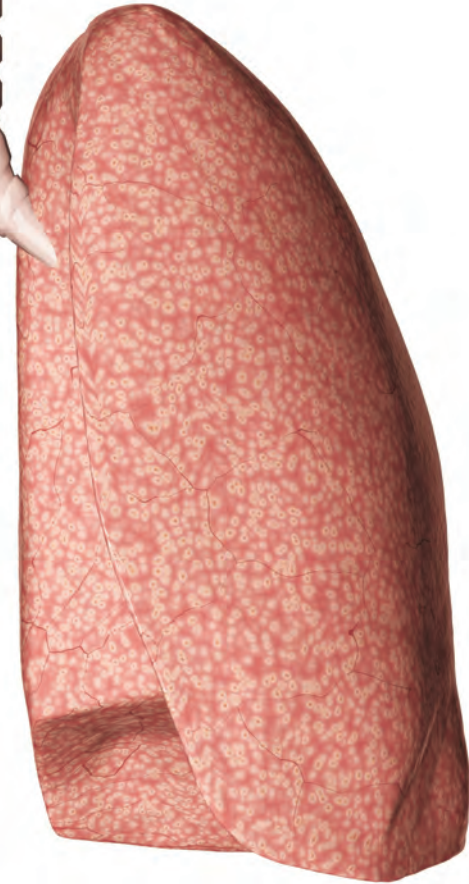


**HYPOXIE-BEDINGTE HEMMUNG DER ALVEOLÄREN
FLÜSSIGKEITSRESORPTION IM MODELL DER
ISOLIERTEN, VENTILIERTEN UND PERFUNDIERTEN
KANINCHENLUNGE**

**Karsten Roman Gregor
grosse Kreymborg**



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 2009

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.

1st Edition 2009

© 2009 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

www.doktorverlag.de

**Hypoxie-bedingte Hemmung der alveolären
Flüssigkeitsresorption im Modell der isolierten, ventilerten
und perfundierten Kaninchenlunge**

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

vorgelegt von

**Karsten Roman Gregor grosse Kreymborg
aus Köln**

Giessen 2008

**Aus der Klinik für Pneumologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des
Universitätsklinikums Giessen / Marburg GmbH**

Standort Giessen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ardeschir Hossein Ghofrani

2. Gutachter: PD Dr. med. Michael Henrich

Tag der Disputation: 04.11.2009

Für meine Eltern

„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 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.“

Karsten grosse Kreymborg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
I. Einleitung	10
I.1.1. Schematische Darstellung 1. Abbildung der alveolar-kapillären Barriere Kanäle und Transporter des im Text genannten Ionen- und Flüssigkeitstransportes in alveolären Typ-I-Zellen (<i>ATI</i>) und alveolären Typ-II-Zellen (<i>ATII</i>)	11
I.2. Fragestellung	16
II. Material und Methoden	17
II.1. Materialien & Substanzen	17
II.2. Geräte	17
II.3. Methoden	19
II.3.1. Modell der isolierten Kaninchenlunge	19
II.3.2. Adaptation des verwendeten Organmodells	19
II.3.3. Schematische Darstellung 2. Abbildung der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge	20
II.3.4. Vorbereitung des Arbeitsplatzes	21
II.3.5. Vorbereitung des Versuchstiers und Lungenpräparation	24
II.3.6. Organintegration in das Ventilations- und Perfusionssystem	25
II.3.7. Verneblungssystem	26
II.3.8. Pharmaka Ouabain und Amilorid	26
II.3.9. Nuklide ^{22}Na und ^3H -Mannitol	27
II.3.10. Flüssigkeitsbeladung der Alveole über Ultraschallverneblung	28
II.3.11. Broncho-alveoläre Lavage	28
II.3.12. Biophysikalische und biochemische Messung	29
II.3.12.1. Theoretischer Hintergrund der radioaktiven Messung	29
II.3.12.2. Auswertung der ^{22}Na -Daten	29
II.3.12.3. Berechnung und Präsentation der aktiven und passiven Komponente des alveolären Natrium-Transportes	31
II.3.12.4. Auswertung der ^3H -Mannitol-Daten	32
II.3.12.5. Berechnung des epithelialen Flüssigkeitssaums der Alveole	33
II.3.13. Statistik	33
II.4. Durchführung der Experimente	34
II.4.1. Schematische Darstellung 3. Abbildung des allgemeinen Versuchsablaufes	34
II.5. Modell A: Allgemeine Untersuchung des Flüssigkeitshaushaltes unter gleichmässiger Flüssigkeitsbeladung der Alveole	35

II.5.1.	Resorptionsnorm unter massiver Beladung der Alveolen mit isoosmolarer Flüssigkeit	35
II.6.	Modell B: Allgemeine Untersuchung des Flüssigkeitshaushaltes unter Hypoxie	36
II.6.1.	Untersuchungen zum Natriumtransport in der Alveole unter dem Einfluss von Hypoxie	36
II.6.2.	Untersuchung zum parazellulären, alveolären Flüssigkeitstransport unter Hypoxie	36
II.6.3.	Untersuchung des aktiven und passiven alveolären Natriumtransport	37
II.6.4.	Untersuchung des alveolären Flüssigkeitsvolumens unter Hypoxie	37
III.	Ergebnisse	38
III.1.1.	pH-Werte des Perfusats im Normbereich	38
III.2.	Alveolärer Natriumtransportes unter massiver Flüssigkeitsbeladung	38
III.2.1.	Untersuchungen zum Flüssigkeitshaushalt in Bezug zum epithelialen Flüssigkeitssaums bei unterschiedlichen Flüssigkeitsbeladungsschemata	38
III.2.2.	Abbildung 1. ELF bei experimentellem Ödem	39
III.3.	Alveolären Natriumtransport unter Hypoxie	40
III.3.1.	Hemmung des alveolären Natriumtransportes durch Hypoxie	40
III.3.2.	Abbildung 2. ²² Na-decrease-rates über der Lunge	41
III.3.3.	Hemmung des alveolären Natriumtransportes nach zweistündiger Hypoxie	42
III.3.4.	Abbildung 3. ²² Na in der Lunge zum Versuchsende	43
III.4.	Eigenschaften des passiven Flüssigkeitstransportes	44
III.4.1.	Stabiler parazellulärer H ³ -Mannitol Transport	44
III.4.2.	Abbildung 4. Der parazelluläre Transport	44
III.5.	Eigenschaften des aktiven alveolären Natriumtransportes	45
III.5.1.	Hypoxie hemmt den aktiven Natrium-Transport	45
III.5.2.	Abbildung 5. Gesamter OA-sensitiver ²² Na-Transport und aktiver Anteil am Ende des Versuches	46
III.6.	Resorption des epithelialen Flüssigkeitssaums der Alveole	47
III.6.1.	Anstieg der Volumina des alveolären Flüssigkeitssaums unter Hypoxie	47
III.6.2.	Abbildung 6. Epithelialer Flüssigkeitssaum zum Ende des Versuches	48
IV.	Diskussion	49
IV.1.1.1.	Der alveoläre Flüssigkeitshaushalt wird durch alveoläre Flüssigkeitsbeladung angeregt	49
IV.1.1.2.	Der passive alveoläre Flüssigkeitstransport zeigt keine Beeinträchtigung	51
IV.1.1.3.	Hypoxische Ventilation hemmt den Ouabain- und Amilorid-sensitiven alveolären Natriumtransportes	53
IV.1.1.4.	Hypoxie hemmt den aktiven Anteil des alveolären Natriumtransportes	53
IV.1.1.5.	Hypoxie führt über Flüssigkeitretention zur alveolären Ödembildung	56
V.	Zusammenfassung	58
VI.	Summary	59

Tabellen	60
Tabelle 1. ELF-Volumina unter Flüssigkeitsbeladung	60
Tabelle 2. ²² Na-DR-Mittelwerte der Lunge ausgehend von der maximalen Deposition	60
Tabelle 3. ²² Na-Nuklid in der Lunge zum Versuchsende	62
Tabelle 4. Passiver ³ H-Transport zum Ende des Versuches	62
Tabelle 5. Gesamter ²² Na-Transport und aktiver Anteil zum Versuchsende	63
Tabelle 6. Epithelialer Flüssigkeitssaum am Versuchsende	63
Literaturverzeichnis	64
Danksagung	75

Abkürzungen

Abkürzung	Begriff/Bedeutung	Übersetzung aus dem Englischen
^{22}Na	sodium-22-isotope	Natrium-22-Isotop
^3H	tritium-isotope	Tritium-Isotop
AEC	alveolar epithelial cell	alveoläre Epithelzelle
AFC	alveolar fluid clearance	alveoläre Flüssigkeitsresorption
ALI	acute lung injury	akutes Lungenversagen
aqua dest.	aqua destillata	destilliertes Wasser
ARDS	adult respiratory distress syndrom	akutes Lungenversagen beim Erwachsenen
AST	alveolar sodium transport	alveolärer Natrium-Transport
ATI	alveolar type I cell	alveoläre Typ-I-Zelle
ATII	alveolar type II cell	alveoläre Typ-II-Zelle
BAL	broncho-alveolar lavage	broncho-alveoläre Lavage
cAMP	cyclic-adenosine monophosphate	zyclisches Adenosinmonophosphat
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	zellmembranständiger Chlorid-Kanal
CO_2	carbon dioxid	Kohlendioxid
DR	decrease-rate	Tracer-/Nuklid-Abfall-Rate
ELF	epithelial lining fluid	epithelialer Flüssigkeitssaum
ENaC	epithelial sodium channel	epithelialer Natriumkanal
EZM	extra cellular matrix	extrazelluläre Matrix
H_2O	Water	Wasser
HAPE	high altitude pulmonary edema	Höhen-assoziiertes Lungenödem

HIF-1	hypoxia-inducible factor 1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HOA	hypoxia + ouabain & amilorid	Hypoxie + Ouabain & Amilorid
HPV	hypoxic pulmonary vasoconstriction	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
HRE	hypoxia response element	Hypoxie-reaktive-Elemente
KO	gene knockout	Gen-Ausschaltung
Na,K-ATPase	Na ⁺ , K ⁺ transporting adenosine-5'-triphosphatase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NaHCO ₃	sodium bicarbonate (sodium hydrogen carbonate)	Natriumbicarbonat (Natriumhydrogencarbonat)
NaCl	sodium chloride	Natriumchlorid
NOA	normoxia + ouabain & amilorid	Normoxie + Ouabain & Amilorid
NPD	nasal potential difference	Potential der Nasenschleimhaut
O ₂	Oxygen	Sauerstoff
OA	ouabain & amilorid	Ouabain & Amilorid
PEEP	positive end expiratory pressure	Positiver endexpiratorischer Druck
PG	Proteoglycan	Proteoglykan
PKC	protein kinase c	Protein Kinase C
PVP	pulmonal venous pressure	Pulmonal-venöser Druck
RDS	respiratory distress syndrome	Lungenversagen
ROS	reactive oxygen species	radikaler, hochreaktiver Sauerstoffmetabolite
Sham	mock	Scheinversuch ohne pharmakologischen Wirkstoff
ZO	tight junctions, lat. Zonula occludens	dichte Verbindung

I. Einleitung

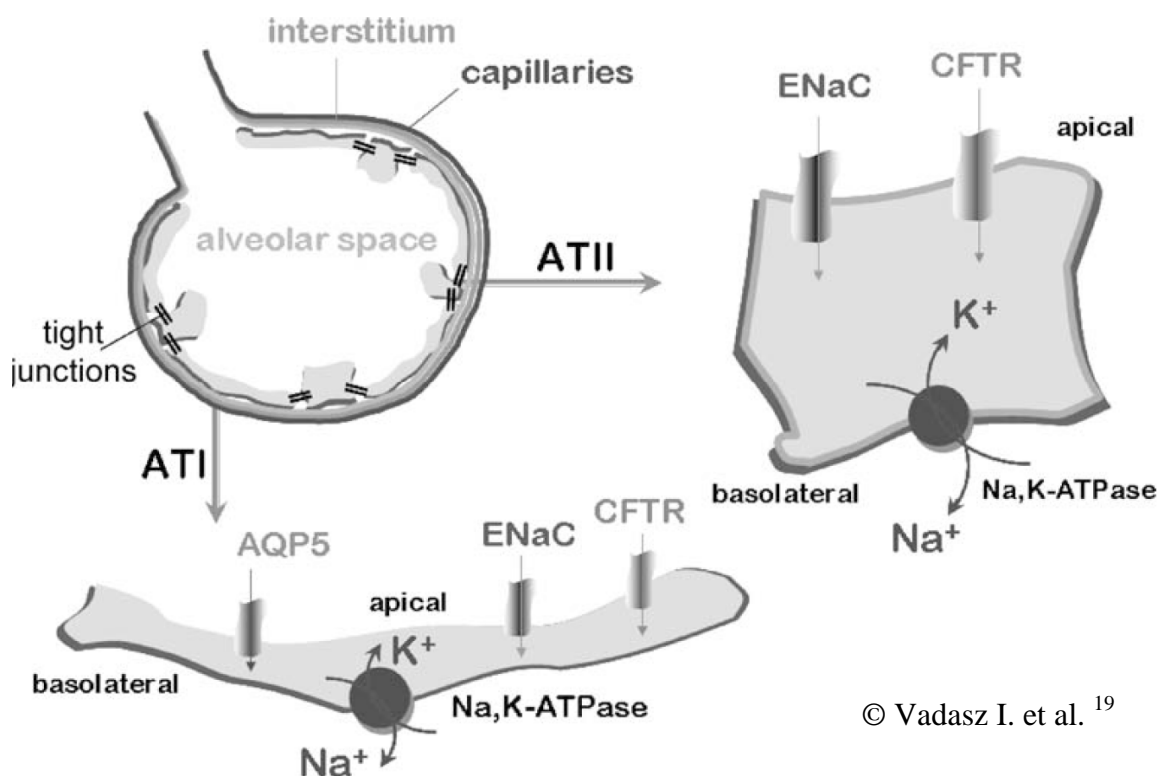
In der humanen Lunge befinden sich etwa 300 Millionen Alveolen mit einer Gesamtoberfläche von ca. 140 m². Die Alveolen werden lumenwärts von einer das epithelauskleidenden Flüssigkeit (engl. *epithelial lining fluid* = ELF) bedeckt, welche die distale Lunge als dünner Flüssigkeitsfilm auskleidet. Für einen optimalen Gasaustausch zwischen Alveole und Kapillare misst die ELF eine physiologische Wegstrecke von 0,2 bis 0,3 µm. Vor 1982 waren die regulierenden Mechanismen des Flüssigkeitshaushaltes der ELF und der alveolären Epithelbarriere beim Erwachsenen noch weitgehend unbekannt ¹. Erst 1982 erfolgte der Nachweis, dass der Flüssigkeitshaushalt über aktive Ionentransporter reguliert wird ^{2,3}. Zuvor bestand die allgemeine Lehrmeinung darin, dass die Resorption freier Flüssigkeit in der Alveole über den hydrostatischen und onkotischen Druck moduliert wird. Das damalige Konzept basierte zum Teil auf unphysiologischen Versuchen bei Raumtemperatur und auf Versuche an Hunden, welche *per se* einen niedrigen alveolären Natrium- und Wassertransport aufweisen ⁴. Obwohl schon 1974 die Resorption eines Ödems der distalen Lunge über Lymphe und alveoläre Mikrozirkulation diskutiert worden ist ⁵, waren die hier zugrunde liegenden Mechanismen völlig unbekannt. Bis in den Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts waren keine Tiermodelle bezüglich der Resorption eines alveolären Ödems etabliert worden. In den letzten drei Jahrzehnten wurde diese Lücke jedoch unter der Nutzung von *in-vivo* und *in-vitro* Modellen geschlossen, deren grundlegenden Erkenntnisse bezüglich des alveolären Flüssigkeitshaushaltes im Folgenden kurz dargestellt werden soll.

Die Diffusionsbarriere der Lunge wird durch das Epithel, das Interstitium und das Endothel der Kapillare gebildet. Die durch dichte Verbindung (engl. *tight junctions*, lat. *Zonula occludens* = ZO) miteinander verbundenen Alveozyten bilden den epithelialen Anteil dieser Gewebeschanke ⁶⁻⁸, wie im Schema der alveolar-kapillären Barriere (schematische Darstellung I.1.1) dargestellt. Bandförmig angeordnete Membranproteine verschließen als ZO den Zellzwischenraum und bilden eine parazelluläre Diffusionsbarriere, die den Fluss von Molekülen durch das Epithel kontrolliert. Die Expression ZO-assoziiierter Proteine wie z.B. Occludin und Claudine wurde für alveolare Epithelzellen nachgewiesen ^{8, 9}. Weitere ZO-assoziierte zytoskelettale Proteine, wie z.B. Actin ^{10, 11}, Spectrin ^{12, 13}, Ankyrin ¹¹ modulieren den Flüssigkeits- und Ionenhaushalt, indem sie die Verteilung der integralen Membrantransportproteine modulieren und die Zellmembran selbst stabilisieren. Zum Lumen

der Alveole hin ist diese epitheliale Barriere mit der ELF benetzt. Das Volumen der ELF wird durch einen ständigen ein- und auswärtsgerichteten Flüssigkeitsstrom bestimmt. Für einen optimalen Gasaustausch zwischen Alveole und Kapillare ist die Regulation des alveolären Flüssigkeitshaushaltes über die alveoläre Flüssigkeitsresorption (engl. *alveolar fluid clearance* = AFC) entscheidend. Der AFC wird durch den alveolären Natriumtransport (engl. *alveolar sodium transport* = AST) unterhalten und moduliert. Dieser baut entlang der epithelialen Schranke über die aktive Resorption von Natrium einen osmotischen Gradienten zur passiven Resorption von Wasser aus der Alveole auf. Die Resorption von Wasser erfolgt zu 90% hauptsächlich parazellulär^{14, 15}. Mittels spezifischer Genausschaltung (engl. *gene-knockout*) in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Flüssigkeitsresorption über Aquaporin-5 Wasserkanäle, welche vornehmlich auf AT-I-Zellen (ATI cells = engl. *alveolar type I cells*) zu finden sind⁴, keine tragende Rolle im AST zufällt¹⁶⁻¹⁸.

I.1.1. Schematische Darstellung 1. Abbildung der alveolar-kapillären Barriere Kanäle und Transporter des im Text genannten Ionen- und Flüssigkeitstransportes in alveolären Typ-I-Zellen (ATI) und alveolären Typ-II-Zellen (ATII)

19



© Vadasz I. et al.¹⁹

Die epitheliale Schranke besteht zu gleichen Teilen aus alveolären Typ-I-Zellen und Typ-II-Zellen, jedoch besteht die Oberfläche im Bereich der Alveolen zu ca. 90% aus flachen ATI,

welche die Diffusion der Atemgase durch eine maximal 0,5 µm dünne alveolar-kapilläre Barriere ermöglichen^{20, 21}.

Die restlichen 10% der Oberfläche der alveolären Blut-Gas-Schranke stellen kubische ATII dar. Neben der Produktion der grenzflächenaktiven Substanz (engl. *surface active agent* = Surfactant) fällt den ATII als epitheliale Vorläuferzellen die wichtige Aufgabe der Regeneration des Alveolarepithels zu.

In der Vergangenheit wurden die ATII für die Modulierung des alveolären Flüssigkeitshaushaltes verantwortlich gemacht, da ihnen die Hauptlast des energieabhängigen AST zugeschrieben wurde. Die Resorptionsleistung der einzelnen ATI erschien im Bezug auf die gesamten AFC vernachlässigbar. In den letzten Jahren wurde hingegen gezeigt, dass die Gesamtheit aller ATI, welche die Oberfläche der alveolar-epithelialen Barriere dominieren, den AST funktionell tragen²². *Sznajder et al.* ordnen den ATI 60% und den ATII nur 40% anteilig an der gesamten AFC zu²³. *Dobbs et al.* gehen sogar von 90% ATI-getragener und damit nur 10% ATII-getragener AFC^{22, 24} aus. Der AST besteht hauptsächlich aus zwei Natrium-Transport-Systemen: den Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanälen (engl. *epithelial sodium channel* = ENaC)²⁵ und der Ouabain-sensitiven Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (engl. *Na⁺, K⁺ transporting adenosine-5'-triphosphatase* = Na,K-ATPase)²⁶. Neben anderen noch weitgehend unbekanntem Kanälen²⁷ ist auch der Chlorid Kanal CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* = CFTR)^{28, 29} an der AFC beteiligt. Im Vergleich zum energieabhängigen AST, bei dem die Na,K-ATPase die treibende Kraft darstellt, haben Kanäle wie der CFTR in der AFC eine deutlich untergeordnete Rolle³⁰.

Die dem osmotischen Gradienten passiv folgende Flüssigkeit wird über die Resorptionsmechanismen der unter dem Epithel liegenden extrazellulären Matrix (EZM) abtransportiert: Die EZM bildet den elastischen Rahmen der dünnen epithel-kapillären Grenze, welche durch die vereinte Zellmembran beider Zelltypen gebildet wird. Diese Grenze besteht hauptsächlich aus Kollagenen, elastischen Fasern und Proteoglykanen (PG)³¹. Die PGs beeinflussen die Filterfunktion der kapillären Membran und der darunter liegenden Matrix und modulieren die Compliance der Lymphgefäße bezüglich der Drainage des Interstitiums³². Als hydrophile Makromoleküle sind sie in der Lage Wasser gelartig zu binden und beeinflussen auch die Permeabilität der Basalmembran.

