

Mathias Klemme

Der Effekt von aktivierter bzw. inhibierter alveolärer Flüssigkeitsclearance auf lungenmechanische Meßgrößen und das Gesamtlungenwasser.

Titel:

Der Effekt von aktivierter bzw. inhibierter alveolärer
Flüssigkeitsclearance auf lungenmechanische Meßgrößen und das
Gesamtlungenwasser.

Für Tina und Tom

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
Im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Der Ludwig-Maximilians-Universität

Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. D. Reinhardt

Der Effekt von aktivierter bzw. inhibierter alveolärer
Flüssigkeitsclearance auf lungenmechanische Meßgrößen und das
Gesamtlungenwasser.

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

Mathias Klemme
aus
Böblingen
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schulze

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Rainald Fischer
Prof. Dr. Ulrich Bürger

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. A.W. Flemmer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2009

Inhaltsangabe:

1. Einleitung:

- 1.1 Fetaler Elektrolyttransport
- 1.2 Peri und postnataler Elektrolyttransport, Kanäle und Transporter
 - 1.2.1 Perinataler Elektrolyttransport
 - 1.2.2 Amiloride-sensitve Na⁺-Kanäle
 - 1.2.3 Na-K-ATPase und ihre Funktion im Flüssigkeitstransport
 - 1.2.4 Aquaporine
 - 1.2.5 NKCC-Cotransporter
- 1.3 Atemnotsyndrom (RDS)
- 1.4 Fragestellung
 - 1.4.1 Blutdruck
 - 1.4.2 Lungenmechanik
 - 1.4.3 Lungenwasser
 - 1.4.4 Flüssigkeitsverschiebung
 - 1.4.5 P-NKCC-Expression und Aktivität

2. Material und Methode

- 2.1 Versuchstiere
- 2.2 Präparation
- 2.3 Gesamtüberblick über die Versuchsanlage:
- 2.4 Lungenmechanische Messungen
 - 2.4.1 Forcierte Oscillationstechnik (FOT)
 - 2.4.2 Klassische Lungenmechanik
 - 2.4.3 Fast Fourier Transformation (FFT)
- 2.5. Weitere Messgrößen
 - 2.5.1 Gesamtlungenwasser
 - 2.5.3 Albumin-, Natrium-, Kalium-Konzentration im Perfusat
 - 2.5.4 Arterieller und venöser Perfusatdruck
- 2.6 P-NKCC Bestimmung
 - 2.6.1 Homogenisierung des Lungengewebes
 - 2.6.2 Proteinbestimmung
 - 2.6.3 P-NKCC-Bestimmung mittels Dotblot-Technik
- 2.7 Versuchsprotokoll, Interventionen, Versuchsgruppen, Meßgrößen
 - 2.7.1 Versuchsprotokoll
 - 2.7.2 Interventionen
 - 2.7.4 Optische Validierung der endotrachealen Applikation
 - 2.7.4 Versuchsgruppen
 - 2.7.5 Messgrößen
- 2.8 Analyse-Software
- 2.9 Statistische Analyse

3. Ergebnisse

- 3.1 Versuchstiere/ Beschaffenheit der Gruppen
- 3.2 Blutdruck
- 3.3 Lungenmechanik
- 3.4 Lungenwasser
- 3.5 Flüssigkeitsverschiebung
- 3.6 P-NKCC Expressivität und Aktivität

4. Diskussion

- 4.1 Versuchstiere
- 4.2 Endotracheale Applikation
- 4.3 Blutdruck
- 4.4 Lungenmechanik
- 4.5 Lungenwassergehalt
- 4.6 Flüssigkeitsverschiebung
- 4.7 P-NKCC Expressivität und Aktivität

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Lebenslauf

8. Danksagung

1. Einleitung:

Die Geburt stellt für das menschliche Neugeborene eine große Herausforderung dar. Die Lunge des Feten ist im Mutterleib mit Flüssigkeit gefüllt. Diese pulmonale Flüssigkeit wird zum größten Teil aktiv vom Lungenepithel mit einer Rate von bis zu 5 ml/kg Körpergewicht / h sezerniert (Cassin et al. 2002). Die Sekretion von Flüssigkeit durch das Lungenepithel ist für Wachstum und Differenzierung der Lunge unerlässlich (Alcorn et al. 1977; De Paepe et al. 1998). Im klinischen Alltag führt der Mangel an Flüssigkeit in der Lunge, z.B. durch Oligohydramnie zur Lungenhypoplasie mit der Folge einer schwer behandelbaren Erkrankung des Neugeborenen (Geary et al. 2002; Jakobovits 2003; Yoshimura 1993). Um postnatal die Gasatmung zu ermöglichen, muss bereits vor der Geburt die pulmonale Sekretion reduziert und die Resorption von Flüssigkeit in der Alveole aktiviert werden (Pitkanen et al. 1998). Dies ist nur möglich, wenn einerseits genug Surfactant in der Lunge gebildet wird und andererseits eine ausreichende alveoläre Flüssigkeitsclearance stattfindet. Ist genügend Surfactant vorhanden, die Flüssigkeitsresorption aber noch unreif, kommt es zum klinischen Bild der transienten Tachypnoe des Neugeborenen (TTN) und im Extremfall gar zum Atemnotsyndrom (Respiratory Distress Syndrome, RDS) (O'Brodivich 1996). Unter dem Einfluss verschiedener Stimulatoren gelingt die für den suffizienten Gasauaustausch letztendlich entscheidende Umstellung der Lunge von der sekretorischen Funktion auf die vor allem absorptive Funktion. Hierzu zählen vor allem Kortikosteroide (Folkesson et al. 2000; Mustafa et al. 2003), Schilddrüsenhormone (Folkesson

et al. 2000), Wehentätigkeit (Bland 2001) sowie Katecholamine (Finley et al. 1998). Es ist bekannt, dass eine erniedrigte alveoläre Flüssigkeitsclearance beim Atemnotsyndrom (Respiratory Distress Syndrome, RDS) des Neugeborenen und des Erwachsenen eine entscheidende Rolle hinsichtlich des Überlebens der Patienten spielt (Pitkanen 2001; Ware et al. 2001).

Der transepitheliale Flüssigkeitstransport in der Lunge ist also ein aktiver Prozeß des Alveolarepithels. Andererseits spielt der Flüssigkeitsgehalt der Lunge eine entscheidende Rolle hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften des Lungengewebes und der Atemwege.

Ein erhöhter Wassergehalt in der Lunge verschlechtert die Lungenmechanik bzw. die Lungencompliance (Flemmer et al. 2000), wobei die Lungencompliance eine prognostische Aussage über den Verlauf der Erkrankung und des Überlebens zulässt (Simbruner et al. 1982).

Ziel dieser Arbeit war nun, den Effekt der Hemmung bzw. Aktivierung des epithelialen Flüssigkeitstransports in der Lunge auf Lungenmechanik und Gesamtlungenwasser zu untersuchen.

