (1992), S. 637-657
94. Haagsman, H. P.; van Golde, L. M.: Synthesis and assembly of lung surfactant. *Ann Rev Physiol* 53 (1991), S. 441-64
95. Harwood, J. L.: Lung surfactant. *Prog Lipid Res* 26 (1987), S. 211-56
96. Günther, A.; Schmidt, R.; Feustel, A.; Meier, U.; Pucker, C.; Ermert, M.; Seeger, W.: Surfactant subtype conversion is related to loss of surfactant apoprotein B and surface activity in the large surfactant aggregates - experimental and clinical studies. *Am J Respir Crit Care Med* 159 (1999), S. 244-251
97. Magoon, M. W.; Wright, J. R.; Baritussio, A.; Williams, M. C.; Goerke, J.; Benson, B. J.; Hamilton, R. L.; Clements, J. A.: Subfractionation of lung surfactant. *Biochim Biophys Acta* 750 (1983), S. 18-31
98. Post, M.; Batenburg, J. J.; Schuurmans, E. A. J. M.; Laros, C. D.; van Golde, L. M. G.: Lamellar bodies isolated from human lung tissue. *Exp Lung Res* 3 (1982), S. 17-28
99. Wright, J. R.; Benson, B. J.; Williams, M. C.; Goerke, J.; Clements, J. A.: Protein composition of rabbit alveolar surfactant subfractions. *Biochim Biophys Acta* 791 (1984), S. 320-32

100. Shelley, S. A.; Balis, J. U.; Paciga, J. E.; Espinoza, C. G.; Richman, A. V.: Biochemical composition of adult human lung surfactant. *Lung* 160 (1982), S. 195-206
101. Batenburg, J. J.: The phosphatidylcholine-lysophosphatidylcholine cycle. In: Farrell, P. M.: Lung Development: Biological and Clinical Perspectives. Bd. Vol 1. Academic Press, 1982, S. 359-390
102. Possmayer, F.: A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 138 (1988), S. 990-998
103. Hawgood, S.: Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am J Physiol* 257 (1989), S. L13-L22
104. Beers, M. F.; Bates, S. R.; Fisher, A. B.: Differential extraction for the rapid purification of bovine surfactant protein B. *Am J Physiol* 262 (1992), S. L773-8
105. Griese, M.: Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 13 (1999), S. 1455-1476
106. Van Golde, L. M. G.; Batenburg, J. J.; Robertson, B.: The pulmonary surfactant system. *NIPS* 9 (1994), S. 13-20
107. Persson, A.; Chang, D.; Rust, K.; Moxley, M.; Longmore, W.; Crouch, E.: Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry* 28 (1989), S. 6361-6367
108. Chevalier, G.; Collet, A. J.: In vivo incorporation of choline-3H, leucine-3H and galactose-3H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat Rec* 174 (1972), S. 289-310
109. Rooney, S. A.; Page-Roberts, B. A.; Motoyama, E. K.: Role of lamellar inclusions in surfactant production: studies on phospholipid composition and biosynthesis in rat and rabbit lung subcellular fractions. *J Lipid Res* 16 (1975), S. 418-425
110. Hallmann, M.; Gluck, L.: Phosphatidylglycerol in lung surfactant. II. Subcellular distribution and mechanism of biosynthesis in vitro. *Biochim Biophys Acta* 409 (1975), S. 172-191
111. Massaro, G. D.; Massaro, D.: Granular pneumocytes. Electron microscopic radioautographic evidence of intracellular protein transport. *Am Rev Respir Dis* 105 (1972), S. 927-931
112. Idell, S.; James, K. K.; Levin, E. G.; Schwartz, B. S.; Manchanda, N.; Maunder, R. J.; R., T.; Martin; McLarty, J.; S., D.; Fair, .: Local abnormalities in coagulation