Ein verminderter alveolärer Sauerstoffpartialdruck wird als alveoläre Hypoxie bezeichnet. Diese kann als Folge pulmonaler und extrapulmonaler Erkrankungen den AFC empfindlich stören. Diese Störung kann durch eine Beeinträchtigung der alveolar-kapillären Schranke

bedingt sein, wie sie im akuten Lungenversagen (engl. *acute lung injury* = ALI oder engl. *acute respiratory distress syndrome* = ARDS) auftritt. Der AST unterliegt einem balanciertem ein- und auswärtsgerichteten Flüssigkeitsstrom. ALI und ARDS verschieben die Balance des alveolären Flüssigkeitshaushaltes zugunsten des Einstroms mit konsekutiver Ausbildung eines alveolären Ödems³³. Dieses Ödem der ELF kann zu einer lokalen Hypoxie der darunter liegenden Epithelzellen führen, da die Diffusion der Atemgase zwischen den Alveolen und Blutzirkulation erschwert ist³⁴. Auch äußere umweltbedingte Hypoxie, wie sie beim Höhenassoziiertes Lungenödem HAPE (HAPE = engl. *high altitude pulmonary edema*) zu finden ist, resultieren in einem Abfall der AFC³⁵. HAPE ist ebenfalls charakterisiert durch ein Ungleichgewicht des alveolären Flüssigkeitshaushaltes, wobei es hier, im Gegensatz zu ALI/ARDS aufgrund der globalen hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) und des dadurch bedingten erhöhten transkapillären Drucks zu einem vermehrten Flüssigkeitseinstrom in den Alveolarraum kommt, welcher den Ausstrom von Flüssigkeit aus den Alveolen übersteigt. Sowohl ALI/ARDS als auch HAPE münden in einem alveolären Ödem, bedingt durch die Störung der genannten Ionen-Transportsysteme (I.1.1 schematische Darstellung 1.). Hypoxie spielt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des ALI/ARDS sowie HAPE.

Die Dysregulation der Mechanismen des AST unter Hypoxie sind Teil vieler wissenschaftlicher Untersuchungen, deren Vergleichbarkeit durch Unterschiede der einzelnen Studien in Messart und Ort, Tiergattung, Zellsorte, Dauer und Grad der Hypoxie-Exposition erschwert wird. Die Schlussfolgerung bezüglich der zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen sind jedoch kompatibel.

Beispielsweise stellt sich die alveoläre Flüssigkeitsresorption im *in-vivo* Rattenmodell nach 48 h Exposition von 10 % O₂ um 36 % vermindert dar³⁶, wohingegen der transepitheliale Natrium-Transport, gemessen an den Veränderungen im Potential der Nasenschleimhaut NPD (engl. *nasal potential difference* = NPD), nach 24h Exposition gegenüber 10 % O₂ nur um 24 % vermindert ist³⁷. Beide Studien kommen trotz unterschiedlichem Versuchsaufbau zu dem Ergebnis, dass Hypoxie zu einer verminderten Aktivität der Na,K-ATPase führt. Der Einfluss von Hypoxie auf die Expression von Transportergenen des AFC wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert³⁸, da hier eine verminderte Expression³⁹, unveränderte Expression³⁷ und eine vermehrte Expression⁴⁰ beschrieben wird. Einig sind sich jedoch alle der oben genannten Studien darin, dass Hypoxie zu einem Ungleichgewicht des AFC führt.

Hypoxie blockiert den AFC und bedingt die alveoläre Schrankenstörung und Ödempersistenz in HAPE⁴¹ und ALI/ARDS¹⁹. Die durch Hypoxie hervorgerufene Dysfunktion des AFC bessert sich unter dem Einsatz von β_2 -Sympathomimetika. Dadurch wird das Zusammenspiel

der den AST-Apparat bildenden Bestandteile auf intrazellulärer Ebene optimiert⁴⁰. Die Beobachtung der Hypoxie-induzierten Endozytose der Na,K-ATPase von der basolateralen Membran alveolärer Epithelzellen, welche nicht nur einen abgeschwächten AST, sondern auch verminderten AFC zur Folge hat⁴², unterstützt die Theorie eines durch Hypoxie morphologisch beeinträchtigten AST-Apparates⁴³.

In-vivo Tiermodelle der Lunge^{1, 44-46} gelten als unersetzlich in der Erforschung des AFC, denn hier bleibt das natürliche Gefüge der drei anatomischen Strukturen Alveolarraum, Interstitium und Gefäßsystem erhalten¹. Zur pathophysiologischen Untersuchung der Hypoxie-bedingten Schrankenstörung des Epithels im Alveolarraum wird in dieser Studie das bereits etablierte Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge^{1, 45, 46} um den Modus der alveolären Hypoxie erweitert. Alveoläre Hypoxie soll durch zwei unterschiedliche Methoden im pathophysiologischen Modell der nicht-flüssigkeitsgefüllten Kaninchenlunge induziert werden. Zum einen wird über Verneblung eine gleichmäßige Flüssigkeitsbeladung der distalen Lunge induziert, welche über eine verbreiterte Diffusionsbarriere bei alveolärem Ödem zur lokalen Hypoxie des Epithels führt. Zum anderen wird über Ventilation mit nur 3,0 % Sauerstoff eine direkte Hypoxie im Alveolarraum induziert. Die vorliegende Arbeit versucht daher im intakten Organ Fragestellungen zum pathophysiologischen Einfluss der für HAPE und ARDS pathognomonischen Bestandteile des alveolären Ödems als auch der äußeren umweltbedingten Hypoxie auf den Flüssigkeitshaushalt der distalen Kaninchenlunge zu beantworten. Somit werden die quantitativen und qualitativen Veränderung des AST und der AFC unter lokaler Hypoxie erstmalig unter weitgehend physiologischen Modellbedingungen in der Kaninchenlunge erfasst. Im vorliegenden *ex-vivo* Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge zur Untersuchung des alveolären Natrium- und Wassertransportes wurde anhand von radioaktiven Substanzen der Einfluss von Hypoxie auf den alveolären Flüssigkeitshaushalt evaluiert. Im Gegensatz zu etablierten Modellen der flüssigkeitsgefüllten Lunge^{2, 47-52}, insbesondere der flüssigkeitsgefüllten Kaninchenlunge⁴⁴, bleibt die Ventilation im vorliegenden Modell als physiologischer Faktor erhalten^{53, 54}. Anhand des Übertritts von inerten radioaktiven ²²Na und ³H-Mannitol wird der alveoläre Natriumtransport, Flüssigkeitshaushalt und die epitheliale Barrierefunktion der distalen Lunge beschrieben.

Die bereits am verwendeten Versuchsaufbau durchgeführten und publizierten Hypothermieversuche⁴⁵ weisen bei einer Temperatur von 4° Celsius einen Arrest der physiologischen Transportprozesse des AFC auf. Weitere Untersuchungen an der humanen Lunge und an der Lunge im Tiermodell haben die Möglichkeit einer äquivalente Hemmung

durch Pharmaka aufgezeigt. Hierbei führt Amilorid zu einer Inhibition der apikalen ENaCs und Ouabain zu einer Inhibition der basolateralen Na,K-ATPase des alveolären Epithels⁴. Somit sind wir in der Lage, den Einfluss von Versuchsvariablen wie Flüssigkeitsbeladung oder hypoxische Ventilation der isolierten Lunge, sowohl unter physiologischem als auch unter komplett blockiertem AFC zu vergleichen. Dies erleichtert die Interpretation und der Relation dieser Daten im Vergleich zu anderen Studien und damit dem derzeitigen Stand der Forschung des AFC.

II. Material und Methoden

II.1. Materialien & Substanzen

- Amilorid, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ouabain, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Natrium²², DuPont de Nemours (Brüssel, Belgien)
- H³-Mannitol, DuPont de Nemours (Brüssel, Belgien)
- Gase, Fa. Messer-Griesheim (Herborn, Deutschland)
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9% (NaCl), Braun (Melsungen, Deutschland)
- Ketanest[®], 50 mg/ml (Ketaminbase), Parke-Davis (Berlin, Deutschland)
- Liquemin[®] 25000: 5000 I.E./ml (Na-Heparin), Hoffman La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- NaHCO₃, 8,4 %, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Perfusatlösung, Serag-Wiessner (Naila, Deutschland)
- Rompun[®], 2 % (Xylazolin), Bayer (Leverkusen, Deutschland)
- Xylocain[®] 2% (Lidocainhydrochlorid), ASTRA Chemicals (Wedel, Deutschland)
- Mannitol-Lösung 10% Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Szintillator-Lösung Merck (Darmstadt, Deutschland)

II.2. Geräte

- Blutgasanalysegerät, ABL 330, Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
- Druckaufnehmer Combitrans[®] Monitoring-Set, B. Braun Medical (Melsungen, Deutschland)
- Mehrfachsreiber, Hellige (Freiburg, Deutschland)

- Membranluftfilter für Ventilationssystem, Pall Biomedical Corp. (Fajardo, USA)
- Meßverstärker (Eigenbau)
- Nahtmaterial, Mersilene 4,1 SH, Ethicon (Norderstedt, Deutschland)
- Perfusatfilter, Pall Cardioplegia Plus 0,2 µm, Pall Biomedical Corp. (Fajardo, USA)
- Perfusionssystemschläuche „arterielle Seite“, Tygon, Kalensee (Gießen, Deutschland)
- Perfusionssystemschläuche „venöse Seite“, PVC, Sorin Biomedica (Düsseldorf, Deutschland)
- Peristaltikpumpe, roller pump BP 742, Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)
- Starling Beatmungspumpe, Cat/Rabbit Ventilator 6025, Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
- Thermopumpe, Frigomix 1495, Thermomix 1480, Braun (Melsungen, Deutschland)
- Venenpunktionsbesteck, W.I.N. 25 G, Abott (Sligo, Irland)
- Wägezelle, Typ U1, Hottinger Baldwin Meßtechnik (Langen, Deutschland)
- Na⁺-Ionen Messgerät, Mettler-Toledo (Giessen, Deutschland)
- γ-Counter, Target Systemelectronic GmbH (Solingen, Deutschland)
- PC + Software für γ-Counter-Messung, Target Systemelectronic GmbH, (Solingen, Deutschland)
- β-Probe-Vials á 15 ml für Perfusatproben
- Ultraschall-Vernebler Nebu-Tec (Elsfeld, Deutschland)
- Ultraschall-Vernebler Ultrasonic (Deutschland)
- Atemzugvolumenmessgerät, Ritter (Deutschland)
- Software für biophysikalische Messparameter, Labtech Notebook (USA)
- β-Counter, Packard Instruments (Downers Grove, IL, USA)

II.3. Methoden

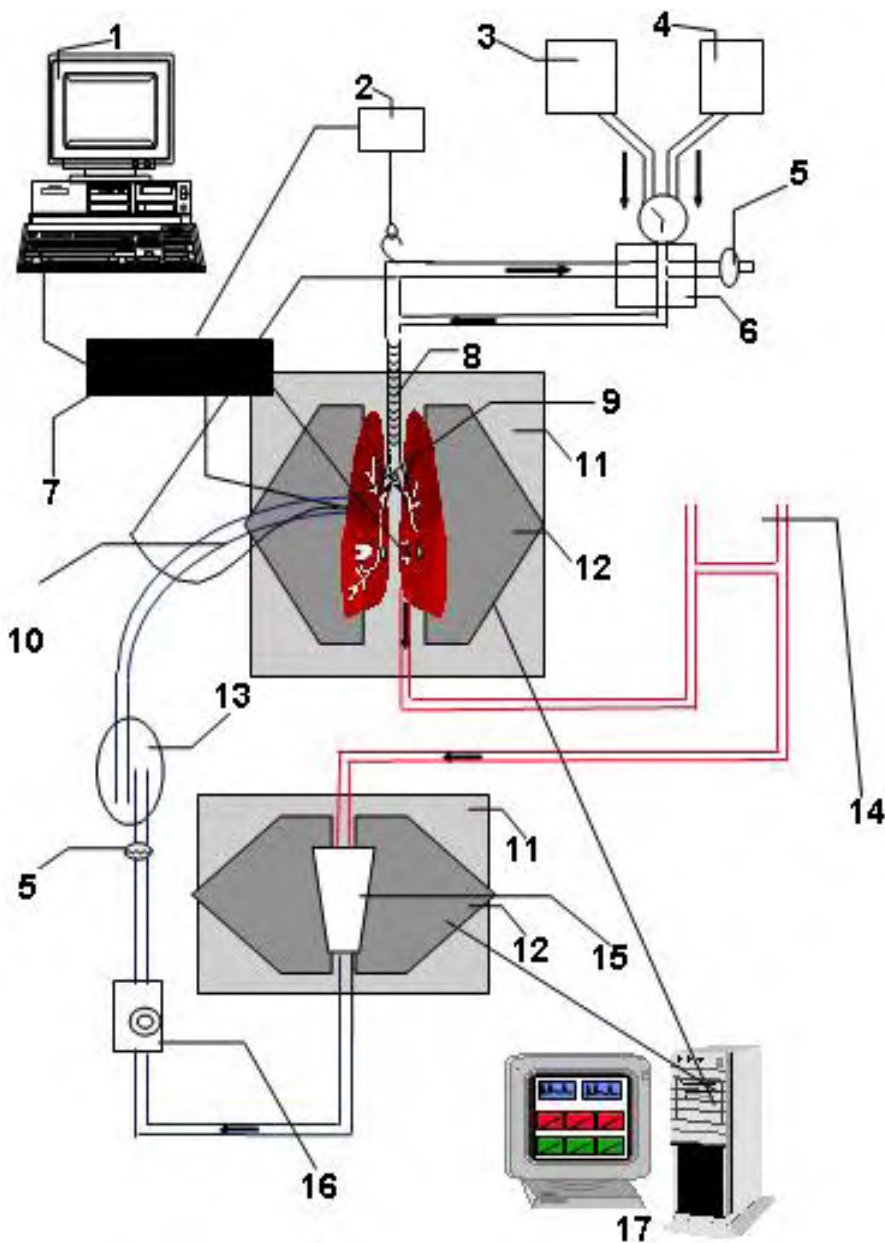
II.3.1. Modell der isolierten Kaninchenlunge

Das Modell der isolierten Kaninchenlunge⁵⁵⁻⁵⁷, erstbeschrieben 1912 durch *Knowlton* und *Starling*⁵⁸, ermöglicht Untersuchungen an einem intakten, isolierten, blutfrei perfundierten und ventilierten Organ. Dieser Aufbau ermöglicht einen von flussbedingten, metabolischen und humoralen Einflüssen des Gesamtorganismus unabhängigen experimentellen Zugang. Physiologische Organreaktionen können mit leichten Modifikationen in verschiedenen Experimenten ohne Beeinträchtigung der komplexen Beziehungen der interzellulären biochemischen Interaktion untersucht werden. Biophysikalische Parameter wie pulmonalarterieller Druck, pulmonalvenöser Druck, Ventilationsdruck und Lungenmasse unterliegen einer Online-Messung. Des Weiteren sind Probenentnahmen aus dem zirkulierenden Perfusat sowie die Durchführung einer broncho-alveolären Lavage bei Versuchsende möglich. Im Rahmen der Untersuchung des alveolar-kapillären Flüssigkeitstransportes ist der Versuchsaufbau um die Messeinrichtung für radioaktiv markierte Nuklide erweitert worden. Diese werden über Verneblung in den Alveolarraum der Lunge eingebracht und ermöglichen Aussagen über den aktiven und passiven alveolären Flüssigkeits- und Ionentransport.

II.3.2. Adaptation des verwendeten Organmodells

Der Lungenmessplatz der vorliegenden Arbeit ist speziell für die Untersuchung der alveolar-epithelialen Flüssigkeitsschranke an der oben genannten isolierten Kaninchenlunge entwickelt worden. Die Modelle anderer Forschergruppen zur Evaluierung des AFC basieren auf Lungen, welche zuvor durch das Instillieren von Flüssigkeit via Mikropunktion der Lunge oder Bronchialkatheter befüllt wurden. Das hier verwendete Modell der isolierten, perfundierten und ventilierte Kaninchenlunge (Schematische Darstellung 2. - Kapitel II.3.3.) ermöglicht die Untersuchung am intakten Organ unter fortgesetzter Ventilation und somit weitgehend physiologischen Bedingungen.

II.3.3. Schematische Darstellung 2. Abbildung der isolierten, perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge



- 1 Computer
- 2 Gewichtsmessung
- 3 Ultraschallvernebler
- 4 Normoxie Gas (Raumluft + CO₂) / Hypoxie Gas
- 5 Filter
- 6 Beatmungsgerät + Messeinheit
- 7 Verstärker der Druck- und Gewichtsmessung
- 8 Trachea
- 9 Pulmonalarterie
- 10 Pulmonalarterien-Katheter
- 11 Bleischutz
- 12 γ -Detektor
- 13 Blasenfalle
- 14 Kaskade für venöse Druckeinstellung und venösen Abfluss
- 15 Perfusatorreservoir
- 16 Peristaltische Pumpe
- 17 Hoch-Voltage and intergrierter Spektrum Analysator

II.3.4. Vorbereitung des Arbeitsplatzes

Der Aufbau des Arbeitsplatzes ist in der Schematische Darstellung 2. (Kapitel II.3.3.) verdeutlicht: Eine Schlauch-Peristaltikpumpe (16) stellt mit pulsierendem Fluss die Perfusion der Lunge (zentral in rot dargestelltes Organ) sicher. Zwei parallelgeschaltete Perfusatbehälter (15) ermöglichen einen Perfusatwechsel ohne Perfusionsunterbrechung. Über die Pumpe (16) erreicht das Perfusionsmedium nach Passage einer Blasenfalle (13) die Pulmonalarterie (9). Die Blasenfalle (13) verhindert somit mögliche Luftembolien, welche einen Teilverschluss der Lungenstrombahn nach sich ziehen könnten. Optional ist die Filtrierung des Perfusates durch einen Zellfilter (5). In der Phase der Organpräparation ermöglicht Letzterer die Separation von aus dem Lungengewebe ausgespülten Zellen wie z.B. Erythrozyten. Das Perfusat gelangt nach Passage der Lungenstrombahn über einen im linken Ventrikel fixierten Katheter und eine sich anschließende Vorrichtung zur Regulation des pulmonalvenösen Druckes (14) zurück in die Perfusatbehälter (15). Es handelt sich um ein geschlossenes, rezirkulierendes System.

Kurz vor Eintritt des pulmonalarteriellen Katheters (10) in die Pulmonalarterie (9) befindet sich eine Injektionsstelle zur Gabe von Agenzien und zur Abnahme von Perfusatproben. Des Weiteren können Agenzien über die Perfusatbehälter (15) zugemischt werden.

Ein hartwandiger Druckmesskatheter liegt im distalen Schenkel des pulmonalarteriellen Katheters (10). Proximal ist der Druckmesskatheter an einen elektromechanischen Druckwandler (7) konnektiert, dessen Signal online auf einem Personal-Computer (1) aufgezeichnet wird. Analog erfolgt die Messung des pulmonalvenösen Druckes im linken Ventrikel. Beatmungsdruck und Atemminutenvolumen (6) werden online (über 1) erfasst. Die Lunge ist an einer Wägezelle (2) fixiert, deren elektronische Messungen ebenfalls online (über 1) registriert werden.

Die doppelwandigen Reservoirgefäße (15) und ein Thermalbad (nicht dargestellt) für den zuführenden pulmonalarteriellen Katheter (10) erwärmen das Perfusat auf eine Zieltemperatur von 37,5 °C. Die während der Präparation notwendige Kühlung des Perfusates auf 4 °C erfolgt analog durch ein Kühlgerät (nicht dargestellt). Die Lunge wird in einem abgedeckten, bleiummantelten Trog (11) positioniert, um der Austrocknung und Auskühlung der Organoberfläche entgegen zu wirken. Der Bleimantel dient dem im weiteren Verlauf notwendigen Strahlenschutz.

Das synthetische sterile Perfusionsmedium (Krebs-Henseleit Puffer, Serag Wiesner AG) hat folgende Zusammensetzung :

NaCl	125,0 mmol
KCl	4,0 mmol
CaCl ₂	2,4 mmol
KH ₂ PO ₄	1,1mmol
MgCl ₂	1,3 mmol
Glucose	15,3 mmol
HAES	50g / 1000ml

Die aufgeführte Perfusatzusammensetzung resultierte in einem physiologischen pH-Wert des Perfusatmediums zwischen 7,35 und 7,45. Der initiale Volumenfluss (Perfusat 4°C während Lungenpräparation – Kapitel II.3.5.) beträgt 17 ml/min, der parallel zur Erwärmung des Organs (Perfusat 37,5 °C nach Organintegration - Kapitel II.3.6.) auf 100 ml/min gesteigert wird. Nach Erreichen der maximalen Perfusionsgeschwindigkeit und der Zieltemperatur schließt sich die initiale Beobachtungsphase (*steady state*) an. Der pH-Wert wurde während des *steady state* standardisiert kontrolliert. Nur präparierte Lungen, die über den *steady state* von 30 min Druck- und Gewichtsstabil sind, werden in die Untersuchung aufgenommen.

Die Kleintier-Beatmungspumpe (6) stellt die volumenkontrollierte Ventilation der Lunge sicher. Das Tidalvolumen beträgt 30 ml mit einer Beatmungsfrequenz von 30 min⁻¹. Der positiv endexpiratorischen Druck (engl. *positive end-expiratory pressure* = PEEP) zur Verhinderung eines Kollapses der peripheren Atemwege liegt bei 1 cm Wassersäule.