1.1 Fetaler Elektrolyttransport

Die für den alveolären Flüssigkeitstransport hauptsächlich verantwortliche Zelle ist der Typ II Alveolozyt (AT-II-Zelle). Neben der Produktion von Surfactant exprimiert diese Zelle vor der Geburt die sekretorische Isoform des Na-K-2Cl-Kotransporters (NKCC1) in der basolateralen Zellmembran. Die Triebkraft für die Sekretion vom Gefäßbett ins Interstitium wird durch die ebenfalls basolateral exprimierte Na-K-ATPase bereitgestellt (Sartori et al. 2001) In der apikalen

Zellmembran (d.h. in der der Alveole zugewandten Seite des Epithels) werden bereits früh fetal Chlorid-Kanäle (z.B. CIC2) (Murray et al. 1996) exprimiert, die den Austritt von Ionen aus der AT-II-Zelle ermöglichen (O'Brodovich 1996). Ohne diese sekretorischen Eigenschaften der Lungenzelle käme es zu keiner ausreichenden Lungenentwicklung. Eine kontinuierliche Drainage der Lunge in utero verursacht eine Lungenhypoplasie, eine Ligatur der Trachea dagegen führt zu einer Hyperplasie der Lunge (De Paepe et al. 1998) Die Cl^- Sekretion über den NKCC konnte von McCray et al. in einer Organkultur sowohl für fetale Rattenzellen als auch für humane Zellen dargestellt werden. Eine Zugabe des NKCC-Blockers Bumetanide erniedrigte die Cl^- -abhängige Flüssigkeitssekretion signifikant (Gillie et al. 2001; McCray et al. 1992a; McCray et al. 1992b).

Allerdings müssen neben der NKCC-abhängigen Flüssigkeitssekretion noch weitere Cl^- -Transportsysteme eine Rolle spielen. Denn Knockout-Mäuse, die keinen NKCC-Cotransporter exprimierten, zeigten eine normale Lungenentwicklung und entwickelten sich auch bis ins Erwachsenenalter normal weiter (Gillie et al. 2001).

1.2 Perinataler und postnataler Elektrolyttransport, Kanäle und Cotransporter

1.2.1 Perinataler Elektrolyttransport

Die Lunge ist eines der wenigen Organsysteme, das seine eigentliche Funktion, den Gasaustausch, erst nach der Geburt aufnimmt.

Um einen adäquaten Gasaustausch zu ermöglichen ist es unerlässlich, dass die Flüssigkeit, welche während der Fetalzeit in Atemwege und Alveolarräume sezerniert wurde, resorbiert wird.

Kurz vor der Geburt kommt es deshalb zu einer Umstellung von sekretorischer auf resorptive Aktivität des Epithels, respektive der AT-II-Zellen. Für diesen Prozeß spielen, wie bereits erwähnt, Hormone eine entscheidende Rolle. Unter dem Einfluss von Schilddrüsenhormonen und Cortisol werden am Ende der Schwangerschaft in zunehmendem Maße epitheliale Natrium-Kanäle (eNaC) und nicht selektive Kationenkanäle (NSCC) in der apikalen Zellmembran von AT-II-Zellen exprimiert. (Bland 2001; Finley et al. 1998; Folkesson et al. 2000). Diese Kanäle können durch das Diuretikum Amilorid gehemmt werden und generieren ein lumen negatives, transepitheliales Potential, welches am respiratorischen Nasenepithel gemessen werden kann.

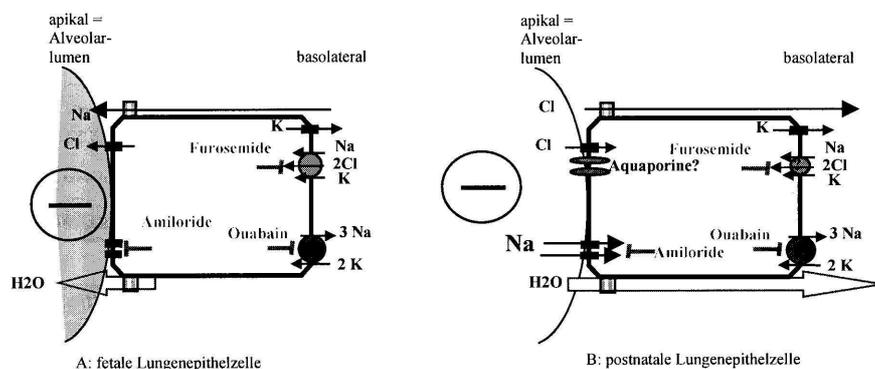


Abbildung 1.1: Schema einer ATII Zelle während der Fetalperiode bzw. B: eine ATII-Zelle nach der Geburt Surfactanttherapie Thieme 2004, 3. Auflage, Kapitel 1.3: Funktionelle Entwicklung der Lunge, Wauer RR, Flemmer AW, Kachele K.

Ist diese Umstellung der Epithelfunktion gestört, führt dies beim Neugeborenen zum Atemnotsyndrom (Helve et al. 2004; O'Brodovich 1996). Ein weiteres

Experiment zeigte, dass extrem Frühgeborene, die ein Atemnotsyndrom entwickelten, in den ersten 24 h eine geringere Natriumresorption über das Nasenepithel hatten als Kinder, die kein RDS entwickelten.

(Barker et al. 1997). Diese Befunde sprechen für eine geringere Aktivität von eNac und NSCC als Pathophysiologie für die Entstehung eines Atemnotsyndroms.

Nach einer vaginalen Geburt am Termin, ist darüber hinaus das Risiko für das Neugeborene deutlich geringer, eine respiratorischen Anpassungsstörung, wie die transiente Tachypnoe des Neugeborenen (TTN) zu erleiden, als dies bei einer Geburt durch elektiven Kaiserschnitt der Fall ist. Ebenso weiß man, dass Wehentätigkeit dieses Risiko weiter senkt (van den Berg et al. 2001). Die Auswirkungen der Wehen allerdings sind nicht, wie man fälschlicherweise annehmen könnte auf den physikalischen Druck zurückzuführen, sondern durch sie werden weitere den Elektrolyttransport betreffende Regulationsmechanismen induziert (Bland 2001). Die Umstellung der Lunge beginnt bereits vor der Geburt und bevor Wehentätigkeiten einsetzen kommt es zu einer vermehrten Clearance und damit zu einer Verringerung der Lungenflüssigkeit. (Folkesson et al. 2002; Pfister et al. 2001). Zum Zeitpunkt der Geburt kommt es zu einem starken Anstieg der im fetalen Blut zirkulierenden Katecholamine .