- and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 84 (1989), S. 695-705
113. Wright, J. R.; Clements, J. A.: Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 136 (1987), S. 426-444
  114. Hawgood, S.; Clements, J. A.: Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* 86 (1990), S. 1-6
  115. Chander, A.; Johnson, R. G.; Reicherter, J.; Fisher, A. B.: Lung lamellar bodies maintain an acidic internal pH. *J Biol Chem* 261 (1986), S. 6126-6131
  116. Wright, J. R.; Wager, R. E.; Hamilton, R. L.; Huang, M.; Clements, J. A.: Uptake of lung surfactant subfractions into lamellar bodies of adult rabbit lungs. *J Appl Physiol* E60 (1986), S. 817-825
  117. Voorhout, W. F.; Veenendaal, T.; Haagsman, H. P.; Verkleij, A. J.; van Golde, L. M.; Geuze, H. J.: Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *J Histochem Cytochem* 39 (1991), S. 1331-6
  118. Williams, M. C.; Hawgood, S.; Hamilton, R. L.: Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5 (1991), S. 41-50
  119. Poulain, F. R.; Allen, L.; Williams, M. C.; Hamilton, R. L.; Hawgood, S.: Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation. *Am J Physiol* 262 (1992), S. L730-9
  120. Suzuki, Y.; Fujita, Y.; Kogishi, K.: Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis* 140 (1989), S. 75-81
  121. Gross, N. J.; Narine, K. R.: Surfactant subtypes in mice: characterization and quantitation. *J Appl Physiol* 66 (1989), S. 342-9
  122. Lewis, J. F.; Ikegami, M.; Jobe, A. H.: Metabolism of exogenously administered surfactant in the acutely injured lungs of adult rabbits. *Am Rev Respir Dis* 145 (1992), S. 19-23
  123. Higuchi, R.; Lewis, J.; Ikegami, M.: In vitro conversion of surfactant subtypes is altered in alveolar surfactant isolated from injured lungs. *Am Rev Respir Dis* 145 (1992), S. 1416-20
  124. Ikegami, M.; Jobe, A.; Yamada, T.; Priestly, A.; Ruffini, L.; Rider, E.; Seidner, S.: Surfactant metabolism in surfactant-treated preterm ventilated lambs. *J Appl Physiol* 67 (1989), S. 429-437

125. Gross, N. J.; Narine, K. R.: Surfactant subtypes of mice: metabolic relationships and conversion in vitro. *J Appl Physiol* 67 (1989), S. 414-21
126. Krishnasamy, S.; Teng, L.; Dhand, R.; Schultz, M.; Gross, N. J.: Molecular cloning, characterization, and differential expression pattern of mouse lung surfactant convertase. *Am J Physiol* 275 (1998), S. L969-L975
127. Veldhuizen, R.; Inchley, K.; Hearn, S. A.; Lewis, J. F.; Possmayer, F.: Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem J* 295 (1993), S. 141-147
128. Ballard, P. L.: Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr Rev* 10 (1989), S. 165-81
129. Possmayer, F.: The role of surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 142 (1990), S. 749-752
130. Possmayer, F.: Biophysical activity of pulmonary surfactant. In: Polin, R. A. und Fox, W. W.: Fetal and Neonatal Physiology. Bd. 90. W. B. Sanders Co, 1991, S. 459-962
131. Davis, J. M.; Veness-Meehan, K.; Notter, R. H.; Bhutani, V. K.; Kendig, J. W.; Shapiro, D. L.: Changes in pulmonary mechanics after the administration of surfactant to infants with respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 319 (1988), S. 476-9
132. Couser, R. J.; Ferrara, T. B.; Ebert, J.; Hoekstra, R. E.; Fangman, J. J.: Effects of exogenous surfactant therapy on dynamic compliance during mechanical breathing in preterm infants with hyaline membrane disease. *J Pediatr* 116 (1990), S. 119-24
133. Bhat, R.; Dziedzic, K.; Bhutani, V. K.; Vidyasagar, D.: Effect of single dose surfactant on pulmonary function. *Crit Care Med* 18 (1990), S. 590-5
134. Petty, T. L.; Silvers, G. W.; Paul, G. W.; Stanford, R. E.: Abnormalities in lung elastic properties and surfactant function in adult respiratory distress syndrome. *Chest* 75 (1979), S. 571-4
135. Baughman, R. P.; Sternberg, R. I.; Hull, W.; Buchsbaum, J. A.; Whitsett, J.: Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 147 (1993), S. 653-657
136. Lamm, W. J.; Albert, R. K.: Surfactant replacement improves lung recoil in rabbit lungs after acid aspiration. *Am Rev Respir Dis* 142 (1990), S. 1279-83