Die Beatmungsgase haben folgenden Konzentration (alle Angaben in Volumenprozent):

- Raumluft ($G_R = 21,0 \% O_2, 0,04 \% CO_2, 78,9 \% N_2$)
- Normoxisches Gasgemisch ($G_N = 21,0 \% O_2, 5,3 \% CO_2, 73,7 \% N_2$)
- Hypoxisches Gasgemisch ($G_H = 3,0 \% O_2, 5,3 \% CO_2, 91,7 \% N_2$)

Durch einen Dreiwegehahn ist der sofortige Wechsel von Raumluft G_R auf die angegebenen Gasgemische G_N oder G_H möglich. Der Versuchsablauf sieht vor, dass nach 30-minütigem *steady state* mit anschließendem Perfusatwechsel die Lungen für weitere 125 min je nach Versuchsgruppe entweder weiter mit normoxischen Gasgemisch (G_N) oder mit hypoxischen

Gasgemisch (G_H) ventiliert werden. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Perfusatproben kontrolliert. Die Korrektur eines sauren pH-Milieus unter 7,35 kann durch eine Zugabe von Bicarbonat (NaHCO_3 8,4 %) erfolgen. Vor dem Hintergrund einer alkalischen Schädigung des Lungengewebes wurde der Einsatz dieser alkalischen Substanz kritisch gesehen und nur höchst zurückhaltend durchgeführt.

Vor jedem Versuch wird das System mit 3000 ml destilliertem Wasser (Aqua Dest.), 2000 ml isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) und anschließend 2000 ml sterilem Perfusionsmedium ohne Rezirkulierung durchspült, damit neben Hygiene und Isotonie auch die Entfernung sämtlicher im System verbliebener Luftblasen gewährleistet wird. Unter anschließender Rezirkulation des Systems wird das Perfusat unter laufender Kühlung über 45 min bis zum Ende der Tierpräparation auf 4°C gehalten. Ein in den Perfusatfluss eingeschalteter Filter (5) stellt die Partikel- und Zellfreiheit sicher.

II.3.5. Vorbereitung des Versuchstiers und Lungenpräparation

Kaninchen weiblichen und männlichen Geschlechts mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $\pm 3,0$ kg und einem Alter von 4-5 Monaten werden mit Ketamin (Ketanest®) und Xylazin (Rompun®) im Mischungsverhältnis 3:2 analgosediert und mit 1000 IE Heparin pro kg Körpergewicht antikoaguliert. Als venöser Zugang dient eine marginale Ohrvene. Nach ausreichender Sedation bei persistierender Spontanatmung appliziert man Xylocain-Lösung (2,0 %) 3 cm unterhalb des Larynx am ventralen Hals. Anschließend kann die Trachea unter Schonung der großen Gefäße und der *Nervi vagi* mobilisiert werden. Nach erfolgter Tracheostomie wird eine Trachealkanüle eingebracht und durch äußere Ligatur fixiert. Die initiale Beatmung erfolgt mit Raumluft (30 ml Hubvolumen / Frequenz 30 min^{-1} / PEEP 1 cm H₂O) Die Narkose wird bei gesicherter maschineller Beatmung über 10 min bis zum Stadium der völligen Analgesie und Relaxation unter palpatorischer Kontrolle der Herzfrequenz vertieft.

Daraufhin erfolgt die weiträumige Mobilisierung der Haut durch Schnitte über dem Sternum und entlang der Rippenbögen. Die Oberbauchlaparotomie erfolgt über eine Inzision im Epigastrium mit anschließender Anklebung des *Prozessus xiphoideus* und einer breiten Eröffnung des Abdomens entlang der Rippenbögen unter Schonung des Diaphragmas. Die stumpfe Ablösung des Diaphragmas ermöglicht die Eröffnung der Pleurahöhlen ohne Lungenverletzung. Nun erfolgt unter fortlaufender Beatmung die mediane Sternotomie und die stumpfe Entfernung des Thymusgewebes. Nach der Perikarderöffnung werden Aorta und Pulmonalarterie mit je einem Faden angeschlungen.

Zu diesem Zeitpunkt wird die Beatmung auf das normoxische Gasgemisch mit 5,3 % CO₂-Zusatz umgestellt, um eine optimale pH-Wert-Einstellung unter bevorstehender kalter Perfusion der Lunge mit Bikarbonat-gepuffertem Perfusionsmedium zu ermöglichen. Auf die am schlagenden Herzen angebrachte Inzision des Ausflusstraktes des rechten Herzens, erfolgt das sofortige Einbringen und Fixieren des pulmonalarteriellen Katheters. Der Katheter ist mit 4°C kaltem Perfusat blasenfrei gefüllt, so dass die Perfusion sofort mit einem Fluss von 17 ml/min gewährleistet wird. Um einem Abflusswiderstand zu verhindern, wird die Herzspitze resiziert. Anschließend erfolgt die Ligatur der Aorta proximal des Koronararterienabgangs und somit die vollständige perfusions- und ventilationsseitige Trennung vom Körperkreislauf, welches die Tötung des Tieres in tiefer Narkose zur Folge hat. Diese Technik ermöglicht eine Präparation der Lunge ohne die Gefahr einer Luftembolie in der Lungenstrombahn.

II.3.6. Organintegration in das Ventilations- und Perfusionssystem

Nach Durchtrennung der Vena cava inferior und superior sowie der Aorta und vorsichtigem Lösen des retromediastinalen Bindegewebes wird das perfundierte und ventilierte Herz-Lungen-Präparat atraumatisch in einem speziellen Präparationsständer angebracht. Der funktionlose rechte Ventrikel wird nun entfernt und der linke Ventrikel unter vorsichtiger Herauslösung der Papillarmuskeln frei präpariert. Unter Verwendung einer `Tabaksbeutel-Naht´ wird ein gebogener Katheteranschluss mit einem Durchmesser von 8 mm intramural eingenäht und fixiert. Hiermit wird die Geschlossenheit des rezirkulierenden Perfusionssystems sichergestellt. Vor Integration des Organs ins Messsystem wird nun noch das linke Herzhorn abgebunden, um eine fehlerbehaftete Druckmessung zu vermeiden. Das Präparat wird vorsichtig von anhängendem Bindegewebe befreit.

Nach Sicherung aller Anschlüsse wird die Lunge an der Wägezelle hängend in dem vom Bleimantel eingefassten Trog plaziert und der venöse Abflussschenkel mit dem im linken Ventrikel fixierten Katheter verbunden. Bei kontinuierlicher Registrierung des pulmonalarteriellen Druckes, pulmonalvenösen Druckes, Ventilationsdruckes, des Lungengewichtes und des pH-Wertes erfolgt unter stetig steigendem Perfusionsfluss von 17 ml/min auf 100 ml/min die gleichzeitige Steigerung der Temperatur von 4 °C auf 37,5 °C über einem Zeitraum von ca. 15 min. Nach Erreichen der Zieltemperatur wird die PEEP-Beatmung mit 1 cm Wassersäule begonnen. Im sich nun anschließenden *steady state* wird die Untersuchungstauglichkeit kontrolliert, an dessen Ende ein kompletter Perfusataustausch und die Entfernung des Zellfilters stehen. Die Untersuchungstauglichkeit wird anhand der geforderten Einschlusskriterien festgemacht. Diese sind eine homogene, nach dem Ausspülen des Blutes weiße Oberfläche der Lunge ohne Anzeichen von Atelektasen, eine Konstanz der Druck- und Gewichtsmesswerte, das Einhalten der Perfusions- (4 - 8 mmHg) und Beatmungsdrücke (6 -11 mmHg) sowie die vollständige Dichtigkeit des Schlauchsystems und der Konnektionsstellen zwischen diesem und dem Organ.

Der Nullpunkt der Druckwandler wird vor jedem Versuch auf der Höhe des Lungenhilus gegen atmosphärischen Druck abgeglichen, eine Eichung erfolgt mit einem Eichgerät nach *Gauer*⁵⁹. Der pulmonalvenöse Druck wird auf 2 mmHg eingestellt, um expiratorisch Zone III-Bedingungen nach *West*⁶⁰ in allen Lungenarealen zu garantieren.

II.3.7. Verneblungssystem

Zur Verneblung der verschiedenen Lösungen mit und ohne Agenzien wird im Modell ein Ultraschall-Vernebler verwendet. Die Gabe einer Trägersubstanz (z.B. 0,9% NaCl) ohne enthaltenen Wirkstoff wird als *sham* bezeichnet. Der Vernebler wird vor der Lunge in den inspiratorischen Beatmungsschenkel über eine Parallelschaltung eingebaut (siehe (3) Schematische Darstellung II.3.3.) . Eine Infrarotlichtbestrahlung des Beatmungsschlauchs verhindert die Kondensierung von Substanzen innerhalb des Schlauchsystems. Diese Parallelschaltung ermöglicht die kontinuierliche PEEP-Beatmung und verhindert damit einen Kollaps der Atemwege. Zur Bestimmung des vernebelten Volumens wird der Vernebler vor und nach dem Verneblungsintervall gewogen.

II.3.8. Pharmaka Ouabain und Amilorid

Ouabain (g-Strophanthin) hemmt die an der basolateralen Seite des Alveozyten sitzende Na,K-ATPase durch irreversible Bindung an deren α -Untereinheit. 2,2 mg Ouabain wird in 20 ml sterilem Perfusat aufgelöst. Die Konzentration beträgt 0,11 mg/ml Ouabain und wird falls erforderlich mit NaHCO₃ auf pH-Werte im physiologischen Bereich zwischen 7,35 und 7,45 eingestellt. Nach systemischer Gabe führt dies zu einer Ouabainkonzentration von 10^{-5} mol im Perfusat. Nach 20 min wird nicht-Protein-gebundenes Ouabain durch einen erneuten Perfusatwechsel aus dem System entfernt.

Amilorid (N-Amidino-3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2-carboxamid) hemmt die apikalen ENaCs durch reversible Bindung an die extrazelluläre Matrix der Alveolyzten. 11,39 mg Amilorid wird in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst um nach Verneblung eine Konzentration von 5×10^{-4} mol in der ELF zu erreichen. Die systemische Applikation erfolgt durch Ultraschall-Verneblung mittels Nebu-Tec-Vernebler. In der 2 min dauernden Verneblungsphase werden ca. 500 – 600 μ g der amiloridhaltigen Lösung in die distalen Verzweigungen der Bronchien aerosoliert.

Die Hemmung der Ionen-Kanäle und –Pumpen des Natrium-Transportes wurde 60 min nach Versuchsbeginn vorgenommen, wobei im Versuch ohne Hemmung die Gabe einer äquivalenten Menge an jeweiligem Vehikel ohne Wirkkomponente erfolgte, welches hier als Sham bezeichnet wird.

II.3.9. Nuklide ^{22}Na und ^3H -Mannitol

Für die Aerosolierung der radioaktiven Substanzen wird ein Ultraschall-Vernebler der Firma Ultrasonic verwendet. Vor der Verneblung der Nuklide wird der Vernebler mit physiologischer NaCl-Lösung gespült, um eventuelle Nuklidreste früherer Versuche sicher zu entfernen.

Der Vernebleransatz sieht eine Radioaktivität von $10\ \mu\text{Ci}$ für ^{22}Na und von $55\ \mu\text{Ci}$ für ^3H -Mannitol vor. Das benötigte Volumen an jeweiliger Nuklidlösung, welches mit der Aktivität zum Versuchszeitpunkt x (t_x) korreliert, wird unter Kenntnis der Halbwertszeiten und der Aktivität (t_0) berechnet. Der Vernebleransatz wird auf ein Gesamtvolumen von $5100\ \mu\text{l}$ erhöht, um eine β -Counter-Probe zur Aktivitätsbestimmung ($100\ \mu\text{l}$) zu erhalten.

Während der 10-minütigen Verneblungsphase bildet sich $1,6\ \text{ml}$ Aerosol, wovon ca. 30 % in der distalen Lunge deponiert werden. Der befüllte Vernebler wird kurz vor dem Verneblungszeitpunkt in den inspiratorischen Schenkel des Beatmungssystems eingebaut und von einem Bleischutz eingefasst. Die Radioaktiv-Verneblung wird 20 min nach dem Start der γ -Spektroskopie für die Dauer von 10 min durchgeführt. Der Vernebler wird vor und nach Verneblung gewogen. Während der Verneblung wird mittels Infrarot-Bestrahlung des Beatmungssystems ein Ausfall des Aerosols und damit eine Tropfenbildung verhindert. Nach Beendigung des Versuchs wird der Vernebler wieder aus dem System entfernt und der Ansatzrest der initialen $5000\ \mu\text{l}$ Tracer-Mixtur in einem speziellen Sondermüllbehälter entsorgt.

Da das Arbeiten mit Radioaktivität eine Umstellung des Systems der Perfusion und der Ventilation der isolierten Lunge erfordert, ist das System in einem Sicherheitsbereich untergebracht, der über ein spezielles Filtersystem und einen gesonderten Ventilationsgasabzug verfügt.

II.3.10. Flüssigkeitsbeladung der Alveole über Ultraschallverneblung

Eine Versuchsreihe zeigt die Verneblung von definierten Flüssigkeitsmengen unter normoxischer Ventilation. Durch diese Dauerverneblung mit alveolärer Flüssigkeitsbeladung soll eine Ödembildung der distalen Atemwege induziert werden. Die Durchführung orientiert sich an dem Schema des allgemeinen Versuchsablaufes (Kapitel II.4.1.). Die Flüssigkeitsbeladung wurde hier nach AST Blockade (OA) zum Zeitpunkt der Radioaktiv-Verneblung durchgeführt. Mit einem Ultraschall-Vernebler wurde über einen Zeitraum von 10 min eine durchschnittliche Verneblung von 7,5 ml NaCl (standard error of the mean (SEM) +/- 0,37), welches in einer Deposition von ca. 2,5 ml NaCl pro Lunge resultiert.

II.3.11. Broncho-alveoläre Lavage

Für die broncho-alveoläre-Lavage (BAL) ist eine plasma- und somit Perfusat-isotone Spüllösung nötig⁶¹, die frei von Na⁺-Ionen ist. Daher wird 10 % Mannitol mit destilliertem Wasser verdünnt, um eine Lösung mit der Zielosmolarität von 300 mosmol zu erhalten. Es werden 30 ml dieser Lösung in einer Perfusorspritze zusammen mit 5 ml Raumluft aufgezogen. Die Raumluft dient der Berücksichtigung des während der Lavage zu vernachlässigenden Totraumvolumens der Trachea. Das Volumen der Spülflüssigkeit erklärt sich aus einem geschätzten broncho-alveolären Gesamtvolumen von 50 ml. Hierbei entfallen 2/5 des Volumens auf den linken und 3/5 auf den rechten Lungenflügel, somit 30 ml BAL-Spülflüssigkeit auf die rechte Lunge.

Direkt nach Beendigung des Versuchs werden die Lungen in eine Vorrichtung gebracht, die nach Abbinden des linken Lungenflügels und dem Anbringen ein Adapters, der eine dichte Verbindung zwischen Perfusorspritze und Trachealkanüle ermöglicht, die problemlose Lavage der rechten Lunge gewährleistet. Hierzu wird 30 ml Spülflüssigkeit in die rechte Lunge über einen Zeitraum von 10 sec instilliert und im selben Zeitrahmen wieder abgesaugt. Durch dreimaliges Wiederholen dieses Vorgangs von je 20 sec wird für die Durchführung der BAL ein standardisiertes Zeitfenster von einer Minute festgelegt.

II.3.12. Biophysikalische und biochemische Messung

II.3.12.1. Theoretischer Hintergrund der radioaktiven Messung

Die Untersuchung der alveolären Epithelschranke an dem verwendeten experimentellen Aufbau geht auf *Ghofrani et al.* zurück⁴⁶. Dabei wird mittels eines Ultraschallverneblers eine homogene, alveoläre Deposition der beiden radioaktiven Markierstoffe (engl. *tracer*) ^{22}Na und ^3H -Mannitol in den distalen Atemwegen der isolierten Kaninchenlunge erreicht, mit dem Ziel die alveolar-epitheliale Schranke unter physiologischen Bedingungen zu charakterisieren. Diese alveolar-epitheliale Flüssigkeitsresorption der Lunge ist an die Resorption von Na^+ -Ionen, die passiv H_2O -Moleküle mitziehen, gebunden. Um neben der transzellulären auch die parazelluläre Resorption zu beurteilen, wird radioaktivmarkiertes ^3H -Mannitol, ein inertes Kohlenhydrat mit hohem Molekulargewicht, verwendet. Das als *tracer* für die transzelluläre Flüssigkeitsverschiebung verwendete ^{22}Na wird online durch γ -Spektroskopie erfasst. Der Aufbau der γ -Counter sowohl um den Lungentrog, als auch um den Perfusatbehälter ermöglicht die Aufnahme der γ -Strahlung über Lunge und Perfusat. Die halbminütigen Messungen der Counts lassen sich in Form einer Kurve darstellen. Diese beschreibt über der Lunge eine abfallende Kurve (engl. *decrease rate* = DR) und im Perfusat eine ansteigende Kurve (engl. *increase rate* = IR). Der jeweilige Graph lässt sich durch eine Exponentialfunktion berechnen.

Standardisierte und wiederholte Perfusatproben anhand eines festgelegten Zeitschemas ermöglichen es, den Übertritt von ^3H -Mannitol aus dem Alveolarraum ins Perfusat zu erfassen und lassen sich nach Auswertung im β -Counter als Exponentialfunktion darstellen.

II.3.12.2. Auswertung der ^{22}Na -Daten

Das ^{22}Na -Ion ist ein gamma-Strahler (γ -Strahler). Die Aufzeichnung dieser γ -Strahlung wird über Lunge und Perfusat vorgenommen wie in der schematischen Darstellung der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge (Kapitel II.3.3.) aufgeführt: Je zwei γ -strahlendetektierende Kameras (engl. *γ -counter*) (12) bilden ein System um den Lungentrog (11) und um das Perfusatreervoir (15). Vorrichtungen im Bleischutzmantel (11) ermöglichen die optimale, reproduzierbare Positionierung der *γ -counter* über Lunge und Perfusat. Vor Aufzeichnungsstart wird eine *γ -counter-Software* auf dem PC gestartet und die γ -Kameras geeicht.

Die γ -Spektroskopie wird vor Beginn der Nuklidverneblung gestartet. Es werden 130 Messungen bis zum Versuchsende durchgeführt, wobei ein Messintervall 30 Sekunden umfasst. Kurz nach der 10 minütigen Nuklidverneblung wird ein Depositionsmaximum an ^{22}Na über der Lunge beobachtet. Nach Ablauf der gesamten Messung wird die über Lungengewebe und Perfusat gemessene Anzahl der radioaktiven ^{22}Na -Zerfallereignisse (engl. *^{22}Na counts*) unter dem jeweiligen Versuchsdatum abgespeichert. Anhand der Auswertung der γ -counter Daten lässt sich jeder Versuch als Exponentialfunktion in Form einer Kurve der progredienten Abnahme (engl. *clearance*) des *tracers* graphisch darstellen. Diese Funktion beschreibt eine Steigung *a*, einen Exponent *x* sowie eine Fläche (engl. *area*) unter der Kurve (engl. *curve*).

Zunächst berechnen wir die Gesamtfläche (engl. *whole area*) *A*:

$$A_{\text{whole}} = (100 \text{ (counts in \%)} \times \text{time (Radioaktive Messungen in min)})$$

Im Anschluss wird die Fläche unter der ^{22}Na -Zerfallskurve $A_{\text{underC}^{22}\text{Na}}$ berechnet. Für die Kalkulation dieser *area under the curve* $A_{\text{underC}^{22}\text{Na}}$ brauchen wir die Exponentialfunktion der Kurve sowie die zugehörige Asymptote, welche den virtuellen Nullpunkt der Exponentialfunktion darstellt.

Die beiden oben genannten Kurven ermöglichen die Berechnung der *area above the curve*, welche die Fläche $A_{\text{aboveC}^{22}\text{Na}}$ der absoluten Clearance darstellt:

$$A_{\text{aboveC}^{22}\text{Na}} = A_{\text{whole}} - A_{\text{underC}^{22}\text{Na}}$$

Anhand des Detektorauswertungsprogramms ist eine Kalkulation der Exponentialfunktion und der Asymptote nach Einfügen der Originaldetektordaten für jeden einzelnen Versuch möglich.

Das Ablesen der Parameter ist anhand des zugehörigen Lungendiagramms möglich

Somit ergibt sich für die Berechnung der $A_{\text{aboveC}^{22}\text{Na}}$ folgende Formel:

$$A_{\text{aboveC}^{22}\text{Na}} = ((100 - \text{Asymptote}) * 50) - ((100 - \text{Asymptote}) / e^{\text{Funktion}}) * (1 - \text{EXP}(e^{\text{Funktion}} * 50))$$

Die Zahl 50 stellt hier die Zeit der Radioaktivmessung in Minuten dar.