Dieser Katecholamin-Stoß führt zu einer erhöhten Expression und Aktivierung von Na⁺-Kanälen in der apikalen Membran sowie zu einer Zunahme von Expression und Aktivierung der Na/K-ATPase in der basolateralen Membran (Adir et al. 2003; Azzam et al. 2002; Azzam et al. 2001; Dumasius et al. 2001;

Jaitovich et al. 2002; Matthay et al. 2002; Matthay et al. 2000; Saldias et al. 2000; Sartori et al. 2002; Tchepichev et al. 1995). Norlin und Folkersson konnten zeigen, dass das Flüssigkeitsvolumen in der Lunge von Meerschweinchenfetten, welche bereits Wehen erlebt hatten, im Vergleich zu elektiv sektionierten Tieren deutlich vermindert war. Sie schrieben dies einer durch Wehentätigkeit und Geburt induzierte Erhöhung der AdrenalinKonzentration im Blut und der damit erhöhten Flüssigkeitsresorption aus der Lunge zu (Norlin et al. 2001).

Die Funktion der Typ I Pneumozyten (AT I) hinsichtlich des Ionentransportes ist nicht geklärt, auch wenn kürzlich die Expression von Na^+ -Kanälen und Na^+/K^+ -ATPase durch Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen werden konnte (Borok et al. 2002; Johnson et al. 2002).

1.2.2 Amiloride sensitive Na^+ -Kanäle

Entscheidend allerdings für den Salz- und den daraus folgenden Wassertransport ist der Natriumkanal eNaC mit seinen drei homologen Untereinheiten α , β und γ . Seine Bedeutung lässt sich in einem Versuch von Hummler et al. erkennen. Hummler zeigte, dass Knockoutmäuse, denen die α -Untereinheit fehlte, innerhalb der ersten 40 postpartalen Stunden starben. Alle Mäuse entwickelten ausnahmslos ein RDS, welches dadurch zu erklären ist, dass die Tiere nicht mehr in der Lage waren ihre Lungen von Flüssigkeit zu befreien. Fehlte dagegen eine der beiden anderen Untereinheiten, so konnte Flüssigkeit, wenn auch langsamer aus dem Alveolarraum befördert werden.

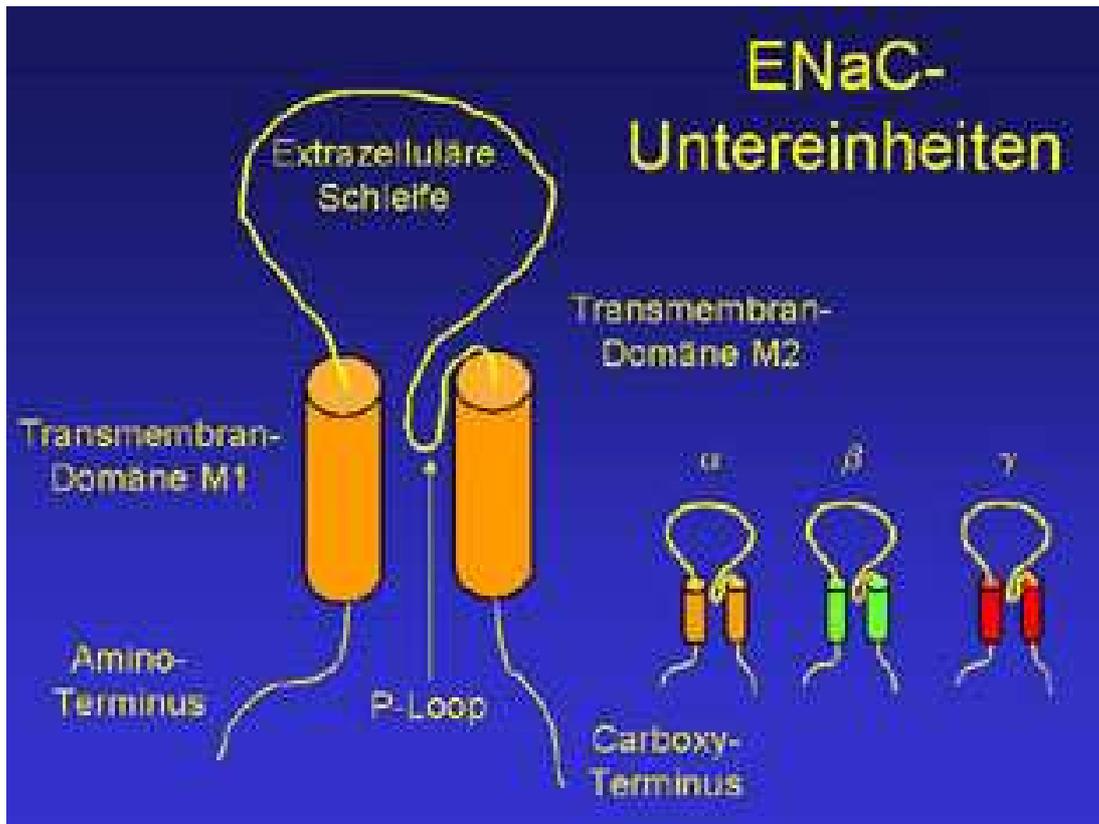
Allerdings starben diese Mäuse an einer Hyperkaliämie durch abnormale Elektrolytresorption in der Niere (Hummler et al. 1996)

Beim Menschen fand man Mutationen dieser 3 Untereinheiten im Zusammenhang mit systemischem Pseudohypoaldosteronismus. Zwar zeigten die Patienten zur Geburt keine respiratorischen Symptome, entwickelten aber innerhalb von Wochen Husten und Atemnot. Dies könnte ein Hinweis auf vermehrte Flüssigkeitsansammlung in der Lunge sein, welche wiederum auf die Dysfunktion des eNaC zurückzuführen sein könnte (Kerem et al. 1999).

Eine Aktivierung des Na⁺-abhängigen Ionentransportes findet von dem Zeitpunkt der Geburt an vor allem durch endogene Katecholamine statt. Die intravenöse Gabe von β -Rezeptoragonisten, zum Beispiel von Isoproterenol, führt zu einer (Uystrup et al. 2002) Aktivierung der an der Innenseite der Zellmembran lokalisierten Adenylatcyclase und damit zu einem Anstieg der zytosolischen cAMP-Konzentration. cAMP induziert Proteinkinase A (PKA), die wiederum zur Aktivierung membranöser eNaCs und der Insertion submuköser eNaCs führt (Löffler et al. 1997).

Gleichzeitig aktiviert cAMP die Aktivität der basolateralen NaK-ATPase. Dies führt zu einem erhöhten transepithelialen Natrium- und konsekutiv zu einem erhöhten Chlorid- und Wassertransport (Chen et al. 2002; Dumasius et al. 2001). Dieser Effekt kann durch Amiloride aufgehoben werden (Chen et al. 2002).

Das weist darauf hin, dass dieser durch Erhöhung des Na⁺-abhängigen Ionentransportes zustande kommt (Norlin et al. 1998).