137. Lewis, J.; Ikegami, M.; Higuchi, R.; Jobe, A.; Absolom, D.: Nebulized vs. instilled exogenous surfactant in an adult lung injury model. *J appl Physiol* 71 (1991), S. 1270-6
138. Strohmaier, W.; Redl, H.; Schlag, G.: Exogenous surfactant in experimental aspiration trauma. *Prog Clin Biol Res* 308 (1989), S. 797-801
139. Zelter, M.; Escudier, B. J.; Hoeffel, J. M.; Murray, J. F.: Effects of aerosolized artificial surfactant on repeated oleic acid injury in sheep. *Am Rev Respir Dis* 141 (1990), S. 1014-9
140. Kendig, J. W.; Notter, R. H.; Cox, C.; Aschner, J. L.; Benn, S.; Bernstein, R. M.; Hendricks-Munoz, K.; Maniscalco, W. M.; Metlay, L. A.; Phelps, D. L.; l., a.: Surfactant replacement therapy at birth: final analysis of a clinical trial and comparisons with similar trials. *Pediatrics* 82 (1988), S. 756-62
141. Kwong, M. S.; Egan, E. A.; Notter, R. H.; Shapiro, D. L.: Double-blind clinical trial of calf lung surfactant extract for the prevention of hyaline membrane disease in extremely premature infants. *Pediatrics* 76 (1985), S. 585-92
142. Shapiro, D. L.; Notter, R. H.; Morin FC, 3. d.; Deluga, K. S.; Golub, L. M.; Sinkin, R. A.; Weiss, K. I.; Cox, C.: Double-blind, randomized trial of a calf lung surfactant extract administered at birth to very premature infants for prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 76 (1985), S. 593-9
143. Hennes, H. M.; Lee, M. B.; Rimm, A. A.; Shapiro, D. L.: Surfactant replacement therapy in respiratory distress syndrome. Meta-analysis of clinical trials of single-dose surfactant extracts. *Am J Dis Child* 145 (1991), S. 102-4
144. Merritt, T. A.; Hallman, M.; Bloom, B. T.; Berry, C.; Benirschke, K.; Sahn, D.; Key, T.; Edwards, D.; Jarvenpaa, A. L.; Pohjavuori, M.; l., a.: Prophylactic treatment of very premature infants with human surfactant. *N Engl J Med* 315 (1986), S. 785-90
145. Chapman, D.; Urbina, J.; Keough, K. M.: Biomembrane phase transitions: Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry. *J Biol Chem* 249 (1974), S. 2512-2521
146. Richman, P. S.; Spragg, R. G.; Robertson, B.; Merritt, T. A.; Curstedt, T.: The adult respiratory distress syndrome: first trials with surfactant replacement. *Eur Respir J* 3 (1989), S. 109s-111s (Suppl.)

147. Joka, T.; Obertacke, U.: Neue medikamentöse Behandlung im ARDS: Effekt einer intrabronchialen xenogenen Surfactantapplikation. *Z Herz Thorax Gefäßchirurgie*, Suppl 1 3 (1989), S. 21-4
148. Löffler G., Petrides P. E.. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5.th ed. Berlin: Springer Verlag, 1997)
149. Ahmad S. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology . In: Sami Ahmad, ed. Chapman & Hall, 1995
150. Alexander K. E. A. *Thiemes Innere Medizin*. 1.st ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999.
151. Schmidt R. Entwicklung von Methoden zur biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung des pulmonalen Surfactants. VVB Laufersweiler Verlag, Wettenberg, 1996
152. Esterbauer H., Cheeseman K. H., Dianzani M. U., Poli G., Slater T. F.. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J*, 1982: **208**: 129-140).
153. Montuschi P.. Isoprostanes and other exhaled breath markers in respiratory disease. *Eur Respir Rev*, 1999: **9**: 249-253 UND Morrow J. D., Roberts L. J. The isoprostanes: their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002: **166**: S25-S30 UND Janssen L. J., Catalli A., Helli P. The pulmonary biology of isoprostanes. *Antioxid Redox Signal*, 2005: **7**: 244-255).
154. Kelly F. J.. Urinary F2-isoprostane metabolite analysis: a step closer to obtaining a reliable measure of oxidative stress?. *Clin Exp Allergy*, 2001: **31**: 355-356 UND Proudfoot J., Barden A., Mori T. A., Burke V., Croft K. D., Beilin L. J., Puddey I. B. Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation - A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1999: **272**: 209-215)
155. Gil J., Weibel E. R. Improvements in Demonstration of Lining Layer of Lung Alveoli by Electron Microscopy. *Respir Physiol*, 1969: **8**: 13-36
156. von Wichert P., Joseph K., Müller B., Franck W. M. Bronchoalveolar lavage. Quantification of intraalveolar fluid. *Am Rev Respir Dis*, 1993: **147**: 148-152. UND Ward C., Effros R. M., Walters E. H. Assessment of epithelial lining fluid dilution during bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Rev*, 1999: **9**: 32-37.)