II.3.12.3. Berechnung und Präsentation der aktiven und passiven Komponente des alveolären Natrium-Transportes

Es wird ein Mittelwert der Flächen ($A_{\text{aboveC}^{22}\text{Na}}$) für die jeweilige Versuchsgruppe berechnet, wie im vorangestellten Kapitel beschrieben. Die Kontrolle (Normoxie) wird mit 100% als Referenz gesetzt. Die übrigen Gruppen werden zu dieser Gruppe in Relation gesetzt und als relative Prozentzahlen angegeben. In vorherige Studien^{45, 46, 62} wurde die Methode zur Ermittlung des aktiven Anteils des AST unter Normoxie ermittelt. Hierzu wurden Hypothermieversuche bei 4° C durchgeführt, die zu weitgehend kompletter Blockade des AST^{45, 46, 62} führten. Der verbleibende Transport stellt den passiven Transport dar. Der passive Transport ist, wie die Mannitol-Daten in Kapitel III.3.3. - Abbildung 4 belegen, in allen Versuchsgruppen gleich. Daher können die Veränderungen in der ²²Na-Resorptionskurve einer Veränderung des aktiven Anteils des AST zugeschrieben werden. So wird die Fläche des aktiven Anteils des AST A_{aktiv} einer Versuchsgruppe im relativen Verhältnis zur Fläche $A_{\text{aktiv Kontrolle}}$ der Kontrollgruppe (Sham) dargestellt. Vor dem Hintergrund eines nicht beeinflussten passiven, parazellulären Transportes kann die Fläche und somit der prozentuale Anteil des aktiven Transportes unter Normoxie und Hypoxie wie folgt berechnet werden:

$$A_{\text{aktiv+ passiv}} = A_{\text{aktiv}} + A_{\text{passiv}} \Leftrightarrow A_{\text{aktiv}} = A_{\text{aktiv+ passiv}} - A_{\text{passiv}}$$

\cap (\cap = und)

$$A_{\text{passiv Kontrolle}} = A_{\text{passiv Versuchsgruppe}} \times \text{konstant}$$

Der aktive Anteil des AST unter Normoxie wird wie folgt berechnet:

$$\text{Aktiver Anteil des AST in Prozent} = (A_{\text{aktiv}} / A_{\text{aktiv Kontrolle}}) \times 100$$

II.3.12.4. Auswertung der ^3H -Mannitol-Daten

Sowohl ^{22}Na als auch das ^3H -Mannitol geben beta-Strahlung (β -Strahlung) ab. Aufgrund der kurzen Reichweite der β -Strahlung von nur ein bis zwei Zentimetern ist keine suffiziente *online*-Messung dieser Strahlung im vorliegenden Versuchsaufbau möglich. Die standardisierte Messung ist durch Herrn Gerd Weigand in der zentralen biotechnischen Betriebseinheit des Strahlencentrums der Justus-Liebig-Universität erfolgt. Die Auswertung für Mannitol wird mit einem Messgerät für β -Strahlung (= engl. *beta-counter*) durchgeführt. Die β -Strahlung des Isotop ^{22}Na wird über dessen gleichzeitig vorhandene γ -Strahlung berechnet. Anschließend wird diese von der Gesamt- β -Strahlung subtrahiert, so dass man nur die von ^3H -Mannitol abgegebene β -Strahlung erhält.

Zu standardisierten Zeitpunkten werden dem venösen Schenkel des Perfusionssystems Proben entnommen. Die erste β -Probe wird 1 min vor Verneblung der radioaktiven Substanzen, also zum Zeitpunkt $t_{-1 \text{ min}}$ durchgeführt. Die weiteren Proben der insgesamt acht Perfusatproben werden zu den Zeitpunkten $t_{6 \text{ min}}$, $t_{11 \text{ min}}$, $t_{16 \text{ min}}$, $t_{21 \text{ min}}$, $t_{31 \text{ min}}$, $t_{51 \text{ min}}$ und $t_{60 \text{ min}}$ jeweils ausgehend von dem Zeitpunkt der radioaktiven Verneblung $t_{0 \text{ min}}$ durchgeführt. Die Entnahme der Proben ist in ihrem Ablauf standardisiert.

Die ^3H -Counter Rohdaten der zu bestimmten Versuchszeitpunkten gewonnenen Proben, ermöglichen nach Übertritt des ^3H -Mannitol-Tracer ins Perfusat die Beschreibung einer Nuklid-Anstieg-Rate. Diese Kurve, welche den parazellulären Transport beschreibt, wird ebenfalls durch eine e-Funktion beschrieben. Die Exponenten dieser e-Funktionen können miteinander verglichen werden.

II.3.12.5. Berechnung des epithelialen Flüssigkeitssaums der Alveole

Die Berechnung der ELF geht von der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit aus. Die Natrium-Konzentration in der BAL $[\text{Na}]_{\text{BAL}}$ wird mit dem Natrium-Messgerätes Mettler-Toledo ermittelt. $[\text{Na}]_{\text{BAL}}$ ermöglicht die Berechnung des Volumens der ELF:

$$(\mathbf{V_{BAL} + V_{ELF}}) \times [\mathbf{Na}]_{\text{BAL}} = \mathbf{V_{ELF}} \times [\mathbf{Na}]_{\text{ELF}}$$

$$\Leftrightarrow \mathbf{V_{ELF}} = (\mathbf{V_{BAL}} \times [\mathbf{Na}]_{\text{BAL}}) / ([\mathbf{Na}]_{\text{ELF}} - [\mathbf{Na}]_{\text{BAL}}).$$

$$\circ \mathbf{V_{BAL} = 30 \text{ ml und } [\mathbf{Na}]_{\text{ELF}} = 154 \text{ mmol}}$$

Da die BAL aus dem rechten Lungenflügel stammt und somit nur 3/5 der Lunge berücksichtigt ^{45, 46, 51}, muss das Ergebnis, um die ELF der Gesamtlunge zu erhalten, mit 5/3 multipliziert werden:

$$\mathbf{V_{ELF}} = (\mathbf{V_{BAL}} \times [\mathbf{Na}]_{\text{BAL}}) / ([\mathbf{Na}]_{\text{ELF}} - [\mathbf{Na}]_{\text{BAL}}) \times \mathbf{5/3}$$

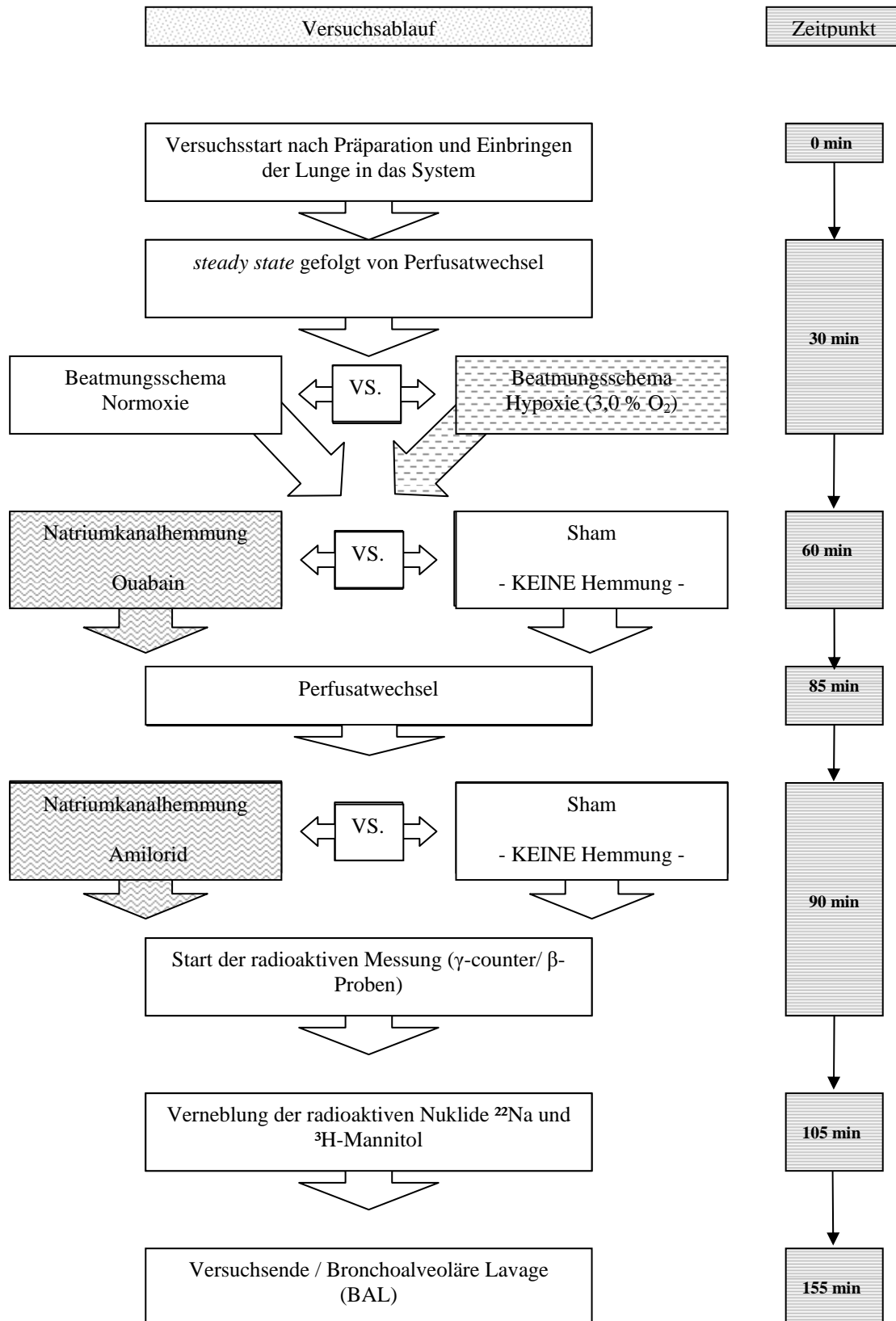
II.3.13. Statistik

Die präsentierten Daten sind Mittelwerte \pm mittlere Standardabweichung (engl. *standard error of the mean* = SEM). Nur in der Darstellung des Na^{22} -Abfalls (Kapitel VII.1.2. Tabelle 2) wird jeweils die Standardabweichung (engl. *standard deviation* = SD) verwendet. Der Student t-test ist a posteriori benutzt worden. Der Signifikanzgrad wird für den Student t-test auf folgende Werte festgelegt:

$p \geq 0,05$	<i>n.s.</i>
$p \leq 0,05$	*
$p \leq 0,01$	**
$p \leq 0,001$	***

II.4. Durchführung der Experimente

II.4.1. Schematische Darstellung 3. Abbildung des allgemeinen Versuchsablaufes

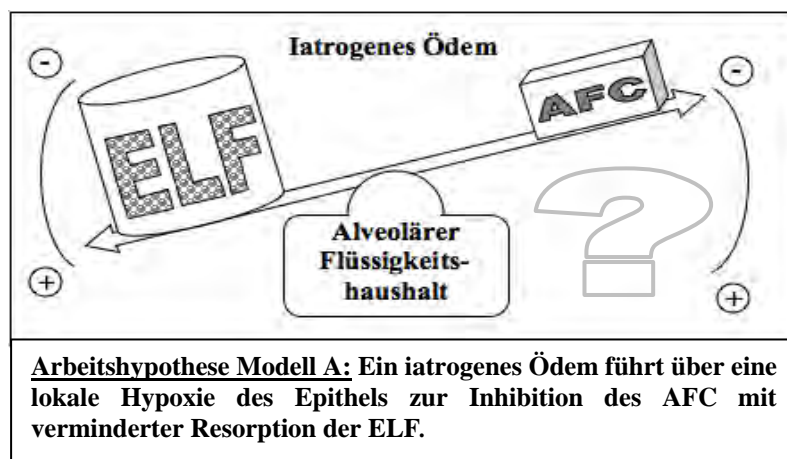


II.5. Modell A: Allgemeine Untersuchung des Flüssigkeitshaushaltes unter gleichmässiger Flüssigkeitsbeladung der Alveole

Im Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchen Lunge wird ein Lungenödem induziert. Ziel ist die gesonderte Untersuchung des Faktors Flüssigkeit im Lungenflüssigkeitshalt der Kaninchenlunge. Hintergrund ist hier die Tatsache, daß ein alveoläres Ödem einen pathognomonischen Bestandteil in Erkrankungen wie dem Höhenlungenödem (HAPE) oder dem akuten Lungenversagen (ALI/ARDS) darstellt.

II.5.1. Resorptionsnorm unter massiver Beladung der Alveolen mit isoosmolarer Flüssigkeit

Durch Volumenverneblung wird isoosmolare Flüssigkeit in die Alveole eingebracht. Damit wird ein alveoläres Ödem unter erhaltener Ventilation mit normoxischem Atemgas simuliert. Das alveoläre Ödem führt zu einer Verbreiterung der Diffusionsbarriere. Die Arbeitshypothese nimmt als Folge eine lokaler Hypoxie des darunter liegenden Epithels an. Des Weiteren wird eine mögliche Schädigung der epithelialen Barriere untersucht. Zur Evaluierung dieser Thesen wird die Leistung der alveolären Flüssigkeitresorption (AFC) anhand der ELF-Volumina bestimmt. Unter physiologischen Bedingungen stellt die Resorption von Natrium die treibende Kraft der AFC darstellt. Ob dies ebenfalls unter den Bedingungen eines alveolären Ödems zutrifft, wird unter pharmakologischer Blockade des alveolären Natriumtransportes mit Ouabain und Amilorid evaluiert.



II.6. Modell B: Allgemeine Untersuchung des Flüssigkeitshaushaltes unter Hypoxie

Im Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchen Lunge wird alveoläre Hypoxie über Ventilation mit 3,0 % Sauerstoff induziert. Ziel ist die gesonderte Untersuchung der Folgen des Faktors Hypoxie im Lungenflüssigkeitshalt der Kaninchenlunge. Hintergrund ist hier die Tatsache, daß Hypoxie einen weiteren pathognomonischen Bestandteil in Erkrankungen wie dem Höhenlungenödem (HAPE) oder dem akuten Lungenversagen (ALI/ARDS) darstellt.

II.6.1. Untersuchungen zum Natriumtransport in der Alveole unter dem Einfluss von Hypoxie

Die alveoläre Flüssigkeitsresorption (AFC) unter Normoxie wird mit der unter Hypoxie verglichen. Untersucht wird die Resorption von Natrium als treibende Kraft des AFC unter physiologischen Bedingungen und unter Hypoxie. Zusätzlich wird je eine Gruppe pharmakologischer Hemmung des AFC unter Hypoxie und Normoxie durchgeführt, um Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen bei möglichen Veränderungen zu zulassen. Der Übertritt von radioaktiv markiertem ^{22}Na aus den Alveolen in das Perfusat wird hierbei für jede Gruppe anhand einer Kurve beschrieben. Die Resorptionsleistung des alveolären Natriumtransportes wird nach zwei Stunden Versuchsdauer evaluiert.

II.6.2. Untersuchung zum parazellulären, alveolären Flüssigkeitstransport unter Hypoxie

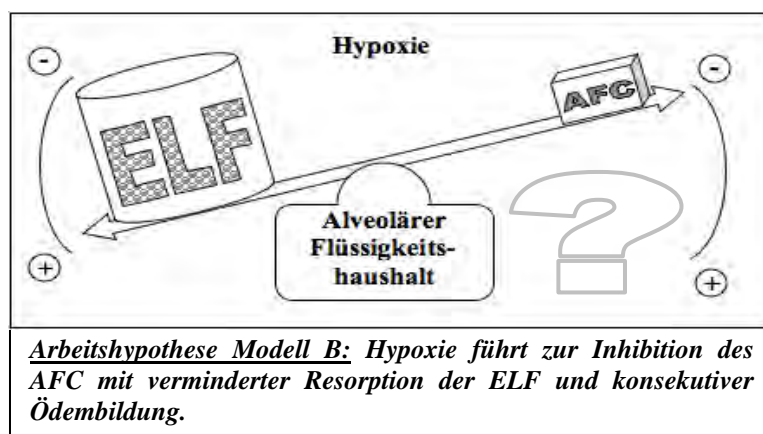
Der Übertritt von ^3H -Mannitol aus dem Alveolarraum in das Perfusat beschreibt als inertes Makromolekül den passiven, parazellulären Transportweg. Dies lässt Rückschlüsse auf eine eventuelle Schädigung der epithelialen Barriere durch alveoläre Hypoxie zu. Der passive Transport, welcher bei intakter Barrierefunktion unverändert bleibt, wird für die Modi Normoxie, Hypoxie und jeweiliger pharmakologischer Blockade des alveolären Natriumtransport evaluiert.

II.6.3. Untersuchung des aktiven und passiven alveolären Natriumtransport

Der alveoläre Natriumtransport aus der Alveole in das Interstitium baut den Gradienten für die Resorption von Flüssigkeit aus der Alveole auf. Die treibende Kraft für diesen energieabhängigen Transport stellt den aktiven Anteil des alveolären Natriumtransportes (AST) dar. Dieser AST wird in einen aktiven Anteil und Gesamt-AST differenziert, wodurch eine getrennte Untersuchung des aktiven AST unter Normoxie und Hypoxie ermöglicht wird. Durch pharmakologische Beeinflussung des Amilorid- und Ouabain-sensitiven Natriumtransportes lassen sich Rückschlüsse auf Ursachen möglicher Hemmungen des AST unter Hypoxie ziehen.

II.6.4. Untersuchung des alveolären Flüssigkeitsvolumens unter Hypoxie

Um zu klären, ob zweistündige Hypoxie zur Flüssigkeitsretention mit Ausbildung eines alveolären Ödems führt, wird das Flüssigkeitsvolumen der distalen Lunge bestimmt. Über eine bronchoalveolärer Lavage (BAL) am Versuchsende wird die die Alveolen auskleidende Flüssigkeit (ELF) definiert. Die Volumina der ELF bzw. deren Resorption charakterisieren die Leistung der AFC. Durch pharmakologische Beeinflussung des Amilorid- und Ouabain-sensitiven Natriumtransportes lassen sich Rückschlüsse auf Ursachen möglicher Hemmungen des AST unter Hypoxie ziehen. Weil die Resorption der ELF wiederum an den alveolären Natriumtransport gebunden ist, lassen sich in Zusammenschau die zuvor gewonnenen Ergebnisse evaluieren und gegebenenfalls bezüglich des alveolären Natriumtransportes unter Hypoxie bestätigen.



III. Ergebnisse

III.1.1. pH-Werte des Perfusats im Normbereich

Vor dem Hintergrund einer möglichen Schädigung des Lungengewebes wurden die pH-Werte des Perfusates engmaschig kontrolliert. Der pH-Wert des Perfusates lag in den vorliegenden Versuchen im physiologischen Bereich zwischen pH 7,35 und pH 7,45. Insbesondere der Einsatz von Natriumbicarbonat (NaHCO_3) zum Ausgleich eines sauren pH-Wertes, welches bei übermäßiger Alkalisierung des Perfusates zu einer sofortigen Schädigung der Lunge und damit zum Ende des Versuches geführt hätte, war in keinem Versuch indiziert.

III.2. Alveolärer Natriumtransportes unter massiver Flüssigkeitsbeladung

III.2.1. Untersuchungen zum Flüssigkeitshaushalt in Bezug zum epithelialen Flüssigkeitssaums bei unterschiedlichen Flüssigkeitsbeladungsschemata

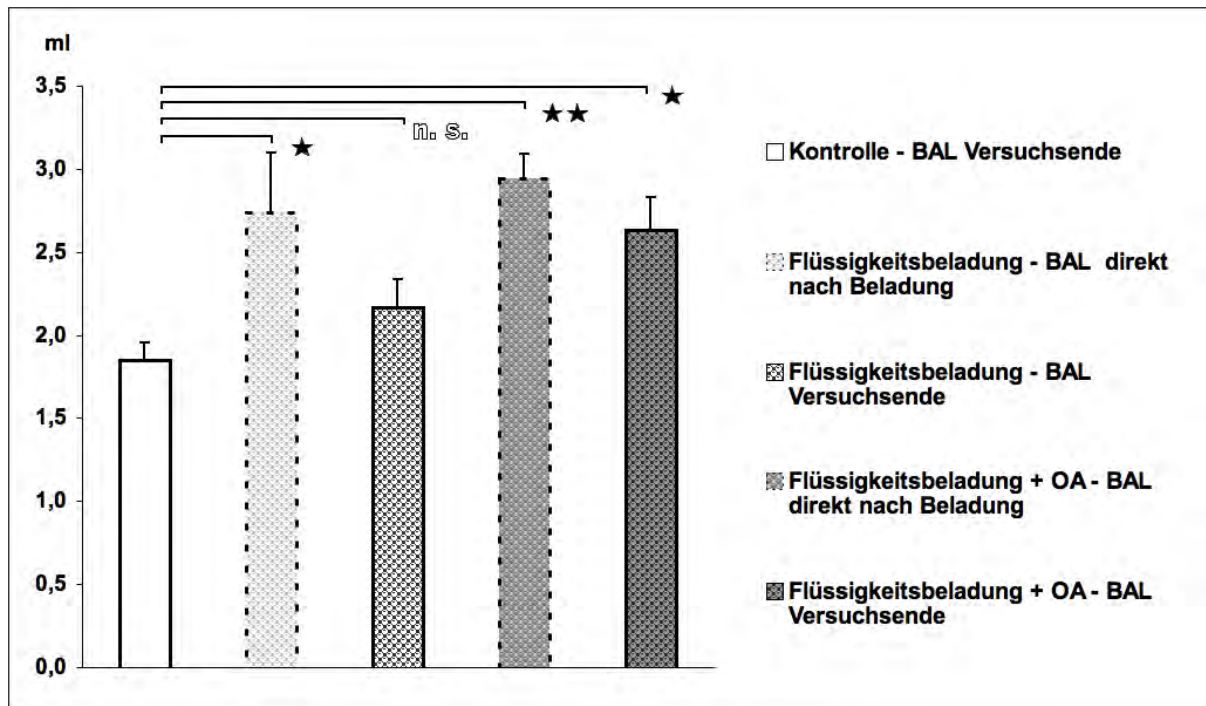
Unter normoxischer Ventilation wird mit einem Ultraschallvernebler über einen Zeitraum von 10 min eine Dauerverneblung durchgeführt, welche zu einer durchschnittlichen Deposition von ca. 2,5g NaCl pro Lunge führt. Wie in der Abbildung 1 dargestellt kommt es zur Ausbildung eines alveolären Ödems, da sich in der bronchioalveolären Lavage die ELF-Volumina direkt nach Beladung signifikant erhöht zeigen. Die Flüssigkeitsdeposition in der distalen Lunge ist zu diesem frühen Zeitpunkt mit und ohne pharmakologische Hemmung durch Ouabain und Amilorid (OA) identisch. Diese Reproduzierbarkeit weist auf eine gute Funktionalität der angewandten Methode hin.