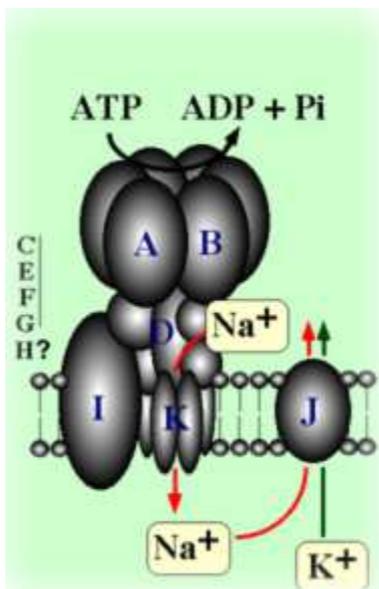
© www.uni-giessen.de/fb15/tierphysio/agclauss.htm
 Abb 1.2 : der Natriumkanal EnaC mit seinen drei homologen Untereinheiten

Nicht-Amiloride sensitive Na^+ -Kanäle lassen sich ebenfalls in der AT II nachweisen, deren Rolle hinsichtlich der Flüssigkeitsbilanz ungeklärt ist. Allerdings ist ihre Aktivität im Rahmen eines erhöhten Lungenwassergehaltes, z.B. eines Lungenödems erhöht (Rafii et al. 2002) .

1.2.3 Na^+/K^+ ATPase und ihre Funktion im Flüssigkeitstransport

Das Enzym Na^+/K^+ ATPase ist eine Ionen transportierende ATPase, die den elektrochemischen Gradienten über die Membran hinweg aufrechterhält, indem sie Natrium in die Zelle hinein und Kalium aus der Zelle heraus pumpt. Dies

geschieht gegen das eigentliche Konzentrationsgefälle unter Hydrolyse von ATP, d.h. unter Verbrauch von Energie. Diese Funktion ist ausschlaggebend für den sekundären, aktiven Transport von Na^+ -Ionen. Durch die Lokalisation in der basolateralen Membran kommt ein vektorieller Natriumtransport zustande, dem dann eine entsprechend große Menge Wasser folgt, so dass ein isoosmotisches Niveau gewahrt bleibt. Gleichzeitig werden so Zellvolumen und -form aufrecht erhalten. Die Na^+/K^+ ATPase, die in der Lunge hauptsächlich in AT II-Zellen vorkommt ist ein heterodimeres Transmembranprotein bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit im Verhältnis 1:1. Es bestehen mehrere Isoformen, wobei die α_1 -Isoform zusammen mit der β_1 -Isoform die prädominante Form in AT II-Zellen ist. Die α -Untereinheit ist hierbei für den Ionentransport zuständig. (Ridge et al. 1997; Skou 1990; Skou 1998).



www.tb.noda.sut.ac.jp/.../bioenerg/ehirae/ehirae-j.htm
 Abb.1.3 Die Na^+/K^+ ATPase mit Untereinheiten,

Erhöht wird die Aktivität der Na⁺/ K⁺ ATPase durch Katecholamine wie z.B. Norepinephrin. Mit der Erhöhung des vektoriellen Natriumtransportes kommt es konsekutiv auch zu einer Erhöhung des Wassertransportes. (Azzam 2004)

1.2.4 Aquaporine:

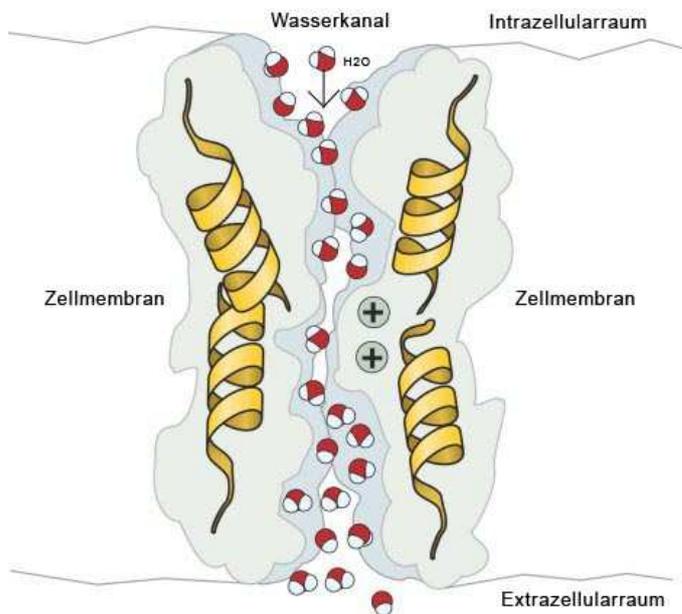
Man nimmt an, daß Aquaporine sowohl bei physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen in der Lunge eine wichtige Rolle spielen. Drei Aquaporine konnten in der Lunge lokalisiert werden: AQP1, AQP4 und AQP5. AQP1 befindet sich im Endothel mikrovaskulärer Endothelien und einigen Pneumozyten.

AQP4 findet sich an der basolateralen Membran des Atemwegepithels und AQP5 an der apikalen Membran von Typ I Pneumozyten.

Die Expression von AQP1 und AQP4 ist kurz vor dem Geburtstermin deutlich erhöht, wohingegen die Expression von AQP5 erst während der ersten Lebenswoche allmählich ansteigt (Umenishi et al. 1996; Yasui et al. 1997).

Song et al. (Song et al. 2000) verglichen Wildtypmäuse mit Knockoutmäusen, welchen die Aquaporine AQP1, AQP4 und AQP5 fehlten. Sie simulierten hierbei die Situation der Lunge unmittelbar nach der Geburt, der reifen Lunge und der sauerstoffgeschädigten Lunge. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied bezüglich der Flüssigkeitsclearance der Lunge festgestellt werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass - trotz der Bedeutung der Aquaporine hinsichtlich der Wasserbewegungen entlang osmotischer Gradienten - die alveoläre Clearance nicht oder nur in geringem Maße beeinflusst wird.

Eine weitere Funktion von Aquaporinen ist der Gastransport von CO₂ und NH₃ (Tyerman et al. 2002).