157. Baughman R. P., Rennard S. I.. Bronchoalveolar lavage: general approaches to correct for variability of dilution and lung permeability. *Eur Respir Rev*, 1999; **9**: 28-31
158. Slade R., Crissman K., Norwood J., Hatch G.. Comparison of antioxidant substances in bronchoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats. *Exp Lung Res*, 1993; **19**: 469-484.
159. Kelly F. J., Blomberg A., Frew A., Holgate S. T., Sandstrom T.. Antioxidant kinetics in lung lavage fluid following exposure of humans to nitrogen dioxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996; **154**: 1700-1705.
160. Kelly F. J., Tetley T. D.. Nitrogen dioxide depletes uric acid and ascorbic acid but not glutathione from lung lining fluid. *Biochem J*, 1997; **325**: 95-99.
161. Hatch G. E.. Comparative biochemistry of airway lining fluid. In: Schlesinger, R. B., ed. *Comparative biology of the lung* Baton Rouge: Louisiana State University Press, 1992: 617-632.
162. Chow C. W., Herrera Abreu M.T., Suzuki T., Downey G.P. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **2003**; **29**: 427-431.
163. Ward C., Effros R. M., Walters E. H.. Assessment of epithelial lining fluid dilution during bronchoalveolar lavage. *Eur Respir Rev*, 1999; **9**: 32-37
164. Jaeschke, H., Mitchell, J. R. Use of isolated perfused organs in hypoxia and ischemia / reperfusion oxidant stress. *Methods Enzymol*, 1990; **186**: 752-759
165. Draper, H. H., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1990; **186**: 421-431
166. Seeger W, Walmrath D, Grimminger F et al. Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol* 1994; **233**: 549
167. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*, 2001; **429**: 195-207
168. Schock B. C., Young I. S., Brown V., Fitch P. S., Shields M. D., Ennis M. Antioxidants and oxidative stress in BAL fluid of atopic asthmatic children. *Pediatr Res*, 2003; **53**: 375-381.
169. Paredi P., Kharitonov S. A., Leak D., Shah P. L., Cramer D., Hodson M. E., Barnes P. J. Exhaled ethane is elevated in cystic fibrosis and correlates with carbon monoxide levels and airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; **161**: 1247-1251.

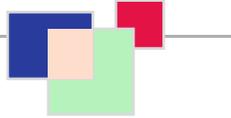
170. Cantin A. M., Hubbard R. C., Crystal R. G. Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis*, 1989; 139: 370-372
171. Lenz A. G., Costabel U., Maier K. L. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. *Eur Respir J*, 1996; 9: 307-312.
172. Chabot F., Mitchell J. A., Gutteridge J. M., Evans T. W. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J*, 1998; 11: 745-757.
173. Lang J. D., McArdle P. J., O'Reilly P. J., Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. *Chest*, 2002; 122: 314S-320S.
174. Birukov K. G., Leitinger N., Bochkov V. N., Garcia J. G. Signal transduction pathways activated in human pulmonary endothelial cells by OxPAPC, a bioactive component of oxidized lipoproteins. *Microvasc Res*, 2004; 67: 18-28.
175. Haddad I. Y., Pataki G., Hu P., Galliani C., Beckman J. S., Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest*, 1994; 94: 2407-2413.
176. Lamb N. J., Gutteridge J. M., Baker C., Evans T. W., Quinlan G. J. Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. *Crit Care Med*, 1999; 27: 2028-2030.
177. Sittipunt C., Steinberg K. P., Ruzinski J. T., Myles C., Zhu S., Goodman R. B., Hudson L. D., Matalon S., Martin T. R. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 163: 503-510.
178. Mohsenin V. Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress: role of antioxidant defenses. *J Appl Physiol*, 1991; 70: 1456-1462.
179. Cochrane C. G., Spragg R., Revak S. D. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome: Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Invest*, 1983; 71: 754-761.
180. Baldwin S. R., Simon R. H., Grum C. M., Ketai L. H., Boxer L. A., Devall L. J. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*, 1986; 4: 11-14.
181. Montuschi P., Ciabattini G., Paredi P., Pantelidis P., du Bois R. M., Kharitonov S. A., Barnes P. J. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 158: 1524-1527.