Bereits eine Stunde nach alveolärer Ödeminduktion findet sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (Normoxie ohne Hemmung) ein nicht mehr signifikant erhöhtes ELF-Volumen. Folglich hat eine suffiziente Resorption des experimentell induzierten Ödems in der distalen Lunge stattgefunden. Dagegen findet sich das ELF Volumen unter pharmakologische Hemmung (OA) der Flüssigkeitsresorption am Versuchsende weiterhin signifikant erhöht. In diesem Fall hat keine Resorption der deponierten Flüssigkeit stattgefunden.

Die Resorptionsmechanismen der distalen Lunge zeigen sich im Modell der isolierten Kaninchenlunge unter massiver Flüssigkeitsbeladung der distalen Lungenabschnitte voll

funktionsfähig. Die verantwortlichen Mechanismen lassen sich durch die Applikation von Amilorid und Ouabain signifikant hemmen.

Die zu Abbildung 1 gehörenden Daten der ELF-Volumina sind in Tabelle 1 für jede Versuchsgruppe dargestellt.



III.2.2. **Abbildung 1.** ELF bei experimentellem Ödem

ELF der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge nach massiver Flüssigkeitsbeladung der Alveolen *via* Verneblung. Die ELF-Volumina direkt nach Flüssigkeitsbeladung ohne (2. Säule) und mit (4. Säule) OA-Hemmung sind gegenüber der Kontrolle (1. Säule) signifikant erhöht. Nach einer Stunde Resorption findet sich in der Gruppe ohne OA-Hemmung (3. Säule) ein nicht mehr signifikant erhöhtes ELF Volumen. Unter OA-Hemmung (5. Säule) bleibt die ELF weiterhin signifikant erhöht. (Mittelwerte + SEM; n-Zahl siehe Tabelle 01; p-Wert: * <0,05 / ** <0,01 / * <0,001 / n.s. = nicht signifikant)**

III.3. Alveolären Natriumtransport unter Hypoxie

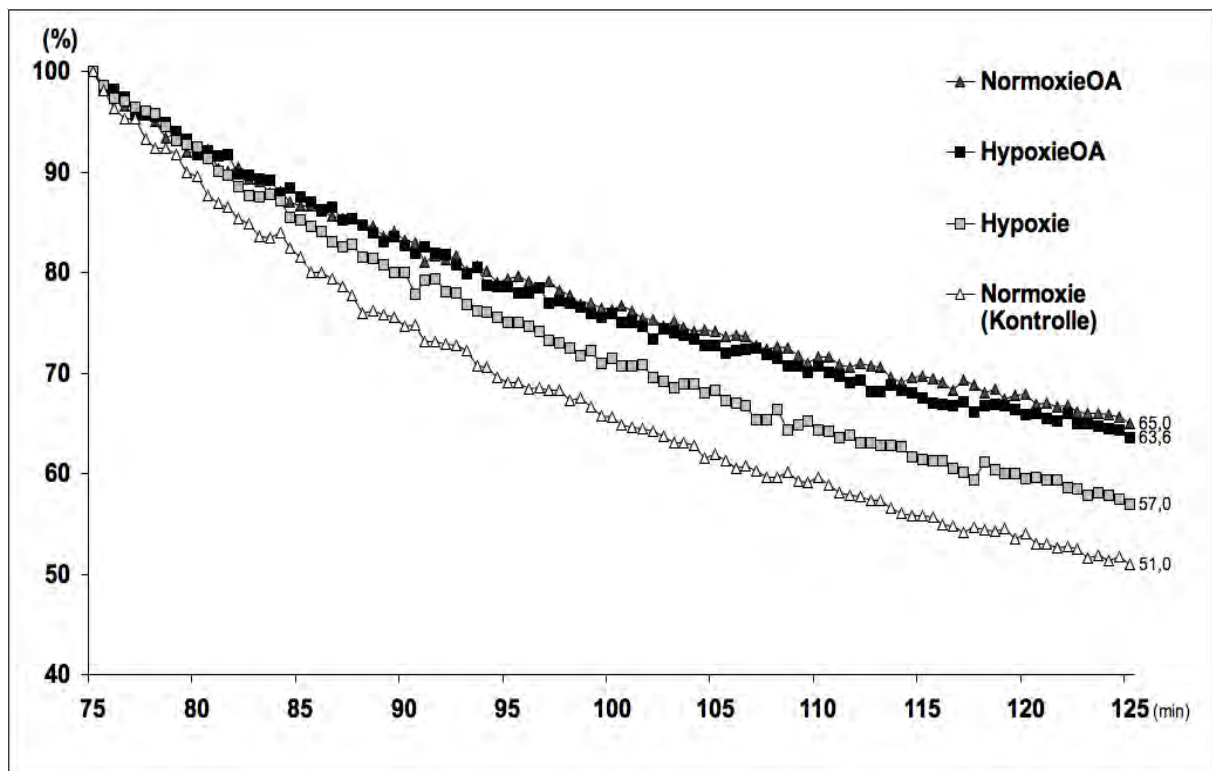
III.3.1. Hemmung des alveolären Natriumtransportes durch Hypoxie

In Abbildung 2 sind die Werte des über der Lunge detektierten ^{22}Na als *decrease-rates* (engl. Nuklid-Abfall-Rate = DR) dargestellt. Ausgehend von einer maximalen Deposition des radioaktiven ^{22}Na -Tracers in der Lunge (100 %) wurden die Abfallraten für die Mittelwerte der vier Versuchsreihen dargestellt. Hierbei wurde zur besseren Darstellung auf die Abbildung der Standardabweichung verzichtet, welche jedoch der Tabelle 2 (siehe Anhang) entnommen werden kann.

Die Kontrollgruppe wird durch die Normoxiegruppe ohne Hemmung dargestellt. Die pharmakologische AST-Blockade führt zu einer signifikanten Inhibition der Rückresorption von ^{22}Na . Dies zeigt sich in einem flacheren Verlauf der korrespondierenden DR, wobei sich die Graphen der Gruppen mit AST-Blockade sowohl unter Normoxie als auch mit Hypoxie annähernd deckungsgleich zeigen. Unter hypoxischer Ventilation findet sich keine zusätzliche AST-Hemmung nach bereits erfolgter Ouabain- und Amiloridgabe.

Akute Hypoxie führt umgehend zu einem Abfall des alveolären Natriumtransportes: Die DR für ^{22}Na der Hypoxie-Gruppe ohne pharmakologische AST-Blockade zeigt sich abgeflacht, findet sich jedoch mittig zwischen den Werten der Kontrolle und denen der pharmakologisch AST-blockierten Gruppen für Normoxie und Hypoxie.

Die graphische Darstellung der DR unter Hypoxie weist auf eine sofortige Inhibition der AST abhängigen AFC hin, welche sich eindeutig auf die Ventilation mit Hypoxie zurückführen lässt. Insgesamt fällt diese Inhibition im Vergleich zu einer kompletten pharmakologischen Blockade aber wesentlich milder aus. Die Werte zum Versuchsende werden im Folgenden miteinander verglichen (Abbildung 3 und Tabelle 3).



III.3.2. **Abbildung 2.** ^{22}Na -decrease-rates über der Lunge

Die ^{22}Na -DR über der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge wird durch Hypoxie und/oder Ouabain und Amilorid (OA) gehemmt. Die AST-Hemmung ist in Hypoxie + Ouabain und Amilorid (HypoxieOA) und NormoxieOA ähnlich. Alleinige Hypoxie führt zu einer milderer aber dennoch signifikanten Hemmung. Die Standardabweichung wurde in der Abbildung 2 zugunsten einer besseren Visualisierung ausgelassen. (Mittelwerte; n = 6 pro Gruppe)

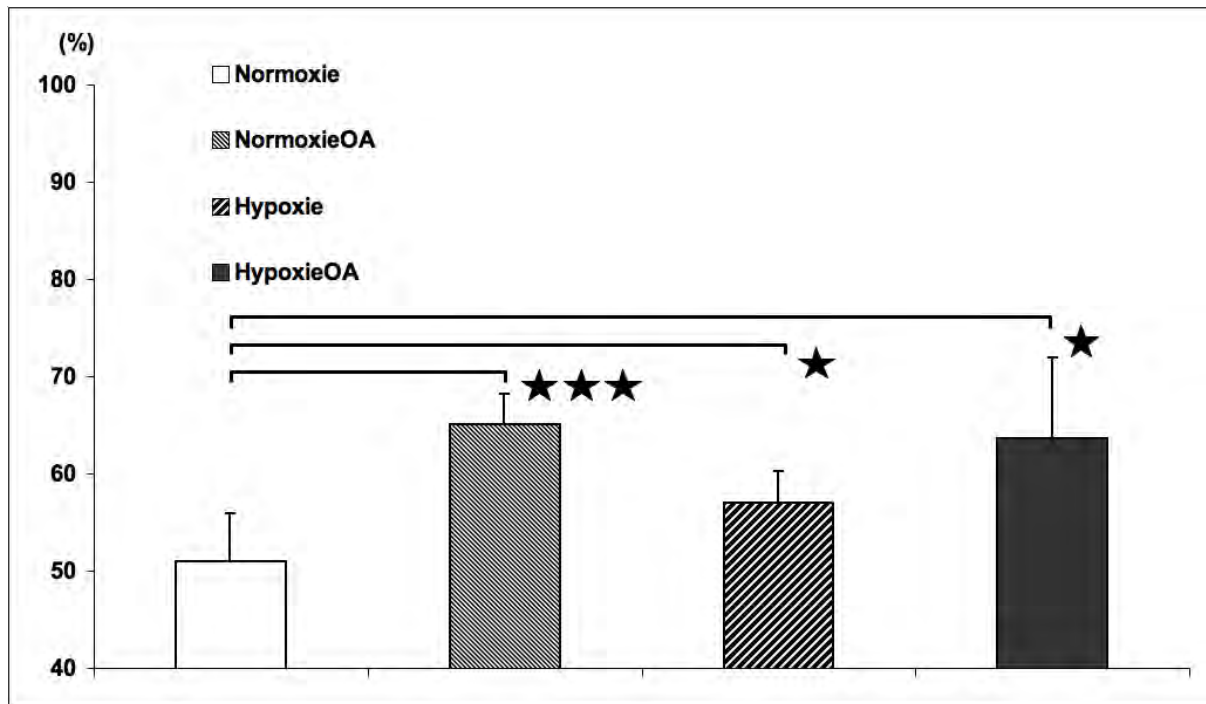
III.3.3. Hemmung des alveolären Natriumtransportes nach zweistündiger Hypoxie

Die Werte der DR (Abbildung 2) am Versuchsende werden im Folgenden herausgestellt und miteinander verglichen. Akute Hypoxie führt zu einem signifikanten Abfall des alveolären Natriumtransportes, wie in Abbildung 3 dargestellt. Ausgehend von einer hundertprozentigen Deposition des radioaktiven ^{22}Na -Tracers in der Lunge zum Versuchsbeginn lag die Rest-Aktivität von ^{22}Na in der Lunge nach 125 min Versuchsdauer in der Normoxie-Gruppe bei 51,0 %, verglichen mit 57,0 % in der Hypoxie-Gruppe. Unter AST-Blockade fanden sich 63,6 % Rest-Aktivität in der HypoxieOA- und 65,0 % in der NormoxieOA-Gruppe.

Wie in Abbildung 3 dargestellt ist der Abfall des AST in der Hypoxie-Gruppe (3.Säule) gegenüber der Kontrollgruppe (1.Säule) signifikant. Mit einer Rest-Aktivität von 57,0 % nach 125 min findet sich verglichen mit 51,0 % in der Kontrollgruppe eine relative Hemmung auf 87,8 % der Werte der Kontrollgruppe.

Verglichen zur Kontrolle ist die Resorption auf 71,4% für die NormoxieOA (2.Säule) und 74,3% für die HypoxieOA-Gruppe (4.Säule) vermindert. Unter Einsatz von Amilorid und Ouabain findet sich eine Blockade der AFC, welche keinen zusätzlichen den AST-hemmenden Effekt durch hypoxische Ventilation erkennen lässt.

Nach 125 min Hypoxie wird eine Blockade des AST erreicht, welche 44,4% der totalen Blockade des AST unter Ouabain/Amilorid Hemmung darstellt. Somit findet sich eine partielle Inhibition des Na-Transportes im Alveolarraum unter Hypoxie.



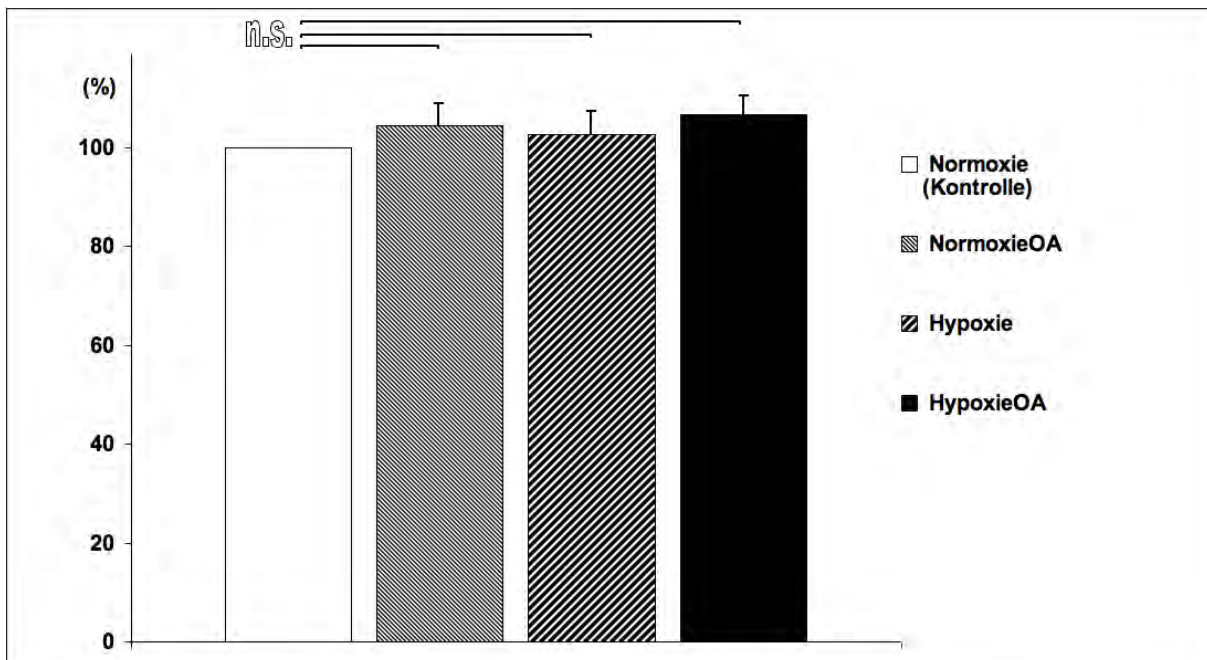
III.3.4. **Abbildung 3.** ^{22}Na in der Lunge zum Versuchsende

^{22}Na -tracer in der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge wird durch Hypoxie und/oder Ouabain und Amilorid (OA) gehemmt. Die signifikante OA-Hemmung zum Versuchsende ist in HypoxieOA (63,6%) und NormoxieOA (65,0%) ähnlich. Alleinige Hypoxie (57,0%) führt zum Versuchsende zu einer mildereren, aber gegenüber Normoxie (51,0%) dennoch signifikanten Hemmung des AST. (Mittelwerte + SEM; n = 6 pro Gruppe; p-Wert: * <0,05 / ** <0,01 / *** <0,001 / n.s. = nicht signifikant)

III.4. Eigenschaften des passiven Flüssigkeitstransportes

III.4.1. Stabiler parazellulärer H³-Mannitol Transport

Durch β -Counter-Messungen der kontinuierlich abgenommenen Perfusatsproben wurden jeweils die mittleren Zerfallsraten pro Minute errechnet. Die Datenpunkte in Tabelle 4 (siehe Anhang) weisen die prozentuale Bereinigung (engl. *clearance*) von ³H-Mannitol über die Zeit auf. Die parazelluläre Permeabilität, getestet durch den Übertritt des Makromoleküls aus dem Alveolarraum in das Perfusat, wies keinen Unterschied innerhalb der Versuchsgruppen auf. Der parazelluläre Transport, wie in Abbildung 4 dargestellt, wurde somit weder durch pharmakologische AFC-Blockade noch durch Hypoxie beeinflusst.



III.4.2. Abbildung 4. Der parazelluläre Transport

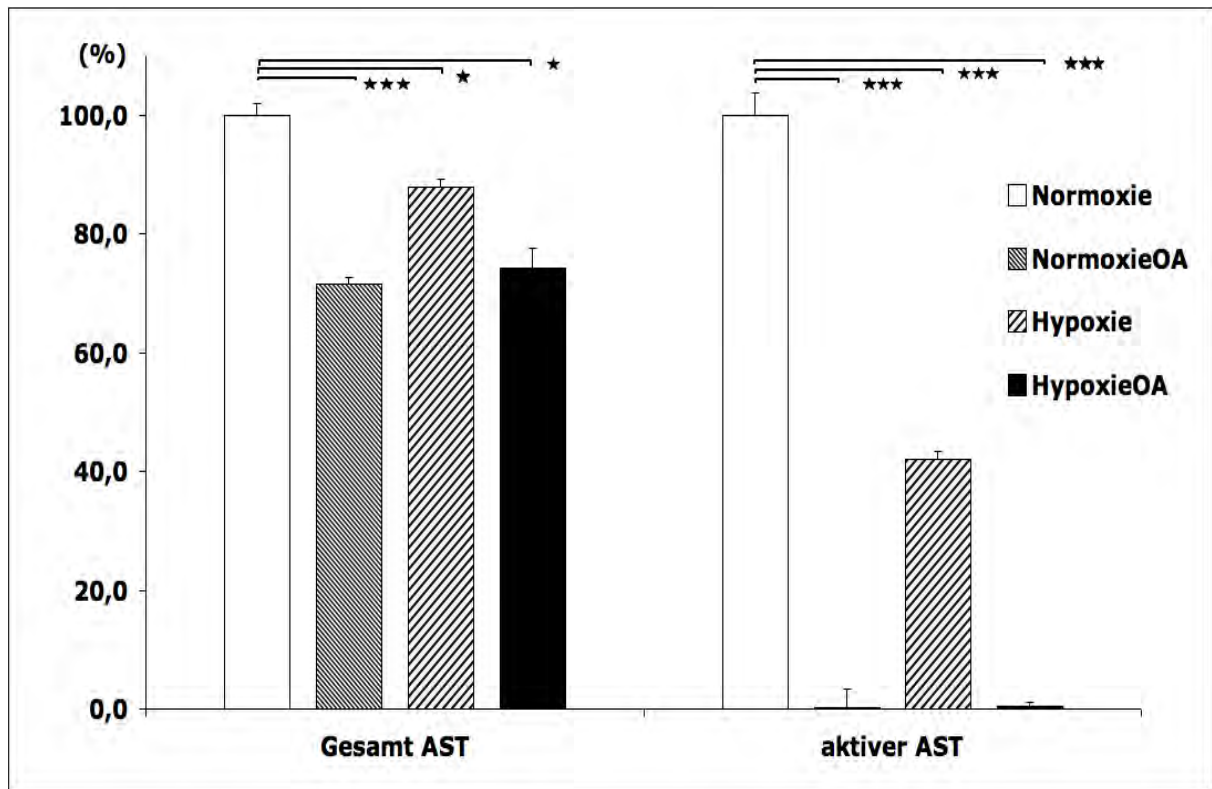
Der passive, parazelluläre Transport wird weder durch OA noch durch Hypoxie beeinflusst. Normoxie (Kontrolle) wurde als Referenz für den parazellulären Transport benutzt (100%). (Mittelwerte + SEM; n = 6; p-Wert: * <0,05 / ** <0,01 / * <0,001 / n.s. = nicht signifikant)**

III.5. Eigenschaften des aktiven alveolären Natriumtransportes

III.5.1. Hypoxie hemmt den aktiven Natrium-Transport

Aus eigenen vorherigen Studien mit Hypothermieversuchen am vorliegenden Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge ist bekannt, dass der Ouabain- und Amilorid-sensitive AST den Grossteil des Gesamt-AST ausmacht. Der AST wurde in einen aktiven und passiven Anteil differenziert, indem die Gesamt-AST-²²Na-Tracer-Elimination in eine aktive, transzelluläre Komponente und eine passive AST-Komponente, bestehend aus trans- und parazellulärem Transport, unterteilt wurde. Die HypoxieOA und NormoxieOA stellen die Gruppen der pharmakologische AST Blockade dar, wobei der aktive Na-Transport vollständig inhibiert ist. Der aktive AST liegt hier, wie in Tabelle 5 (siehe Anhang) dargestellt, bei 0% im Gegensatz zu unveränderten 100 % der Kontrolle (Normoxie).

Dagegen findet sich im Vergleich von Hypoxie und Normoxie nach 125 minütiger Expositionsdauer ein signifikanter, relativer Abfall von 58 % für den aktiven Anteil des AST. Das entspricht somit einem Abfall des aktiven AST auf 42 % des Ausgangswertes, wie in Abbildung 5 dargestellt. Die aktive Resorption von Natrium ist unter Hypoxie somit partiell gehemmt.