© www.wissenschaft-online.de

Abb1.4: schematische Darstellung eines Aquaporins

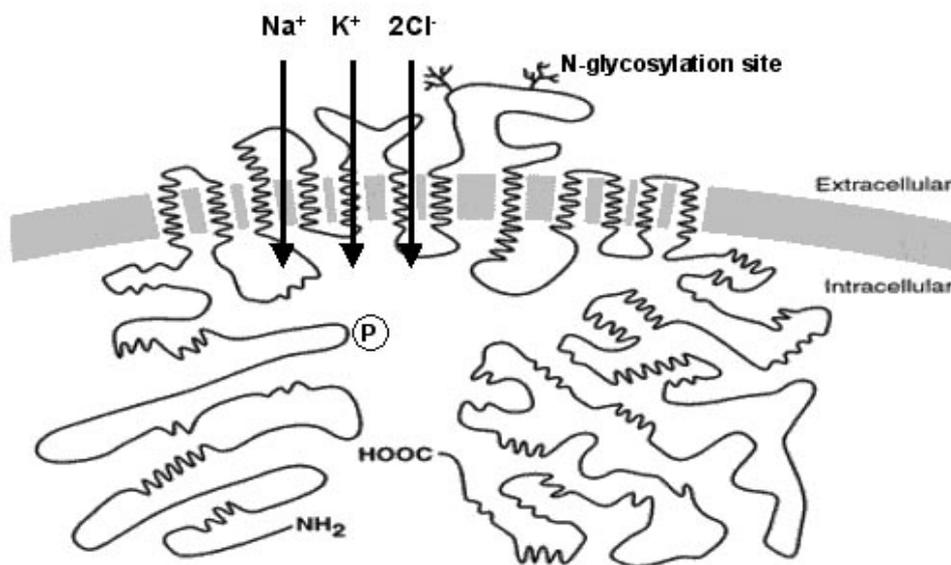
1.2.5 Na-K-2Cl-Cotransporter (NKCC):

Der NKCC wird in der basolateralen Membran des Typ II Pneumozyten exprimiert. NKCC transportiert Na⁺, K⁺ und Cl⁻ elektrisch neutral in den meisten Fällen in einem Verhältnis von 1 Na⁺: 1 K⁺ :2 Cl⁻. Es gibt zwei Isoformen: NKCC1 kommt in fast allen sekretorischen Epithelien vor allem in der basolateralen Membran sowie in nicht polarisierten Körperzellen. NKCC2 kommt ausschließlich in der Niere, in der apikalen Membran der Epithelien der Henleschen Schleife vor (Haas et al. 2000).

Pränatal sorgt NKCC für die Flüssigkeitssekretion in die Lunge und nimmt dabei neben der Niere einen entscheidenden Platz im Bereich der Lungenentwicklung ein. (Pitkanen et al. 2001)

Seine Aufgabe in der reifen Lunge ist ungeklärt. Seine postnatale Anwesenheit allerdings impliziert eine weiterhin bestehende sekretorische Funktion der postnatalen Lunge. Auf der Alveolarseite der Lunge befindet sich ein dünner Film (Lung Liquid Layer). Ihm kommt insofern eine Bedeutung zu, da er für das Lungensurfactant das notwendige Ionenmilieu schafft (Walters 2002).

NKCC wird durch Phosphorylierung aktiviert (Flemmer et al. 2002).



© www.neurosurg.wisc.edu/sunlab/inter.html
Abb. 1.5 Na-K-2Cl-Cotransporter (NKCC)

Um die Effekte des Cl^- -Transportes im Alveolarepithel zu erforschen, haben Nielsen et al. folgende Überlegungen zugrunde gelegt. Sie nahmen an, dass man den transzellulären Cl^- -Transport durch das Epithel der Alveolarzellen TypII

durch Erhöhen des second Messengers cAMP, also im Prinzip wie bei einer β -adrenergen Reaktion, steigern könne.

Dieser Effekt läßt sich durch die Verwendung von Forskolin erreichen.

Mittels einer Ussing-Kammer demonstrierten sie, daß die Erhöhung des cAMP sowohl einen verstärkten Na^+ - als auch Cl^- -Transport bewirkt.

Bei gleichzeitiger Amiloridgabe konnte gezeigt werden, daß einerseits der Na^+ -Transport abnahm andererseits der Cl^- -Transport zunahm. Dies impliziert, daß es Situationen gibt, in denen es zu einem Netto-Flüssigkeitseinstrom in die Lunge kommt, vor allem wenn der transepitheliale Na^+ -Transport gestört ist, (Nielsen et al. 1998).

Bedenkt man, dass im Rahmen eines RDS die resorptive Kompetenz des Lungenepithels durch Na^+ - Kanäle stark beeinträchtigt ist (Helve et al. 2004), so lässt dies auf eine erhöhte Flüssigkeitssekretion in den Alveolarraum schließen, die durch eine erhöhte Aktivität des NKCC erklärt ist.

1.3 Atemnotsyndrom (RDS)

Das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen entsteht durch Lungenunreife und Surfactantmangel (Verma 1995) Erstaunlich ist jedoch, dass auch nach Surfactant-Gabe die charakteristischen radiologischen Veränderungen wie z.B. Opazifizierung, Auslöschung der Herz- und Zwerchfellkonturen und positives Luftbronchogramm persistieren.



© Ludwigs Maximiliansuniversität München, Klinikum Grosshadern, Neonatologie
Abb.1.6 Röntgenbild eines Frühgeborenen der 26. SSW mit Atemnotsyndroms.
nach 3-maliger Surfactatngabe

Dies läßt annehmen, dass weitere Faktoren eine Rolle bei der Entstehung des Atemnotsyndroms spielen.

Neben Früh- und Neugeborenen haben erwachsene Patienten, die an einem Atemnotsyndrom erkrankt sind, und eine erniedrigte alveoläre Flüssigkeitsclearance aufweisen, eine dreimal höhere Mortalität als Patienten mit maximaler Clearance (Ware & Matthay 2001).

Wie bereits beschrieben muss die Lunge nach der Geburt von Flüssigkeitssekretion auf Resorption umstellen. Im Rahmen des neonatalen Lungenversagens gelingt diese Umstellung jedoch nicht oder nur unvollkommen. Besondere Bedeutung hat hier der Amilorid sensitive Natriumkanal eNaC. Bereits 1990 zeigten O'Brodivich et al., dass die Blockade dieses Kanals mittels

Amilorid bei neugeborenen Versuchstieren ein RDS auslöste (O'Brodivich et al. 1990). Eine Gruppe um David Smith untersuchte die Expression von eNaC in normal und anormal entwickelter perinataler Lunge. Sie kam zu dem Ergebnis, dass dieser Natriumkanal auch in der erkrankten Lunge exprimiert ist. Allerdings zeigte sie dies durch die Darstellung von mRNA. Eine gewisse Menge an mRNA, das heißt Transkription, ist nicht mit tatsächlicher Expression bzw. Aktivität gleichzusetzen (Smith et al. 2000). Ergänzend ist bekannt, daß die notwendige Insertion des Kanals in die apikale Zellmembran und dessen Aktivierung offenbar ausbleibt (Pitkanen 2001; Pitkanen & O'Brodivich 1998).

Der kausale Zusammenhang zwischen RDS und Na⁺-Transport ist eindeutig, der eigentliche Pathomechanismus, warum die Flüssigkeitsclearance erniedrigt wird, bleibt unklar. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob zusätzlich zur verminderten Clearance eine aktive Sekretion über den NKCC in der basolateralen Membran die Situation verschlechtert.