182. Lykens M. G., Davis W. B., Pacht E. R. Antioxidant activity of bronchoalveolar lavage fluid in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol*, 1992: 262: L169-L175.
183. Krsek-Staples J. A., Kew R. R., Webster R. O. Ceruloplasmin and transferrin levels are altered in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1992: 145: 1009-1015.
184. Comhair S. A., Bhatena P. R., Farver C., Thunnissen F. B., Erzurum S. C. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human epithelial cells. *FASEB J*, 2001: 15: 70-78.
185. Buhl R. Imbalance between oxidants and antioxidants in the lungs of HIV-seropositive individuals. *Chem Biol Interact*, 1994: 91: 147-158.
186. Bowler R. P., Velsor L. W., Duda B., Chan E. D., Abraham E., Ware L. B., Matthay M. A., Day B. Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Crit Care Med*, 2003: 31: 2309-2315.
187. Kodavanti U. P., Costa D. L., Richards J., Crissman K. M., Slade R., Hatch G. E. Antioxidants in bronchoalveolar lavage fluid cells isolated from ozone--exposed normal and ascorbate-deficient guinea pigs. *Exp Lung Res*, 1996: 22: 435-448.
188. Morrison D., Rahman I., Lannan S., MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999: 159: 473-479.
189. Blomberg A., Sainsbury C., Rudell B., Frew A. J., Holgate S. T., Sandstrom T., Kelly F. J. Nasal cavity lining fluid ascorbic acid concentration increases in healthy human volunteers following short term exposure to diesel exhaust. *Free Radic Res*, 1998: 28: 59-67.
190. Holter J. F., Weiland J. E., Pacht E. R., Gadek J. E., Davis W. B. Protein permeability in the adult respiratory distress syndrome. Loss of size selectivity of the alveolar epithelium. *J Clin Invest*, 1986: 78: 1513-1522.
191. Messent M., Sinclair D. G., Quinlan G. J., Mumby S. E., Gutteridge J. M., Evans T. W. Pulmonary vascular permeability after cardiopulmonary bypass and its relationship to oxidative stress. *Crit Care Med*, 1997: 25: 425-429.

192. Jain A., Martensson J., Mehta T., Krauss A. N., Auld P. A., Meister A. Ascorbic acid prevents oxidative stress in glutathione-deficient mice: effects on lung type 2 cell lamellar bodies, lung surfactant, and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992; 89: 5093-5097.
193. Minoo P., King R. J., Coalson J. J. Surfactant proteins and lipids are regulated independently during hyperoxia. *Am J Physiol*, 1992; 263: L291-L298.
194. Zhu S., Haddad I. Y., Matalon S. Nitration of surfactant protein A (SP-A) tyrosine residues results in decreased mannose binding ability. *Arch Biochem Biophys*, , 1996; 333: 282-290.
195. Haddad I. Y., Zhu S., Ischiropoulos H., Matalon S. Nitration of surfactant protein A results in decreased ability to aggregate lipids. *Am J Physiol*, 1996; 270: L281-L288.
196. Haddad, I. Y., Ischiropoulos H., Holm B. A., Beckman J. S., Baker J. R., Matalon S. Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol*, 1993; 265: L555-L5644.
197. Crim C., Longmore W. J. Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes. *Am J Physiol*, 1995; 268: L129-L135.
198. Holm B. A., Matalon S., Finkelstein J. N., Notter R. H. Type II pneumocyte changes during hyperoxic lung injury and recovery. *J Appl Physiol*, 1988; 65: 2672-2678.
199. Holm B. A., Notter R. H., Siegle J., Matalon S. Pulmonary physiological and surfactant changes during injury and recovery from hyperoxia. *J Appl Physiol*, 1985; 59: 1402-1409.
200. Minoo P., Segura L., Coalson J. J., King R. J., DeLemos R. A. Alterations in surfactant protein gene expression associated with premature birth and exposure to hyperoxia. *Am J Physiol*, 1991; 261: L386-L392.
201. Tölle, A., Kolleck, I., Schlame, M., Wauer, R., Stevens, A. P., Rüstow, B. Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant and the turnover of surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E. *Biochim Biophys Acta*, 1997; 1346: 198-204.
202. Goode H. F., Webster N. R.. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med*, 1993; 21: 1770-1776.