III.5.2. **Abbildung 5.** Gesamter OA-sensitiver ^{22}Na -Transport und aktiver Anteil am Ende des Versuches

Der aktive Anteil des Amilorid- und Ouabain-sensitiven AST ist in der NormoxieOA und HypoxieOA Gruppe komplett blockiert. Unter Hypoxie ist der aktive AST gegenüber Normoxie (Kontrolle) signifikant verringert (Mittelwerte + SEM; n = 6 p-Wert: * <0,05 / ** <0,01 / * <0,001 / n.s. = nicht signifikant)**

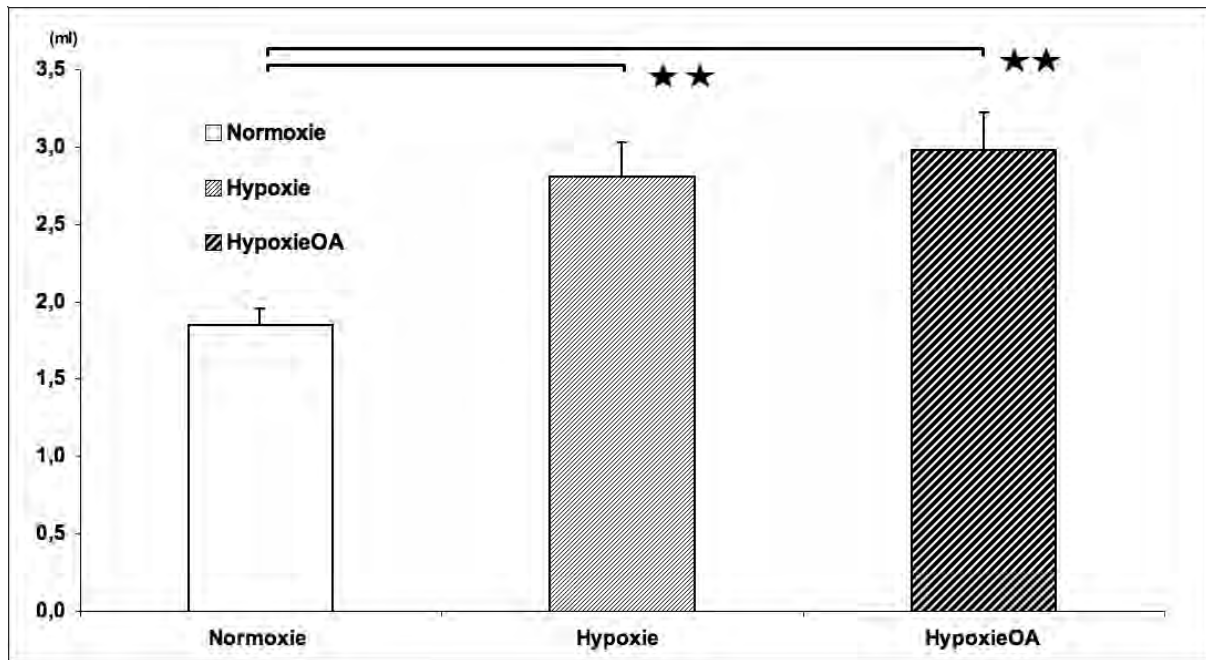
III.6. Resorption des epithelialen Flüssigkeitsraums der Alveole

III.6.1. Anstieg der Volumina des alveolären Flüssigkeitsraums unter Hypoxie

Zum Versuchsende wurde eine bronchioalveoläre Lavage durchgeführt. In Abbildung 6 findet sich zunächst das ELF-Volumen der Kontrollgruppe am Versuchsende unter Normoxie. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass das im Versuchsablauf via Verneblung eingebrachte Volumen unter Normoxie in einem Zeitraum von einer Stunde vollständig resorbiert wurde. Daher sind Ausgangs- und Endvolumen der ELF unter Normoxie identisch (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu der *restitutio ad integrum* unter Normoxie (Abbildung 6 - 1.Säule) kommt es sowohl unter Hypoxie (2. Säule) als auch HypoxieOA (3.Säule) zu keiner Resorption der erhöhten ELF-Volumen. Die Volumina beider Gruppen zeigen sich zum Versuchsende erhöht. Die relative Volumenzunahme bei Flüssigkeitsretention in der Hypoxie-Gruppe beträgt zum Versuchsende im Vergleich zur Kontrolle 51,8%. Unter AFC- Blockade mit Ouabain und Amilorid findet sich zum Versuchsende eine relative Zunahme um 61,1%. Somit kommt es weder unter HypoxieOA noch unter alleiniger Hypoxie zu einer Resorption des alveolären iatrogenen Ödems.

Unter Hypoxie findet sich daher eine Rest-Aktivität des AFC, da die Hypoxie-Gruppe im Vergleich zu der HypoxieOA-Gruppe eine geringere Flüssigkeitsretention aufweist. Das zurückgehaltene ELF-Volumen fällt hierbei 10% kleiner aus als unter gleichzeitiger AST-Blockade. Somit führt zweistündige Hypoxie im verwendeten Modell zur Persistenz eines alveolären Ödems.



III.6.2. **Abbildung 6.** Epithelialer Flüssigkeitssaum zum Ende des Versuches

Zweistündige Hypoxie führt im verwendeten Modell zu einem signifikant erhöhten ELF-Volumen. Zusätzliche AST-Blockade (OA) führt zu einer weiteren relativen Volumenzunahme von ungefähr 10%. (Mittelwerte + SEM; n = 6; p-Wert: * <0,05 / ** <0,01 / * <0,001 / n.s. = nicht signifikant)**

IV. Diskussion

Der physiologische Gasaustausch der Lunge basiert auf einer intakten alveolar-epithelialen Barriere. Pathologisch bedingte Veränderungen der distalen Lunge beinhalten daher zumeist ein Versagen der aktiven wie auch passiven Barrierefunktion. Erkrankungen wie das Höhenlungenödem (engl. *high altitude pulmonary edema* = HAPE)^{35, 63, 64} und das akute Lungenversagen (engl. *acute respiratory distress syndrome* = ARDS)^{33, 65, 66} oder ein Beinahe-Ertrinken⁶⁷ können daher zu einem alveolären Ödem mit folgenschwerem Organversagen führen. Der Einfluss alveolärer Hypoxie auf die aktiven Resorptionsmechanismen des alveolären Epithels⁶⁸ ist bisher nur unzureichend unter physiologischen Bedingungen untersucht worden. Zur Beschreibung der alveolar-epithelialen Schranke sind zumeist Modelle der flüssigkeitgefüllten Lunge^{2, 47-52}, insbesondere der flüssigkeitgefüllten Kaninchenlunge⁴⁴ verwendet worden.

Im vorliegenden *ex-vivo* Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge zur Untersuchung des alveolären Natrium- und Wassertransportes, vormals beschrieben durch Ghofrani *et al.*^{45, 46, 62}, wird der Einfluss von Hypoxie auf den alveolären Flüssigkeitshaushalt (engl. *alveolar fluid clearance* = AFC) evaluiert. Anhand von radioaktiven Markern wird der alveoläre Natriumtransport (engl. *alveolar sodium transport* = AST), die AFC und die epitheliale Barrierefunktion der distalen Lunge unter alveolärer Normoxie und Hypoxie, sowie unter alveolärer Flüssigkeitsbeladung beschrieben.

IV.1.1.1. Der alveoläre Flüssigkeitshaushalt wird durch alveoläre Flüssigkeitsbeladung angeregt

In den Alveolen findet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, die ELF (engl. *epithelial lining fluid* = ELF), welcher einen Teil der von den Atemgasen zu durchdringenden Diffusionsbarriere darstellt. Das physiologische Gleichgewicht der ELF wird durch einen kontinuierlichen ein- und auswärtsgerichteten Volumenfluss *via* AFC aufrechterhalten²¹. Die treibende Kraft der AFC ist der aktive transzelluläre Transport von Natrium aus der Alveole in das Interstitium, welcher entlang der alveolar-epithelialen Barriere einen osmotischen Gradienten aufbaut, der zur passiven Resorption von Wasser führt²¹.

In initialen Versuchen der isolierten, perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge haben wir über eine gleichmässige Flüssigkeitsdeposition ein alveoläres Ödem der Lunge induziert. In der Arbeitshypothese ist postuliert, dass ein experimentell-induziertes alveoläres Ödem zu lokaler Hypoxie mit AST-hemmenden Effekt führt ^{4, 69, 70}. Der AST zeigt sich jedoch trotz signifikanter Volumendeposition in der Alveole (siehe Abbildung 1) voll funktionsfähig: Im Zeitraum von nur einer Stunde wird das in die Lunge vernebelte *Mehr-Volumen* (engl. *excess fluid load*) von ca. 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung resorbiert. Die AFC wird hierbei, wie bereits in der Literatur vorbeschrieben ^{4, 26, 71, 72}, über den Ouabain- und Amilorid-sensitiven AST bewerkstelligt, da sich unter Blockade des AST (OA-Gruppen) im selben Zeitraum eine nur mässige Resorption des alveolären Ödems (siehe Abbildung 1 und 6) zeigt. Die physiologische Resorptionsrate für ELF im Kaninchenmodell ist nominell nicht bestimmt worden. Dennoch ist unter physiologischen Verhältnissen von einer Balance zwischen Einstrom und Ausstrom von Flüssigkeit auszugehen ⁷³.

Aufgrund der hier dargestellten zeitnahen Resorption der *excess fluid load* ist eine den Anforderungen entsprechende Regulation der AFC denkbar. In der Literatur wird eine Leistungsadaptation für den AFC bereits beschrieben ^{38, 74-77}. Damit ist von einer tragenden Rolle der ENaC und Na,K-ATPase bei der Resorption alveolärer Flüssigkeit in diesem pathophysiologischen Modell auszugehen, welches im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit noch weiter diskutiert werden wird.

Ein direkter Vergleich zu den Ergebnissen des Modells der flüssigkeitsgefüllte Lunge ist aufgrund des unterschiedlichen Versuchsaufbaus schwierig. Diese Modelle haben unbestritten zu wegweisenden Erkenntnissen des alveolären Flüssigkeitstransportes geführt, da sie den initialen Beweis für den AST-bedingten AFC im lebenden Organismus erbracht haben ^{2, 47-52}. Aufgrund der fehlenden Ventilation sind diese nur bedingt als physiologische Versuchsbedingungen zu bezeichnen. Sowohl in den verwendeten flüssigkeitsbeladenen als auch in der komplett flüssigkeitsbefüllten Kaninchenlungen ⁴⁴ finden sich unter ansonsten physiologischen Bedingungen ein funktionierender AST und damit eine suffiziente AFC. Eine ausreichende Versorgung der aktiven Transportprozesse mit Adenosintriphosphat (ATP), beziehungsweise Sauerstoff und damit aerober Energiegewinnung in den alveolären Epithelzellen, wird hierbei über eine funktionierende Perfusion sichergestellt. In alveolären Epithelzellen sind auch nach prolongierter, schwerer Hypoxie normale ATP-Level gefunden worden ⁷⁸, so dass die Perfusion ohne Sauerstoffträger (Erythrozyten) in dem hier verwendeten Modell der isolierten Kaninchenlunge aus physiologischer Sicht vertretbar ist.

Die Ventilation, die assoziierte Scherspannung (engl. *shear stress*) sowie die alveoläre Druckentwicklung ist ein wichtiger physiologischer Stimulus für aktive und passive Vorgänge des Membranproteinhaushaltes, wie zum Beispiel der Sekretion von Surfactantproteinen^{79, 80}. Die erhaltene Ventilation des in dieser Arbeit verwendeten Modells stellt möglicherweise einen wichtigen Faktor in der Regulation des alveolären Flüssigkeitshaushaltes dar. Im ALI-Tiermodell der Ratte wurde der positive Einfluss einer Ventilation mit niedrigem Atemzugvolumen auf den AFC bereits dargestellt⁸¹. Auch bei Patienten mit ARDS/ALI reduzierte die Ventilation mit niedrigem Atemzugvolumen die Mortalität^{82, 83}. Im verwendeten Modell wurde eine Ventilation mit < 10 ml/kg KG durchgeführt, welches als *low tidal volume* (engl. niedriges Atemzugvolumen) Ventilation⁸¹ bezeichnet werden kann. Die Daten dieser Arbeit mit einer milden alveolären Flüssigkeitsbeladung weisen auf die Möglichkeit einer ventilationsbedingten Stimulation des aktiven Natrium- und damit Flüssigkeitstransportes hin.

Die Fähigkeit zur Resorption eines alveolären Ödems ist bestimmend für die Prognose der Patienten^{33, 84-86}. Eine weitere Untersuchung der alveolar-epithelialen Barriere und der zugrunde liegenden Mechanismen der alveolären Flüssigkeitsresorption ist somit von klinischem Interesse. Daher wird im folgenden die Funktion der epithelialen Barriere im Bereich der Alveole im verwendeten Modell diskutiert.

IV.1.1.2. Der passive alveoläre Flüssigkeitstransport zeigt keine Beeinträchtigung

Die Schrankenfunktion der alveolar-kapillären Membran beruht fast ausschliesslich auf der epithelialen Barriere^{87, 88}. Schon minimale Störungen führen hier zu einem Ungleichgewicht im Wasser- und Ionenhaushalt der Alveole, denn der für die AFC wichtige transepitheliale Ionengradient kann bei beschädigter alveolar-epithelialer Barriere nicht aufrechterhalten werden.

Im vorliegenden Modell der alveolären Flüssigkeitsbeladung ist die parazelluläre Permeabilität bei funktionierender AFC unbeeinträchtigt, wie in Abbildung 1 des Ergebnisteils anhand eines intakten AST gezeigt wird. Trotz der erhöhten Oberflächenspannung durch Verdünnung der Proteinbestandteile (Surfactant) der ELF^{89, 90} findet sich kein Anhalt für eine Schädigung der epithelialen Barriere der distalen Lunge. Die Frage, ob eine Ventilation der Lunge mit einem hypoxischen Gasgemisch zu einer Schädigung der Epithelbarriere führt, kann ebenfalls verneint werden: Die vorgestellten ³H-Mannitol-Daten zum passiven Transport zeigen in Abbildung 4 des Ergebnisteils, dass der

parazelluläre Transport weder durch zweistündige Hypoxie (3,0 % Sauerstoff) noch durch pharmakologische AFC-Blockade beeinträchtigt wird. Somit findet sich im vorliegenden Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge keinen Hinweis auf eine Schädigung der epithelialen Barriere.

Proteoglykane helfen im Bereich des Interstitiums das physiologisches Gleichgewicht des Flüssigkeitshaushaltes zu wahren⁹¹. Die schädigende Wirkung der Hypoxie auf das Zytoskelett und die dichten (Zell-)Verbindungen (engl. *tight junctions*, lat. *Zonula occludens* = ZO) ist in diversen Studien gezeigt worden⁹²⁻⁹⁴. In der vorliegenden Studie wurde der Hypoxiegrad auf 3,0 % O₂ festgelegt, um sich damit von Anoxiemodellen mit O₂ Konzentrationen unter 1 %, die wiederum zur Schädigung der alveolären Epithelschranke führen können, zu unterscheiden. In der Zellkultur von primären alveolären Rattenepithelzellen führen sowohl 3,0 % als auch 0,5 % O₂ zu einer Beeinträchtigung der ZO. Milde (3,0 % O₂) und schwerergradige Hypoxie (0,5 % O₂) für 18 h führen beide zu einer Dysregulation und Desorganisation der zytoskelettalen Proteine (F-Actin, α -Spectrin, Occludin und ZO-1), was nicht nur eine Beeinträchtigung der ZO, sondern auch der apikalen ENaC zur Folge hat. Eine Permeabilitätsstörung des Epithels wird jedoch nur bei 0,5 % gesehen⁹⁵.

Isolierte, ventilierte und mit konstantem Druck perfundierte Rattenlungen stellen ein von der hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) unabhängiges Modell dar. Die zweistündige Exposition dieser Lungen gegenüber Hypoxie (1,5 – 14 % O₂) führt zu einer vermehrten Permeabilität der alveolären Epithelbarriere⁹⁶. Der konstante Perfusionsdruck geht bei fehlender Adaptation an eine post-kapilläre HPV zu Lasten der Gewebepfusion. Der resultierende Rückstau von Perfusat im Kapillarbett mit konsekutiv vermehrter Permeabilität, beschreibt eher das Modell eines Lungenödems bei dekompensierter Linksherzinsuffizienz.

Sowohl unter alveolärer Flüssigkeitsbeladung als auch unter hypoxischer Ventilation der Alveolen bleibt die alveolar-kapilläre Schranke im verwendeten Versuchsaufbau unversehrt und damit in ihrer Barrierefunktion voll intakt. Dies schließt die morphologischen Unversehrtheit der extrazellulären Matrix, also des Interstitiums, mit ein.

IV.1.1.3. Hypoxische Ventilation hemmt den Ouabain- und Amilorid-sensitiven alveolären Natriumtransportes

Alveoläre Hypoxie ist ein Hauptmerkmal sowohl beim Höhenlungenödem⁴¹ als auch beim akuten Lungenversagen (ARDS/ALI)^{19, 42}, welches in der humanen Lunge eine Dysfunktion des AFC mit konsekutiv persistierendem Ödem zur Folge hat.

Akute Hypoxie führt, wie in der Abbildung 2 des Ergebnisteils gezeigt, umgehend zu einer Hemmung des AST. Unter Ouabain und Amilorid weisen sowohl Hypoxie als auch Normoxie eine Blockade des AST auf. Die AST Daten zum Versuchsende nach zweistündiger Hypoxie sind in Abbildung 3 des Ergebnisteils aufgeführt und weisen unter Blockade des Ouabain- und Amilorid-sensitiven AST für Hypoxie und Normoxie eine vergleichbare, signifikant verminderte Natrium Resorption von nur 71,4 % bzw. 74,3 % der Norm auf. Die Hemmung durch alleinige Hypoxie ist mit 87,8 % der Norm deutlich milder als die OA-Hemmung, aber trotzdem signifikant. Des Weiteren lassen die dargestellten Ergebnisse darauf schließen, dass die Hemmung des AST durch Hypoxie OA-sensitiv ist.

Damit ist die AFC als treibende Kraft des AST im physiologischen Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge unter Hypoxie signifikant vermindert. Dies deckt sich mit dem derzeitigen Stand der experimentellen Forschung^{36, 39, 40, 97}. Alveoläre Mechanismen der Hypoxie-induzierten Hemmung des AST sind abhängig von der Dauer und dem Grad der Exposition, wobei es insbesondere Kurzzeit- und Langzeit-Effekte der Hypoxie zu unterscheiden gilt⁷². Die zweistündige Hypoxie in dem verwendeten Versuchsmodell zeigt Veränderungen aus dem Bereich der Kurzzeiteffekte. Die hier gewonnenen Ergebnisse sollen im folgenden Kapitel mit besonderem Blick auf den aktiven AST eingehend diskutiert werden.

IV.1.1.4. Hypoxie hemmt den aktiven Anteil des alveolären Natriumtransportes

Der osmotische Gradient für die AFC entlang der alveolären Epithelbarriere wird über den aktiven Anteil des AST aufgebaut. Der aktive AST basiert auf dem apikalen Ionenkanal ENaC und der basolateralen Ionenpumpe der Na,K-ATPase zusammen, wobei die Na,K-ATPase die energieabhängige Arbeit verrichtet.

Die Daten des pathophysiologischen Modells der Kaninchenlunge zeigen nach zweistündiger Exposition mit Hypoxie (3,0 % O₂-Anteil) einen deutlichen Abfall des aktiven Anteils des AST auf 42,0 % der Werte der Kontrollgruppe. Des Weiteren weisen die in Abbildung 5 des

Ergebnisteils dargestellten Versuche unter Ouabain und Amilorid eine komplette Blockade des AST auf.

Im Vergleich zu den vorgelegten Daten sind auch Versuchsergebnisse einer Studie von *Sznajder et al.* mit vergleichbarer Kurzzeitexposition von AEC gegenüber Hypoxie interessant, da es hier schon nach 15 min zu einem quantitativen Abfall der plasmamembranständigen Na,K-ATPase kommt⁴³. Diese zeitnahe Reaktion auf Hypoxie könnte den im vorliegenden Modell gesehenen stetigen Abfall des Gesamt-AST unter Hypoxie, wie in Abbildung 2 des Ergebnisteils dargestellt, erklären. In der Literatur ist die Reduktion der plasmamembranständiger Na,K-ATPase nicht als endgültiger Abbau des Proteins, sondern als reversibler Schritt mit einstweiliger Endozytose beschrieben worden⁴³. Um diesen Punkt mit Daten des vorliegenden Modells diskutieren zu können, hätte es Versuche mit einer Rückkehr von hypoxischer zur normoxischer Ventilation bedurft. Als Arbeitshypothese wäre hier eine Reaktivierung des AST zu erwarten. Solche Versuche sind jedoch ob ihrer Dauer und der progredienten Fragilität der isolierten Lunge im vorliegenden Modell schwer umzusetzen.