Risikofaktoren sind Sepsis, Mekoniumaspiration, persistierender pulmonaler Hypertonus, Hypoxie sowie die Kaiserschnittentbindung vom wehenlosen Uterus (Pfister et al. 2001; Roth-Kleiner et al. 2003).

Dieses Krankheitsbild macht auch heute noch 13% der Mortalität extrem frühgeborener Kinder aus (Stranak et al. 2002).

Dies berechtigt damit zu intensiver Forschungsarbeit für ein besseres Verständnis des Pathomechanismus.

1.4 Fragestellung:

Legt man die oben beschriebene Situation der neonatalen Lunge zugrunde, kann man zusammenfassend folgende Überlegungen anstellen:

Aktivität und Funktion des eNaC sind im Rahmen des Atemnotsyndroms stark eingeschränkt (Helve et al. 2004). Da der Na⁺-Kanal Amilorid sensitiv ist, kann man diese Situation durch eine endotracheale Applikation dieses Diuretikums simulieren.

Bei gleichzeitiger Gabe eines Katecholamins kann die Aktivität des NKCC in der TypII Pneumozyte erhöht und damit ein Flüssigkeitsstrom in den Alveolarraum induziert werden (Nielsen et al. 1998).

Dies hätte also eine Verminderung der alveolären Clearance zur Folge, die eine große Rolle bei der Mortalität des Atemnotsyndroms spielt (Brion et al. 2001; Pitkanen 2001). Eine erniedrigte alveoläre Clearance bringt eine Erhöhung des Gesamtlungenwassers mit sich, was wiederum eine Verschlechterung der Lungencompliance, also eine Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften der Lunge bewirkt (Flemmer et al. 2000). Die Compliance wiederum lässt sich als prädiktiver Parameter bezüglich des Outcomes am Atemnotsyndrom erkrankter Kinder nutzen (Simbruner et al. 1982).

Am Modell der isolierten perfundierten Rattenlunge sollen in der vorgelegten Arbeit die Effekte aktivierter bzw. inhibierter alveolärer Flüssigkeitsclearance auf lungenmechanische Größen beobachtet werden. Hierzu wurden die Lungenmechanik der Rattenlungen und weitere hinweisende Parameter bestimmt:

1.4.1 Blutdruck:

Der pulmonalarterielle und der pulmonalvenöse Blutdruck wurden bestimmt. Hierdurch kann die β -adrenerge Wirkung auf den arteriellen Schenkel beobachtet werden. Außerdem kann eine Erhöhung des pulmonalvenösen Druckes ausgeschlossen werden.

1.4.2 Lungenmechanik:

Um die Auswirkung der hier simulierten unterschiedlichen resorptiven Eigenschaften des Lungengewebes auf lungenmechanische Parameter zu testen, wurden mittels Forcierter Oszillationstechnik die Gewebeeigenschaften der Lunge unter den jeweiligen Versuchsbedingungen gemessen. Die Methode wurde gleichzeitig durch die Messung der klassischen Lungenmechanik validiert. Die Lungenmechanik, im speziellen die Compliance, ist wie bereits erwähnt ein wertvoller prädiktiver Parameter, um das Outcome an RDS erkrankter Frühgeborener abzuschätzen (Simbruner et al. 1982).

1.4.3 Lungenwasser:

Betrachtet man die oben beschriebene pathophysiologische Situation, so muß man annehmen, daß eine Lunge, deren resorptive Kompetenz eingeschränkt ist, einen erhöhten Gesamtwassergehalt aufweist. Wie im Kapitel Methoden beschrieben wurde hierzu das Gesamtlungenwasser bestimmt.

1.4.4 Flüssigkeitsverschiebung:

Um nachvollziehen zu können, wie Flüssigkeitsmenge bzw. Ionengehalt durch die Aktivität der Kanäle bzw Cotransporter beeinflusst werden, wurden dem hier verwendeten Perfusat während des Versuches zu festgelegten Zeitpunkten Proben entnommen und in diesen die Konzentrationen von Albumin, Na⁺, Cl⁻ bestimmt

1.4.5 NKCC-Expression und Aktivität:

Die Expression und Aktivität des in aktivem Zustand phosphorylierten Cotransporters wurde mittels Dotblot-Technik bestimmt. Hierzu wurde der phosphorspezifische Antikörper R5 verwendet. Das R5-Antikörper-Signal ist proportional zur Phosphorylierung des N-terminalen Endes des NKCC1 und spiegelt damit direkt die Aktivität des Cotransporters wieder. (Flemmer et al. 2000)

2. Material und Methode

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde das Modell der isolierten perfundierten und ventilierten Kleintierlunge verwendet, da an diesem Modell die Lungenmechanik isoliert, ohne systemische Einflüsse wie z.B. die Katecholamine der Nebenniere betrachtet werden kann. Die lungenmechanischen Messungen wurden mittels forcierter Oszillationstechnik ermittelt.

2.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden Spreague Dawley Ratten (Harlan und Winkelmann, Borchon, Deutschland) im Alter von 18.6 Tagen (18.6 ± 1.0 Tage, Gewicht 35.9 ± 5.7 g) verwendet.

Die Untersuchungen an den entnommenen Kleintierlungen wurde bei der Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern angezeigt.

2.2. Präparation

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (40mg/kg Kg) getötet. Nach Sistieren des Lidreflexes und Abflachen der Atmung wurden die Tiere gewogen. Zunächst erfolgte eine Tracheotomie, über welche die Beatmungskanüle eingeführt und mit einer Ligatur (Ethibond 4/0) gesichert wurde.

Die Lungen wurden mit einer Frequenz von 120/min und einem Tidalvolumen von $8-9 \mu\text{l/g KG}$ ($8.3 \pm 0.45 \text{ ml / kg KG}$), einem FiO_2 von 100% und einem

PEEP von ca. 3-4 cmH₂O volumenkontrolliert beatmet, wobei der PIP in der Regel zwischen 10 und 15 mmHg lag.

Zur Erstellung der isolierten Lungenperfusion wurde zunächst mit einem medialen Schnitt das Abdomen eröffnet und das Zwerchfell von kaudal dargestellt. Mit einer Mikroschere wurde das Zwerchfell inzidiert und unter striktem Erhalt der Pleura visceralis von der Thoraxwand gelöst. Der Thorax wurde durch einen medialen, parasternalen Schnitt eröffnet und Herz und Lunge wurden exponiert. In den rechten Ventrikel wurde Heparin 1 IE /g KG injiziert. Lunge und Herz wurden durch einen infradiaphragmalen Querschnitt entblutet, wobei Vena cava inferior und die Aorta abdominalis durchtrennt wurden.

Bevor die Ligatur um Aorta ascendens und Arteria pulmonalis gelegt wurde, wurde der Thymus stumpf abpräpariert. Die Perfusionskanüle wurde durch eine Inzision in den rechten Ventrikel bis in die Arteria pulmonalis eingeführt und durch die bereits angelegte Ligatur gesichert.