203. Gillissen A., Nowak D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respir Med*, 1998; 92: 609-623.
204. Kelly F. J., Rodgers W., Handel J., Smith S., Hall M. A. Time course of vitamin E repletion in the premature infant. *Br J Nutr*, 1990; 63: 631-638.
205. Demertzis S., Scherer M., Langer F., Dwenger A., Hausen B., Schafers H. J. Ascorbic acid for amelioration of reperfusion injury in a lung autotransplantation model in sheep. *Ann Thorac Surg*, 2000; 70: 1684-1689.
206. Weinbroum A. A., Kluger Y., Ben Abraham R., Shapira I., Karchevski E., Rudick V. Lung preconditioning with N-acetyl-L-cysteine prevents reperfusion injury after liver no flow-reflow: a dose-response study. *Transplantation*, 2001; 71: 300-306.
207. Langley S. C., Kelly F. J. N-acetylcysteine ameliorates hyperoxic lung injury in the preterm guinea pig. *Biochem Pharmacol*, 1993; 24: 841-846.
208. Hagiwara S. I., Ishii Y., Kitamura S. Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 162: 225-231.
209. Suliman H. B., Ryan L. K., Bishop L., Folz R. J. Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol*, 2001; 280: L69-L78.
210. Muller B., Oske M., Hochscheid R., Seifart C., Barth P. J., Garn H., von Wichert P. Effect of N-acetylcysteine treatment on NO<sub>2</sub>-impaired type II pneumocyte surfactant metabolism. *Eur J Clin Invest*, 2001; 31: 179-188.
211. Thebaud B., Barlier-Mur A. M., Chailley-Heu B., Henrion-Caude A., Tibboel D., Dinh-Xuan A. T., Bourbon J. R. Restoring effects of vitamin A on surfactant synthesis in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 164: 1083-1089.
212. Samet J. M., Hatch G. E., Horstman D., Steck-Scott S., Arab L., Bromberg P. A., Levine M., McDonnell W. F., Devlin R. B. Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 164: 819-825.
213. Block G., Jensen C., Dietrich M., Norkus E. P., Hudes M., Packer L. Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: influence of antioxidant supplementation. *J Am Coll Nutr*, 2004; 23: 141-147.

214. Mooney L. A., Madsen A. M., Tang D., Orjuela M. A., Tsai W. Y., Garduno E. R., Perera F. P. Antioxidant vitamin supplementation reduces benzo(a)pyrene-DNA adducts and potential cancer risk in female smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005: 14: 237-242.
215. Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. Hunninghake, G. W. *N Engl J Med*, 2005: 353: 2285-2287.
216. Meyer A., Buhl R., Kampf S., Magnussen H. Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995: 152: 1055-1060.
217. Borok Z., Buhl R., Grimes G. J., Bokser A. D., Hubbard R. C., Holroyd K. J., Roum J. H., Czerski D. B., Cantin A. M., Crystal R. G. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 1991: 338: 215-216.
218. Behr J., Maier K., Degenkolb B., Krombach F., Vogelmeier C. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997: 156: 1897-1901.
219. Suter P. M., Domenighetti G., Schaller M. D., Laverriere M. C., Ritz R., Perret C. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest*, 1994: 105: 190-194.
220. Bernard G. R., Wheeler A. P., Arons M. M., Morris P. E., Paz H. L., Russell J. A., Wright P. E., and the antioxidant in ARDS study group. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. *Chest*, 1997: 112: 164-172.
221. Jepsen S., Herlevsen P., Knudsen P., Bud M. I., O. N., Klausen. Antioxidant treatment with N-acetylcysteine during adult respiratory distress syndrome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med*, 1992: 20: 918-923.
222. Nathens A. B., Neff M. J., Jurkovich G. J., Klotz P., Farver K., Ruzinski J. T., Radella F., Garcia I., Maier R. V. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, 2002: 236: 814-822.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5947-7



9 783835 195947 7

Cover photo: © psdesign1 - Fotolia.com