Im verwendeten Modell führten wir die verminderte Resorption von Natrium auf eine verminderte Bereitstellung sowie verminderte Funktion der im AST involvierten Transportproteine zurück. In der vorliegenden Arbeit sind weder transkriptionelle noch translationelle Daten bezüglich der Membranständigkeit der AST-Transportproteine erhoben worden. Dennoch sind die gewonnenen Daten mit den Ergebnissen der im Folgenden aufgeführten Studien gut in Kontext zu setzen. Die vermehrte Expression von ENaC und Na,K-ATPase steigert nicht nur den aktiven AST, sondern auch die Fähigkeit zur Resorption der alveolären Flüssigkeit^{74, 98}. Dagegen hat eine eingeschränkte oder unterbundene Expression einzelner AST-Proteine im Tierversuch einen stark verminderten AST zur Folge. Die gezielte Gen-Ausschaltung (engl. *gene knockout* = KO) der ENaC- α -Untereinheit ENaC α führt in der KO-Maus zum akuten Lungenversagen (engl. *respiratory distress syndrome* = RDS) in neugeborenen Mäusen⁹⁹. Die transgene Überexpression von ENaC α in dem selben Maustyp verhindert die Entwicklung des RDS¹⁰⁰. Korrespondierend führt die partielle Gen-Ausschaltung beider α -Untereinheiten α_1 und α_2 der Na,K-ATPase in der heterozygoten KO-Maus ($\alpha_1^{+/-}/\alpha_2^{+/-}$) zu einer von cyclischem Adenosinmonophosphat (engl. *cyclic-adenosine monophosphate* = cAMP) abhängigen Verminderung des AFC¹⁰¹. Die vermehrte Expression der β_1 -Untereinheit der Na,K-ATPase führt sowohl im physiologischen Modell⁷⁴ als auch im Modell des hydrostatisch induzierten Lungenödems⁷⁶ zu einer gesteigerten AFC in der Ratte.

In Ratten, die für 24 h milder Hypoxie von 8,0 % O₂ exponiert wurden, findet sich ebenfalls ein signifikanter Abfall der alveolären Flüssigkeitsresorption¹⁰². In diesen Experimenten ist die Aktivität der Na,K-ATPase sowie die Expression der α_1 -Untereinheit als auch die Gesamtproteinmenge (Zellmembran + intrazelluläres Kompartiment) vermindert.

Bei normaler Ventilation auf Meereshöhe liegt der Sauerstoffpartialdruck des durch die alveolar-kapilläre Barriere diffundierenden Sauerstoffs bei ungefähr 100 mmHg. *Ex-vivo*-Modelle zeigen, dass eine Verminderung des alveolären Sauerstoffdrucks von physiologischen 100 mmHg auf 60 mmHg oder sogar 40 mmHg für die Dauer einer Stunde, die alveoläre Flüssigkeitsresorption sowie die Aktivität und Menge der α_1 -Untereinheit der Na,K-ATPase vermindert¹⁰². Pathophysiologische Experimente in der Zellkultur zeigten unter Verwendung von sowohl humanen epithelialen Adenokarzinomzellen (A549-Zellen) als auch in primären ATII in Ratten eine Inhibition des transepithelialen AST unter Hypoxie¹⁰³. In Versuchen mit Hypoxie-Langzeitexposition wurde eine verminderte Transkription und Translation von ENaC und Na,K-ATPase unter Hypoxie beschrieben^{39, 104}. Eine reduzierte mRNA- und Protein-Masse von ENaC Untereinheiten findet sich schon nach 3 h Hypoxie-Exposition mit einem Maximum nach 12 h¹⁰³. Neben der Verminderung des Amilorid-sensitiven Natriumtransportes führt die chronische Exposition zur verminderten Proteinsynthese der α -Untereinheit der ENaCs¹⁰³.

Das *in-vivo*-Modell der einseitig flüssigkeitsgefüllten Kaninchenlunge⁴⁴ zeigt den AST in der gesunden Lunge als essentiell für eine Balance der ELF¹⁰⁵. Die verwendete moderate Hypoxie von 4,5 % O₂ entspricht ungefähr dem alveolären Sauerstoffpartialdruck eines Bergsteigers an der Spitze des Mount Everest¹⁰⁶ und orientiert sich an zuvor in der Kaninchenlunge beschriebenen Sauerstoffpartialdrücken für die erfolgreiche HPV-Induktion¹⁰⁷. Obwohl es damit als Modell für HAPE geeignet erscheint, kommt es nach dreistündiger Exposition weder unter leichter Hypoxie (6,5 % O₂) noch unter moderater Hypoxie (4,5 % O₂) zu einer Inhibition des AST oder einem Anstieg des hydrostatischen Drucks. Dementsprechend wird auch keine Progredienz des alveolären Ödems gesehen¹⁰⁵. Als mögliche Erklärung für die kontroversen Ergebnisse ist die fehlende Ventilation im Bereich der flüssigkeitsgefüllten Lunge zu nennen, welche im vorliegenden Modell sichergestellt ist. Eine ausreichende O₂-Versorgung und CO₂-Entsorgung des alveolären Epithels über die erhaltene Perfusion verhindert die Entwicklung einer höhergradigen, lokalen Hypoxie und damit respiratorischen Azidose. Des Weiteren ist eine veränderte Oberflächenspannung in den Alveolen zu diskutieren, da es im Bereich der flüssigkeitsgefüllten Lunge zu einer Auswaschung des Surfactant kommt.

Die Verminderung der Membranständigkeit der Na,K-ATPase unter Hypoxie kann auch auf eine vermehrte mitochondriale Bildung radikaler, hochreaktiver Sauerstoffmetaboliten (engl. *reactive oxygen species* = ROS) zurückgeführt werden¹⁰⁸. Für das vorliegende Modell der isolierten, ventilerten und perfundierten Kaninchenlunge ist nach zweistündiger Hypoxie von 3,0 % Sauerstoff ein signifikanter Anstieg der ROS gezeigt worden¹⁰⁹. ROS führt als Signalbotenstoff zu einer intrazellulären Stabilisierung des Transkriptionskomplexes des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (engl. *hypoxia-inducible factor 1* = HIF-1), bestehend aus einer konstitutiv exprimierten beta-Untereinheit sowie einer Sauerstoff-abhängig-regulierten alpha-Untereinheit¹¹⁰. In AECs wird die Hypoxie-induzierte ROS vermittelte Endozytose der Na,K-ATPase über Phosphorylierung der Protein Kinase C (PKC) vermittelt⁴³.

Eine Modulation der Genexpression der Proteine des AST via ROS und HIF-1, durch die Bindung an sogenannte Hypoxie-reaktive-Elemente (engl. *hypoxia response element* = HRE)-Promotorenbereiche, kann in den gezeigten Versuchen diskutiert werden, jedoch muss dabei die kurze Expositionsdauer von zwei Stunden Hypoxie berücksichtigt werden. Die modulierte Transkription durch die oben genannten Transskriptionsfaktoren bzw. die Ubiquitinierung von AST-Transportproteinen sind längerfristig nach mehr als zwei Stunden Hypoxie zu erwarten⁷². Die Hemmung des aktiven AST im pathophysiologischen Modell der isolierten, perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge ist am ehesten auf eine Dysregulierung und ein daraus folgendes suboptimales Zusammenspiel der bereits in der einzelnen Zelle vorhandenen Proteine des AST-Apparates zurückzuführen. In Zusammenschau mit den Ergebnissen einer Übersichtsarbeit zum Effekt der Hypoxie auf den AST handelt es sich hierbei am ehesten um eine Hypoxie-bedingte Endozytose der basolateralen Na,K-ATPase⁷², da hier Muster und zeitlicher Rahmen der partiellen AST-Blockade zu den vorliegenden Ergebnissen passt.

IV.1.1.5. Hypoxie führt über Flüssigkeitretention zur alveolären Ödembildung

Akute Hypoxie führt im Modell der isolierten, perfundierten und ventilerten Kaninchenlunge über Hemmung des aktiven Natriumtransport bei erhaltener epithelialer Barrierefunktion zu einem alveolären Ödem.

Die in Abbildung 6 des Ergebnisteils dargestellten ELF-Volumina zum Versuchsende stellen sich sowohl unter Hypoxie als auch unter Blockade des AST durch Ouabain und Amilorid signifikant erhöht dar. Somit hat eine verminderte Resorption der ELF zu einer alveolären Flüssigkeitsretention geführt. Das alveoläre Ödem unter alleiniger Hypoxie stellt sich mit

151,8 % des ELF-Normvolumens milder ausgeprägt dar, als unter kompletter AST-Blockade mit 161,1 % des ELF-Normvolumens (Tabelle 6). Das im Vergleich zu den OA-Gruppen mildere aber doch signifikante alveoläre Ödem passt zu der zuvor beschriebenen nur partiellen Blockade des AST unter Hypoxie. Dieses Plus an ELF-Volumen ist zum Teil durch vermindertem Ausstrom bei erhaltenem Einstrom verschuldet, zum Teil aber auch durch die Wirkstoff- und *Sham*-Verneblung während des Versuchs. In anderen Modellen der Kaninchen- und Rattenlunge wird für eine gezielte Inhibition des AST und damit der AFC eine alveoläre Ödembildung beschrieben, welche über eine fortlaufende Sekretion von Flüssigkeit bei dann fehlender Rückresorption begründet ist ^{44, 105, 111}. Die alveoläre Ödembildung aufgrund von Hypoxie im verwendeten Modell ist folgerichtig und passt zu den Ergebnissen der erwähnten Hypoxiestudien und dem derzeitigen Stand der Forschung im Bereich des AFC ⁶⁸.

Im vorliegenden Modell wurde somit über 2 h hypoxische Ventilation, nicht aber durch lokale Hypoxie aufgrund eines alveolären Ödems, eine Inhibition des AST abhängigen AFC induziert. Die Folge des verminderten AFC ist Flüssigkeitsretention, welche in einer alveolären Ödembildung mündet. Das Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge zeigt anhand eines pathophysiologischen Versuchsmodus, dass alleinige Hypoxie, nicht aber iatrogene alveoläre Ödembildung, die Mechanismen des Flüssigkeitshaushaltes der distalen Lunge hemmt.

V. Zusammenfassung

Eine intakte alveolar-epitheliale Barriere ist für eine ungestörte Gasaustauschfunktion der Lunge von maßgeblicher Bedeutung. Beeinträchtigungen sowohl der passiven wie auch aktiven Barrierefunktion können hier zu einem folgenschweren Organversagen führen. Der Einfluss alveolärer Hypoxie auf aktive Resorptionsmechanismen des alveolären Epithels wurde bisher unzureichend unter physiologischen Bedingungen untersucht.

Im vorliegenden *ex-vivo* Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Kaninchenlunge wurde der Einfluss von Hypoxie und/oder alveolärer Flüssigkeitsbeladung auf die Funktion des alveolären Epithels untersucht. Der das Epithel auskleidende Flüssigkeitsfilm (*epithelial lining fluid* (ELF)) wird über aktiven und passiven transmembranösen Flüssigkeitstransport (*alveolar fluid clearance* (AFC)) reguliert. In dem hier verwendeten Modell konnten wir zeigen, dass der alveoläre Natriumtransport die treibende Kraft des AFC darstellt. Der aktive, durch apikale Amilorid-sensitive Natriumkanäle (ENaC) und basolateral lokalisierte Na,K-ATPase von alveolär nach interstitiell/intravasal gerichtete Natriumgradient führt zu einem konsekutiven Nachströmen von Wasser entlang des Ionengradienten. Die Deposition eines Flüssigkeitsbolus von 2,5 ml per Aerosolierung (engl. *excess fluid load*) führte im verwendeten Modell zu keiner relevanten Funktionsbeeinträchtigung des isolierten Organs. Es zeigte sich überraschenderweise sogar eine Stimulation des aktiven Natrium- und somit auch Flüssigkeitstransportes, im Sinne einer gesteigerten Ödemresorption. Demgegenüber führte eine alveoläre Hypoxie (zwei Stunden Ventilation mit 3,0 % Sauerstoff) zu einem signifikanten Abfall des AFC und konsekutiver Ödembildung. Ursache hierfür war eine um ca. 60 % reduzierte aktive Natriumresorption mit entsprechender Senkung des Flüssigkeitstransportes. Wir konnten somit erstmals in einem intakten isolierten Lungenmodell (unter Beibehaltung der Ventilation) zeigen, dass alveoläre Hypoxie, nicht jedoch eine iatrogene Flüssigkeitsbeladung des Alveolarraumes zu einer Störung der Ödemresorption der Lunge führt. Diese Beobachtung hat Implikationen für das Verständnis von Krankheitsbildern wie dem akuten Lungenversagen, dem Höhenlungenödem und dem Beinahe-Ertrinken.

VI. Summary

Alveolar-capillary barrier function is essential to maintain alveolar fluid balance and adequate gas exchange in the lung. Malfunction of either passive and/or active barrier could resolve in a detrimental organ failure. So far the influence of alveolar hypoxia on active barrier function and its underlying machinery has been only inadequately described in a physiological environment.

Using the *ex-vivo* model of the isolated, perfused and ventilated rabbit lung, this experimental study evaluated the influence of hypoxia and/or excess fluid load on alveolar epithelium. The epithelial lining fluid (ELF) is balanced *via* active and passive transmembrane alveolar fluid clearance (AFC). In the present study using the isolated, perfused and ventilated rabbit lung alveolar sodium transport (AST) was evidenced to be the driving force of the AFC. Sodium is actively pumped out of the alveolar epithelial cells into the interstitium by Na,K-ATPase, located on the basolateral membrane of the epithelium, which in turn drives the sodium uptake by amiloride-sensitive sodium channels (ENaCs), located on the apical membrane of the epithelium. This generates an osmotic gradient that drives water out of the alveolar space. The deposition of 2,5 ml excess fluid load resulted in no relevant barrier dysfunction in our isolated organ model. Surprisingly, we found the active sodium- and therefore fluid transport stimulated, ascribed by enhanced edema resorption. In contrast, alveolar hypoxia (2 hours of ventilation with 3,0 % Oxygen) led to a significant decrease of AFC and consecutive alveolar edema formation. Etiologic was the reduction of active AST by about 60 %, correspondingly resulting in a decreased AFC.

Taken together, the deleterious effect of alveolar hypoxia, but not experimental alveolar deposition of excess fluid load, on the edema clearance in the distal lung was proofed for the first time in an intact isolated lung model under perpetuated ventilation. Our results establish ramifications for the disease pattern of acute lung injury (ALI), adult respiratory distress syndrome (ARDS), high altitude pulmonary edema (HAPE) and near-drowning syndrome.

Tabellen

Tabelle 1. **ELF-Volumina unter Flüssigkeitsbeladung**

Gruppe	BAL Zeitpunkt	ELF(ml)	SEM	n	p-Wert
Kontrolle	Versuchsende	1,85	0,11	6	/
Flüssigkeitsbeladung	direkt nach Flüssigkeitsbeladung	2,74	0,36	4	0,017
	Versuchsende	2,17	0,17	10	0,160
Flüssigkeitsbeladung + Amilorid & Ouabain	direkt nach Flüssigkeitsbeladung	2,94	0,15	4	0,002
	Versuchsende	2,63	0,20	6	0,014

Tabelle 2. ²²Na-DR-Mittelwerte der Lunge ausgehend von der maximalen Deposition

Minute	Hypoxie (%)	Sd	HypoxieOA (%)	Sd	NormoxieOA (%)	sd	Normoxie (Kontrolle) (%)	sd
75	100	0	100	0	100	0	100	0
75,5	98,55	0,77	98,07	1,63	98,13	1,03	98,11	1,17
76	97,28	1,30	98,22	1,59	97,71	1,26	96,36	2,02
76,5	97,09	1,41	97,40	1,83	96,55	0,68	95,24	2,37
77	96,48	1,53	95,70	1,41	96,47	0,70	95,34	2,38
77,5	96,08	2,03	95,72	1,86	95,86	0,70	93,30	3,19
78	95,79	1,42	95,48	1,92	95,05	0,98	92,37	3,33
78,5	94,53	1,45	94,94	2,24	93,36	0,59	92,42	2,23
79	93,09	2,63	94,04	2,59	93,86	1,04	91,78	4,35
79,5	92,77	2,44	93,29	2,04	92,04	1,37	89,93	4,46
80	92,49	1,83	91,68	3,38	91,87	1,07	89,50	4,16
80,5	91,38	3,14	92,06	3,45	92,21	1,42	87,61	5,14
81	90,10	1,92	91,58	3,65	90,31	1,35	86,83	5,75
81,5	89,64	2,57	91,70	3,40	90,06	0,74	86,53	5,40
82	88,59	2,59	89,76	4,12	90,42	2,01	85,36	4,97
82,5	87,68	2,72	89,68	4,01	89,27	1,06	84,82	5,20
83	87,57	2,53	89,35	4,56	89,00	1,82	83,52	5,98
83,5	87,72	3,84	89,14	4,16	87,84	0,73	83,40	5,46
84	87,09	2,82	87,88	4,93	88,02	0,90	83,92	5,07
84,5	85,46	2,03	88,43	4,95	87,05	1,45	82,41	6,26
85	85,27	2,51	87,48	3,86	86,68	1,25	81,53	4,40
85,5	84,55	2,64	87,00	4,47	86,67	0,49	80,00	6,21
86	84,09	2,43	86,19	4,55	86,17	1,00	80,02	5,64
86,5	83,11	3,66	86,48	5,84	85,59	1,10	79,35	6,98

87	82,55	3,17	85,17	4,57	85,30	1,29	78,63	5,97
87,5	82,82	2,71	85,41	5,44	85,30	1,67	77,74	6,25
88	81,56	2,98	84,75	5,79	84,76	1,18	75,94	6,38
88,5	81,34	3,08	83,95	4,97	84,61	1,66	76,16	6,23
89	80,79	4,24	83,03	5,25	83,55	1,14	75,76	6,04
89,5	79,97	3,64	83,54	5,28	84,03	1,37	75,52	6,39
90	79,96	2,26	82,72	5,44	83,20	1,13	74,68	6,04
90,5	77,86	4,02	81,96	5,41	82,87	1,86	74,73	6,71
91	79,21	3,51	82,54	5,62	81,02	1,53	73,07	6,56
91,5	79,37	3,20	81,96	6,85	81,61	2,54	73,13	6,66
92	78,07	3,45	81,82	5,77	81,31	1,80	72,82	5,94
92,5	77,93	3,94	80,74	6,39	81,61	2,49	72,70	5,92
93	76,87	3,45	79,81	6,44	80,15	1,34	72,17	5,64
93,5	76,23	3,73	80,48	6,92	80,63	1,16	70,72	6,33
94	76,03	3,48	78,67	6,81	80,13	1,82	70,59	6,06
94,5	75,51	3,06	78,56	6,08	78,93	1,64	69,57	6,04
95	74,99	3,42	78,61	6,70	79,30	1,59	69,04	6,34
95,5	75,08	3,86	77,95	6,21	79,61	2,46	69,08	6,38
96	74,59	4,03	77,98	7,13	79,10	1,31	68,39	5,82
96,5	74,19	3,22	78,45	6,27	78,50	2,67	68,50	5,95
97	73,26	4,21	76,92	7,83	79,14	2,08	68,28	6,66
97,5	72,99	4,08	77,24	6,96	78,25	2,17	68,32	5,83
98	72,53	4,12	76,98	7,20	77,69	2,42	67,21	6,55
98,5	71,69	4,03	76,51	7,10	76,84	2,85	67,50	6,45
99	72,21	4,79	75,87	7,51	76,96	2,10	66,57	6,41
99,5	71,02	4,08	75,56	6,57	76,47	2,63	65,68	5,86
100	71,44	4,23	75,87	6,36	76,24	2,38	65,61	6,24
100,5	70,75	4,00	75,08	6,82	76,64	2,87	64,80	6,45
101	70,69	3,85	75,06	7,79	76,18	2,23	64,57	6,78
101,5	70,82	3,77	74,59	7,33	75,38	2,79	64,46	5,53
102	69,58	3,84	73,42	7,10	75,34	2,44	64,25	6,59
102,5	69,12	3,81	74,35	7,68	74,69	2,51	63,71	5,94
103	68,58	3,52	74,04	7,40	75,10	3,04	63,05	6,16
103,5	68,92	4,06	73,77	7,82	74,55	2,71	63,01	6,57
104	68,88	3,69	73,32	8,64	74,08	2,87	62,82	5,78
104,5	67,97	3,93	72,73	8,26	74,33	2,62	61,54	5,44
105	68,24	4,81	72,68	7,89	74,14	2,87	61,92	5,92
105,5	67,21	3,96	71,97	8,49	73,57	2,99	61,21	6,60
106	67,06	4,09	72,19	7,24	73,73	2,22	60,56	5,87
106,5	66,70	4,51	72,35	7,79	73,58	2,83	60,73	6,28
107	65,39	3,96	72,54	8,00	72,75	2,92	60,29	5,03
107,5	65,30	3,99	71,83	8,35	72,33	2,88	59,61	6,05
108	66,36	4,14	71,51	8,16	72,58	2,80	59,62	6,35
108,5	64,27	3,94	70,66	8,15	72,50	2,97	60,09	6,31
109	64,86	4,22	70,69	8,05	71,72	3,14	59,22	5,90
109,5	65,22	4,27	70,11	8,75	70,93	2,91	59,16	5,65
110	64,37	4,17	70,75	9,28	71,64	3,20	59,57	5,92
110,5	64,17	4,60	70,11	8,73	71,58	2,67	58,82	5,88
111	63,58	4,08	69,65	8,92	70,83	2,75	58,12	5,20
111,5	63,79	3,84	69,05	8,24	70,51	3,19	57,84	5,38
112	63,04	3,68	69,35	9,05	71,01	3,26	57,66	5,31
112,5	63,04	4,20	68,14	8,31	70,66	2,41	57,32	6,32
113	62,79	4,95	68,21	8,69	70,58	3,91	57,30	4,65
113,5	62,77	4,27	68,84	8,92	69,57	3,02	56,53	6,20
114	62,63	4,74	68,27	8,59	69,07	3,48	56,05	5,64