Die pulmonalvenöse Abflusskanüle wurde durch einen Schnitt in den linken Ventrikel bis in den linken Vorhof geführt, von wo aus der venöse Abfluß drainiert wurde. Nach der Präparation wurde der Deckel der Perfusionskammer geschlossen, um ein konstantes Milieu aufrecht zu erhalten.

Ausgeschlossen wurden Versuchstiere, bei denen es zu einer Verletzung der Pleura visceralis, einer Luftembolie in den Pulmonalgefäßen oder starker Sekretbildung in den großen Atemwegen gekommen war.

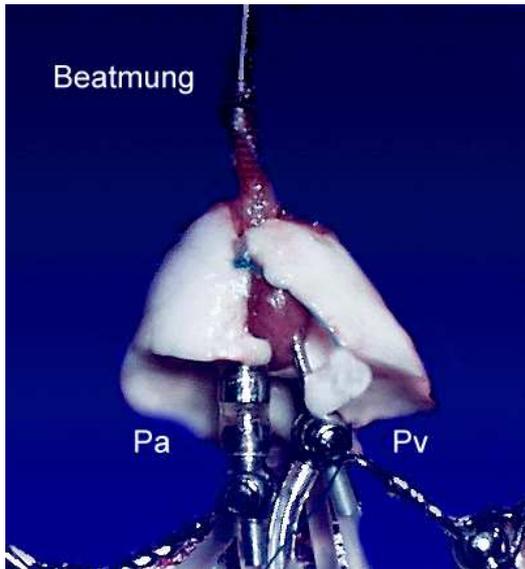


Abb. 2.1. Isolierte und perfundierte Lunge: Pa = Pulmonalarterielle Kanüle
Pv = Pulmonalvenöse Kanüle

2.3. Gesamtüberblick über die Versuchsanlage:

Der Versuchsaufbau der isolierten Lunge (IL1 type 839 Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland) ist in (Abb. 2.2) zu sehen (Uhlig et al. 1994a).

Als Perfusat wurde RMPI + 2g bovines Albumin + 6 ml destilliertes Wasser, (jeweils Sigma-Aldrich, Ismaning, Deutschland) verwendet. In dieser Zusammensetzung konnte eine Osmolarität erreicht werden, die der von Blut entspricht. Den Pfeilen folgend wurde das Perfusat in einer Geschwindigkeit von 20 ml/ min / kg KG (Uhlig & Wollin 1994a) durch die Rollerpumpe dem arteriellen Schenkel entlang zur arteriellen Kanüle hin durch die Lungengefäße gepumpt. Das Perfusat wurde durch die venöse Kanüle im linken Atrium aufgenommen und allein durch Gravitation zum Druckausgleichsgefäß (Abb. (2.3.16) weitergeleitet. Mit Hilfe dieses höhenverstellbaren Druckausgleichgefäßes kann der Auslaßdruck und damit der linksatriale Druck (Pven) geregelt werden. Der

Auslaßdruck lag in allen Versuchsgruppen zwischen 1,0 und 1,4 mmHg. Vom Druckausgleichsgefäß saugte die Rollerpumpe (REGLO-Digital Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland), in die in gegenläufiger Richtung ein zweiter Schlauch eingelegt worden war, das Perfusat wieder ab, das in einem geschlossenen Gefäß aufgefangen und nicht rezirkuliert wurde. Es handelte sich also hier um ein offenes System, da das aufgefangene Perfusat nicht mehr in den Kreislauf zurückgeführt wurde. Beatmet wurde die Lunge mit einem Piston-Pump-Respirator SAV SCIREQ (SCIREQ Montreal, Quebec, Canada) über den Trachealtubus (Abb. 2.3.15).

Während des Versuchs wurden an verschiedenen Punkten Messungen durchgeführt. Über mehrere geeichte Transducer wurden arterieller Druck (Abb 2.3.9), venöser Druck (Abb. 2.3.14) (Druckaufnehmer P75 Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland), Lungenimpedanz (Abb. 2.3.12) und Beatmungsdruck (Abb 2.3.10) gemessen. Diese Parameter wurden während des Versuches mit Flexivent-Software aufgezeichnet.

Die isolierte Lunge, (IL1 type 839, Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland) (Abb. 2.2) wurde auf einer Waage (LC 4801 P Sartorius, Göttingen, Deutschland) gelagert und das Gewicht alle 10 sec zur Qualitätssicherung des Versuches bestimmt. Um ein konstantes Milieu zu gewährleisten, wurde die Perfusionskammer mit destilliertem Wasser angefeuchtet und mit einem gewärmten Deckel geschlossen. Die gesamte Apparatur wurde kontinuierlich mit warmem Wasser, 37°C durchspült (Abb. 2.3) (Einhängethermostat E100, Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland).