114,5	61,68	4,04	68,02	8,09	69,54	3,65	55,74	5,10
115	61,40	4,56	67,52	9,30	69,70	3,63	55,85	5,21
115,5	61,28	4,78	67,03	8,61	69,38	3,64	55,70	6,31
116	61,29	4,02	66,93	7,95	69,08	3,66	54,86	4,86
116,5	60,55	4,59	66,70	9,68	68,29	3,81	54,80	5,28
117	60,14	4,87	67,10	8,76	69,29	4,03	54,12	5,66
117,5	59,43	3,85	66,07	8,40	68,84	3,66	54,61	5,26
118	61,09	4,57	66,71	9,06	67,99	2,88	54,33	5,55
118,5	60,39	3,71	66,94	8,87	68,39	3,57	54,21	6,16
119	59,99	3,97	66,75	8,93	67,34	3,73	54,52	4,42
119,5	59,98	3,89	66,34	8,89	67,81	3,46	53,55	5,29
120	59,50	3,68	65,83	8,96	67,85	3,85	54,04	5,49
120,5	59,63	3,83	65,94	8,86	66,82	3,92	52,94	5,82
121	59,37	3,89	65,52	9,09	67,06	3,88	52,98	5,79
121,5	59,36	4,08	65,18	9,08	66,56	3,64	52,65	6,02
122	58,57	3,59	65,93	8,72	66,79	4,19	52,71	5,73
122,5	58,45	3,78	64,93	8,89	66,13	3,48	52,54	5,49
123	57,82	3,57	64,95	8,92	65,94	3,80	51,64	5,02
123,5	58,03	3,77	64,67	9,00	66,00	3,92	51,89	5,44
124	57,84	3,64	64,42	8,85	65,83	3,75	51,29	5,16
124,5	57,50	3,64	64,38	8,81	65,60	3,73	51,68	5,62
125	56,98	3,59	63,57	9,09	65,03	3,50	51,02	5,30

Tabelle 3. ^{22}Na -Nuklid in der Lunge zum Versuchsende

	Maximale Deposition	Mittelwert des ^{22}Na Abfall (Versuchsende)	SEM	p-Wert	Absorbiertes ^{22}Na (%) (Versuchsende)	Relativer ^{22}Na Abfall zur Norm (Versuchsende)
Normoxie (Kontroll)	100,0%	51,0%	1,97%		- 49,0%	
NormoxieOA	100,0%	65,0%	1,30%	0,0005	- 35,0%	71,4%
Hypoxie	100,0%	57,0%	1,34%	0,0489	- 43,0%	87,8%
HypoxieOA	100,0%	63,6%	3,39%	0,0190	- 36,4%	74,3%

Tabelle 4. Passiver ^3H -Transport zum Ende des Versuches

	Relativer passiver parazellulärer Transport t(125min)	SEM
Normoxie (Kontrolle)	100,0%	
NormoxieOA	104,4%	4,4 %
Hypoxie	102,7%	4,8 %
HypoxieOA	106,7%	3,9 %

Tabelle 5. **Gesamter ^{22}Na -Transport und aktiver Anteil zum Versuchsende**

Gesamt	Gesamt OA-sensitiver AST(%)	SEM	Aktiver Anteil OA-sensitiver AST (%)	SEM
Normoxie	100,0	1,97	100,0	3,83
NormoxieOA	71,4	1,30	0,2	3,22
Hypoxie	87,8	1,34	42,0	1,38
HypoxieOA	74,2	3,39	0,4	0,73

Tabelle 6. **Epithelialer Flüssigkeitssaum am Versuchsende**

	Volume (ml)	SEM	Relative Volumezunahme der BAL am Versuchsende im Vergleich zur Kontrolle (%)	p-Wert
Normoxie (Kontrolle)	1,85ml	0,11ml		
Hypoxie	2,81ml	0,22ml	51,8%	0,005
HypoxieOA	2,98ml	0,24ml	61,1%	0,004

Literaturverzeichnis

1. Matthay MA, Robriquet L, Fang X. Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(3):206-13.
2. Matthay MA, Landolt CC, Staub NC. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1982;53(1):96-104.
3. Goodman BE, Crandall ED. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1982;243(1):C96-100.
4. Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 2002;82(3):569-600.
5. Staub NC. Pulmonary edema. *Physiol Rev* 1974;54(3):678-811.
6. Daugherty BL, Mateescu M, Patel AS, Wade K, Kimura S, Gonzales LW, et al. Developmental regulation of claudin localization by fetal alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(6):L1266-73.
7. Cavanaugh KJ, Jr., Margulies SS. Measurement of stretch-induced loss of alveolar epithelial barrier integrity with a novel in vitro method. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(6):C1801-8.
8. Cavanaugh KJ, Jr., Oswari J, Margulies SS. Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(5):584-91.
9. Wang F, Daugherty B, Keise LL, Wei Z, Foley JP, Savani RC, et al. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(1):62-70.
10. Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 4):725-42.
11. Beck KA, Nelson WJ. The spectrin-based membrane skeleton as a membrane protein-sorting machine. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):C1263-70.

12. Sormunen R, Paakko P, Palovuori R, Soini Y, Lehto VP. Fodrin and actin in the normal, metaplastic, and dysplastic respiratory epithelium and in lung carcinoma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11(1):75-84.
13. Rotin D, Bar-Sagi D, O'Brodivich H, Merilainen J, Lehto VP, Canessa CM, et al. An SH3 binding region in the epithelial Na⁺ channel (alpha rENaC) mediates its localization at the apical membrane. *Embo J* 1994;13(19):4440-50.
14. Matthay MA, Folkesson HG, Verkman AS. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am J Physiol* 1996;270(4 Pt 1):L487-503.
15. Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(5):L867-79.
16. Song Y, Jayaraman S, Yang B, Matthay MA, Verkman AS. Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration. *J Gen Physiol* 2001;117(6):573-82.
17. Song Y, Yang B, Matthay MA, Ma T, Verkman AS. Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279(6):C1744-50.
18. Song Y, Fukuda N, Bai C, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. *J Physiol* 2000;525 Pt 3:771-9.
19. Vadasz I, Raviv S, Sznajder JI. Alveolar epithelium and Na,K-ATPase in acute lung injury. *Intensive Care Med* 2007;33(7):1243-51.
20. Conforti E, Fenoglio C, Bernocchi G, Bruschi O, Miserochi GA. Morpho-functional analysis of lung tissue in mild interstitial edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282(4):L766-74.
21. Mutlu GM, Sznajder JI. Mechanisms of pulmonary edema clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289(5):L685-95.
22. Johnson MD, Bao HF, Helms MN, Chen XJ, Tigue Z, Jain L, et al. Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion

- transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(13):4964-9.
23. Ridge KM, Olivera WG, Saldias F, Azzam Z, Horowitz S, Rutschman DH, et al. Alveolar type 1 cells express the alpha2 Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance. *Circ Res* 2003;92(4):453-60.
 24. Dobbs LG, Gonzalez R, Matthay MA, Carter EP, Allen L, Verkman AS. Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):2991-6.
 25. Matalon S, O'Brodivich H. Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu Rev Physiol* 1999;61:627-61.
 26. Sznajder JI, Factor P, Ingbar DH. Invited review: lung edema clearance: role of Na(+)-K(+)-ATPase. *J Appl Physiol* 2002;93(5):1860-6.
 27. Li T, Folkesson HG. RNA interference for alpha-ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(4):L649-L660.
 28. Fang X, Fukuda N, Barbry P, Sartori C, Verkman AS, Matthay MA. Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *J Gen Physiol* 2002;119(2):199-207.
 29. Fang X, Song Y, Hirsch J, Galiotta LJ, Pedemonte N, Zemans RL, et al. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(2):L242-9.
 30. Chambers LA, Rollins BM, Tarran R. Liquid movement across the surface epithelium of large airways. *Respir Physiol Neurobiol* 2007;159(3):256-70.
 31. Roberts CR, T. N. Weight, and V. C. Hascall. , editor. *Proteoglycans*. 2nd Edition ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997.
 32. Miserocchi G, Negrini D, Passi A, De Luca G. Development of lung edema: interstitial fluid dynamics and molecular structure. *News Physiol Sci* 2001;16:66-71.
 33. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*

- 2000;342(18):1334-49.
34. Sznajder JI, Wood LD. Beneficial effects of reducing pulmonary edema in patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1991;100(4):890-2.
 35. Mairbaurl H. Role of alveolar epithelial sodium transport in high altitude pulmonary edema (HAPE). *Respir Physiol Neurobiol* 2006;151(2-3):178-91.
 36. Suzuki S, Noda M, Sugita M, Ono S, Koike K, Fujimura S. Impairment of transalveolar fluid transport and lung Na(+)-K(+)-ATPase function by hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 1999;87(3):962-8.
 37. Carpenter TC, Schomberg S, Nichols C, Stenmark KR, Weil JV. Hypoxia reversibly inhibits epithelial sodium transport but does not inhibit lung ENaC or Na-K-ATPase expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(1):L77-83.
 38. Morty RE, Eickelberg O, Seeger W. Alveolar fluid clearance in acute lung injury: what have we learned from animal models and clinical studies? *Intensive Care Med* 2007;33(7):1229-40.
 39. Wodopia R, Ko HS, Billian J, Wiesner R, Bartsch P, Mairbaurl H. Hypoxia decreases proteins involved in epithelial electrolyte transport in A549 cells and rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1110-9.
 40. Vivona ML, Matthay M, Chabaud MB, Friedlander G, Clerici C. Hypoxia reduces alveolar epithelial sodium and fluid transport in rats: reversal by beta-adrenergic agonist treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(5):554-61.
 41. Hoschele S, Mairbaurl H. Alveolar flooding at high altitude: failure of reabsorption? *News Physiol Sci* 2003;18:55-9.
 42. Dada LA, Sznajder JI. Mechanisms of pulmonary edema clearance during acute hypoxemic respiratory failure: role of the Na,K-ATPase. *Crit Care Med* 2003;31(4 Suppl):S248-52.
 43. Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *J Clin Invest*

2003;111(7):1057-64.

44. Vejlstrup NG, Boyd CA, Dorrington KL. Effect of lung inflation on active and passive liquid clearance from in vivo rabbit lung. *Am J Physiol* 1994;267(4 Pt 1):L482-7.
45. Vadasz I, Morty RE, Kohstall MG, Olschewski A, Grimminger F, Seeger W, et al. Oleic Acid Inhibits Alveolar Fluid Reabsorption: a Role in Acute Respiratory Distress Syndrome? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004;200407-954OC.
46. Ghofrani HA, Kohstall MG, Weissmann N, Schmehl T, Schermuly RT, Seeger W, et al. Alveolar epithelial barrier functions in ventilated perfused rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(5):L896-904.
47. Sznajder JI, Olivera WG, Ridge KM, Rutschman DH. Mechanisms of lung liquid clearance during hyperoxia in isolated rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1519-25.
48. Serikov VB, Grady M, Matthay MA. Effect of temperature on alveolar liquid and protein clearance in an in situ perfused goat lung. *J Appl Physiol* 1993;75(2):940-7.
49. Saumon G, Martet G. Effect of metabolic inhibitors on Na⁺ transport in isolated perfused rat lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9(2):157-65.
50. Rutschman DH, Olivera W, Sznajder JI. Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 1993;75(4):1574-80.
51. Effros RM, Feng NH, Mason G, Sietsema K, Silverman P, Hukkanen J. Solute concentrations of the pulmonary epithelial lining fluid of anesthetized rats. *J Appl Physiol* 1990;68(1):275-81.
52. Effros RM, Mason GR, Hukkanen J, Silverman P. New evidence for active sodium transport from fluid-filled rat lungs. *J Appl Physiol* 1989;66(2):906-19.
53. Sakuma T, Pittet JF, Jayr C, Matthay MA. Alveolar liquid and protein clearance in the absence of blood flow or ventilation in sheep. *J Appl Physiol* 1993;74(1):176-85.
54. Adams AB, Graf J. Does mechanical ventilation "hit" the lungs? *Crit Care Med* 2008;36(8):2471-3.

55. Schneeberger EE, McCarthy KM. Cytochemical localization of Na⁺-K⁺-ATPase in rat type II pneumocytes. *J Appl Physiol* 1986;60(5):1584-9.
56. Schulz R, Seeger W. Release of leukotrienes into the perfusate of calcium-ionophore stimulated rabbit lungs. Influence of 5-lipoxygenase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1986;35(2):183-93.
57. Seeger W, Hansen T, Rossig R, Schmehl T, Schutte H, Kramer HJ, et al. Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial and epithelial permeability--effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition. *Microvasc Res* 1995;50(1):1-17.
58. Knowlton FP, Starling EH. The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart. *J Physiol* 1912;44(3):206-19.
59. Gauer OH KK, Jung R. *Kreislauf des Blutes*. München: Urban & Schwarzenberg; 1972.
60. West JB, Dollery CT, Naimark A. Distribution of Blood Flow in Isolated Lung; Relation to Vascular and Alveolar Pressures. *J Appl Physiol* 1964;19:713-24.
61. Nielson DW. Electrolyte composition of pulmonary alveolar subphase in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1986;60(3):972-9.
62. Vadasz I, Morty RE, Olschewski A, Konigshoff M, Kohstall MG, Ghofrani HA, et al. Thrombin impairs alveolar fluid clearance by promoting endocytosis of Na⁺,K⁺-ATPase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(4):343-54.
63. Bartsch P, Mairbaurl H, Maggiorini M, Swenson ER. Physiological aspects of high-altitude pulmonary edema. *J Appl Physiol* 2005;98(3):1101-10.
64. Bartsch P, Mairbaurl H, Swenson ER, Maggiorini M. High altitude pulmonary oedema. *Swiss Med Wkly* 2003;133(27-28):377-84.
65. Guidot DM, Folkesson HG, Jain L, Sznajder JJ, Pittet JF, Matthay MA. Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(3):L301-6.

66. Matthay MA, Uchida T, Fang X. Clinical Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2002;4(2):139-149.
67. Szpilman D. Near-drowning and drowning classification: a proposal to stratify mortality based on the analysis of 1,831 cases. *Chest* 1997;112(3):660-5.
68. Dada LA, Sznajder JI. Hypoxic inhibition of alveolar fluid reabsorption. *Adv Exp Med Biol* 2007;618:159-68.
69. Matthay MA, Clerici C, Saumon G. Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung. *J Appl Physiol* 2002;93(4):1533-41.
70. Mairbaur H, Mayer K, Kim KJ, Borok Z, Bartsch P, Crandall ED. Hypoxia decreases active Na transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282(4):L659-65.
71. Berthiaume Y, Folkesson HG, Matthay MA. Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung. *J Appl Physiol* 2002;93(6):2207-13.
72. Vadasz I, Sznajder JI. Hypoxia-induced alveolar epithelial dysfunction. *Journal of Organ Dysfunction* 2006;2(4):244 - 249.
73. Weibel ER. Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol Rev* 1973;53(2):419-95.
74. Factor P, Saldias F, Ridge K, Dumasius V, Zabner J, Jaffe HA, et al. Augmentation of lung liquid clearance via adenovirus-mediated transfer of a Na,K-ATPase beta1 subunit gene. *J Clin Invest* 1998;102(7):1421-30.
75. Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA. Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 1987;79(2):335-43.
76. Azzam ZS, Dumasius V, Saldias FJ, Adir Y, Sznajder JI, Factor P. Na,K-ATPase overexpression improves alveolar fluid clearance in a rat model of elevated left atrial pressure. *Circulation* 2002;105(4):497-501.
77. Jayr C, Garat C, Meignan M, Pittet JF, Zelter M, Matthay MA. Alveolar liquid and protein clearance in anesthetized ventilated rats. *J Appl Physiol* 1994;76(6):2636-42.

78. Ouiddir A, Planes C, Fernandes I, VanHesse A, Clerici C. Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(6):710-8.
79. Wirtz H, Schmidt M. Ventilation and secretion of pulmonary surfactant. *Clin Investig* 1992;70(1):3-13.
80. Wirtz HR, Dobbs LG. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science* 1990;250(4985):1266-9.
81. Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Matthay MA. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(2):242-9.
82. Meade MO, Cook DJ, Guyatt GH, Slutsky AS, Arabi YM, Cooper DJ, et al. Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama* 2008;299(6):637-45.
83. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000;342(18):1301-8.
84. Ware LB, Conner ER, Matthay MA. von Willebrand factor antigen is an independent marker of poor outcome in patients with early acute lung injury. *Crit Care Med* 2001;29(12):2325-31.
85. Ware LB, Fang X, Wang Y, Sakuma T, Hall TS, Matthay MA. Selected contribution: mechanisms that may stimulate the resolution of alveolar edema in the transplanted human lung. *J Appl Physiol* 2002;93(5):1869-74.
86. Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(3):980-8.
87. Jou TS, Schneeberger EE, Nelson WJ. Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J Cell Biol* 1998;142(1):101-15.

88. Gorin AB, Stewart PA. Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux. *J Appl Physiol* 1979;47(6):1315-24.
89. Yukitake K, Brown CL, Schlueter MA, Clements JA, Hawgood S. Surfactant apoprotein A modifies the inhibitory effect of plasma proteins on surfactant activity in vivo. *Pediatr Res* 1995;37(1):21-5.
90. Wyszogrodski I, Kyei-Aboagye K, Taeusch HW, Jr., Avery ME. Surfactant inactivation by hyperventilation: conservation by end-expiratory pressure. *J Appl Physiol* 1975;38(3):461-6.
91. Negrini D, Passi A, Moriondo A. The role of proteoglycans in pulmonary edema development. *Intensive Care Med* 2008;34(4):610-8.
92. Roberts-Lewis JM, Siman R. Spectrin proteolysis in the hippocampus: a biochemical marker for neuronal injury and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1993;679:78-86.
93. Lee A, Morrow JS, Fowler VM. Caspase remodeling of the spectrin membrane skeleton during lens development and aging. *J Biol Chem* 2001;276(23):20735-42.
94. Hu RJ, Bennett V. In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s). *J Biol Chem* 1991;266(27):18200-5.
95. Bouvry D, Planes C, Malbert-Colas L, Escabasse V, Clerici C. Hypoxia-induced cytoskeleton disruption in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35(5):519-27.
96. Dehler M, Zessin E, Bartsch P, Mairbaurl H. Hypoxia causes permeability oedema in the constant-pressure perfused rat lung. *Eur Respir J* 2006;27(3):600-6.
97. Suzuki S, Sugita M, Noda M, Tsubochi H, Fujimura S. Effects of intraalveolar oxygen concentration on alveolar fluid absorption and metabolism in isolated rat lungs. *Respir Physiol* 1999;115(3):325-32.
98. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 2004;10(5):487-93.

99. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 1996;12(3):325-8.
100. Egli M, Duplain H, Lepori M, Cook S, Nicod P, Hummler E, et al. Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J Physiol* 2004;560(Pt 3):857-65.
101. Looney MR, Sartori C, Chakraborty S, James PF, Lingrel JB, Matthay MA. Decreased expression of both the alpha1- and alpha2-subunits of the Na-K-ATPase reduces maximal alveolar epithelial fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289(1):L104-10.
102. Litvan J, Briva A, Wilson MS, Budinger GR, Sznajder JI, Ridge KM. Beta-adrenergic receptor stimulation and adenoviral overexpression of superoxide dismutase prevent the hypoxia-mediated decrease in Na,K-ATPase and alveolar fluid reabsorption. *J Biol Chem* 2006;281(29):19892-8.
103. Clerici C, Matthay MA. Hypoxia regulates gene expression of alveolar epithelial transport proteins. *J Appl Physiol* 2000;88(5):1890-6.
104. Planes C, Escoubet B, Blot-Chabaud M, Friedlander G, Farman N, Clerici C. Hypoxia downregulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(4):508-18.
105. Nagyova B, O'Neill M, Dorrington KL. Inhibition of active sodium absorption leads to a net liquid secretion into in vivo rabbit lung at two levels of alveolar hypoxia. *Br J Anaesth* 2001;87(6):897-904.
106. West JB, Wagner PD. Predicted gas exchange on the summit of Mt. Everest. *Respir Physiol* 1980;42(1):1-16.
107. Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol* 1995;100(2):159-69.
108. Comellas AP, Dada LA, Lecuona E, Pesce LM, Chandel NS, Quesada N, et al. Hypoxia-mediated degradation of Na,K-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system. *Circ Res* 2006;98(10):1314-22.

109. Weissmann N, Winterhalder S, Nollen M, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, et al. NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(4):L638-45.
110. Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J Appl Physiol* 2000;88(5):1880-9.
111. Basset G, Crone C, Saumon G. Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J Physiol* 1987;384:325-45.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Seeger für die freundliche Überlassung des Themas und bei Herrn Prof Dr. Ardeschir Ghofrani für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich Frau Karin Quanz und der Arbeitsgruppe im Seltersberg Haus C danken. Ihre Hilfsbereitschaft schuf ein sehr angenehmes Arbeitsklima und ermöglichte ein produktives Arbeiten. Des Weiteren danke ich Herrn Gerd Weigand aus der zentralen biotechnischen Betriebseinheit des Strahlencentrums der Justus-Liebig-Universität Giessen für die Messung der Perfusatproben.

Außerdem danke ich meiner Frau Nicole, meiner Familie und meinen Freunden. Hier sind besonders Istvan, Mop, Robert, Marten und Isabel zu nennen. Ihre moralische Unterstützung ermöglichte es mir, diese Arbeit fertig zu stellen.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5502-0



9 17 8 3 3 3 3 1 9 5 3 0 2 6 1