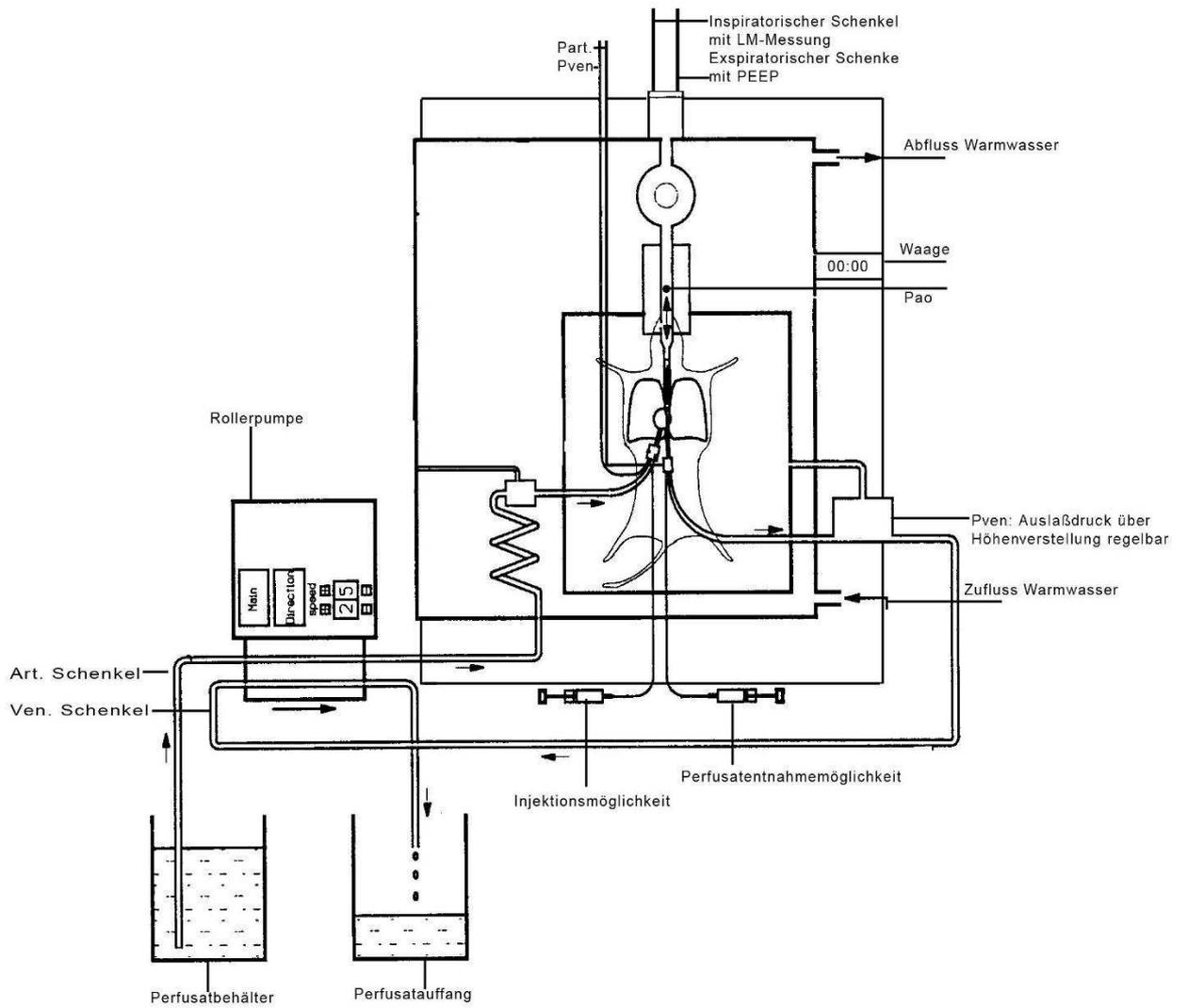


Abb. 2.2 Versuchsaufbau

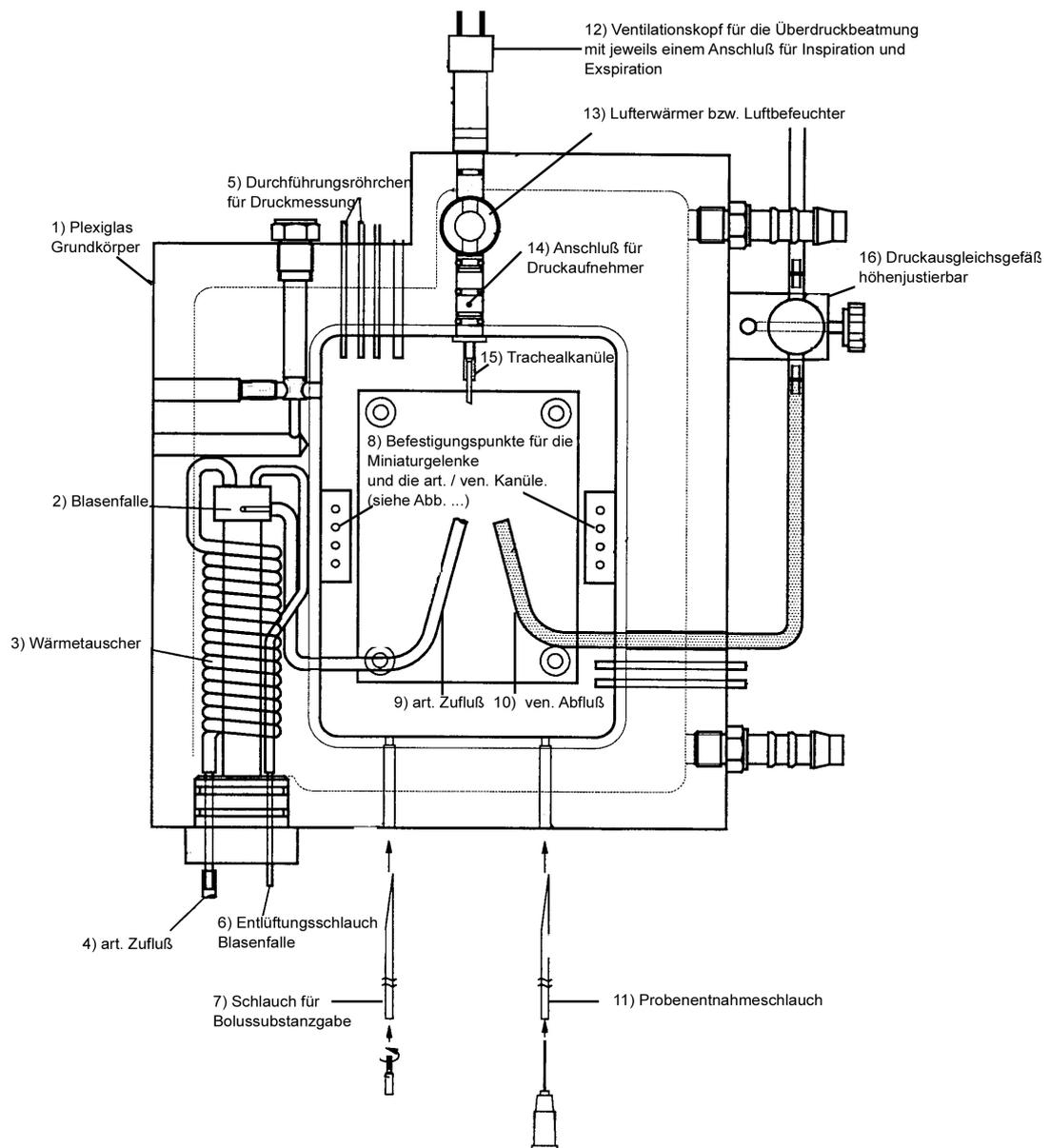


Abb.2.3. Isolierte perfundierte Lunge Größe 1. IL-1 Typ 839 Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland

2.4 Lungenmechanische Messungen

Um die einzelnen, die Lungenmechanik beeinflussenden Größen differenziert betrachten zu können, wurden diese mit Hilfe der forcierten Oszillationstechnik (FOT) ermittelt (2.4.1). Hierbei erhält man Resistance und Inertia, als Parameter der Widerstände sowie Elastizität und Gewebedämpfung als Messgrößen der Gewebeeigenschaften der Lunge. Parallel hierzu wurden auf klassische Weise die quasistatische Compliance und die Resistance (2.4.2) ermittelt, um die Ergebnisse der FOT zu evaluieren.

2.4.1 Forcierte Oscillationstechnik (FOT) (Stocks J 1996)

Die FOT wurde 1956 erstmals von Du Bois et al. (Frey et al. 1998) vorgestellt. Sie bestimmt die Lungenimpedanz, das heißt die frequenzabhängigen Widerstände der Lunge, als Maß ihrer mechanischen Eigenschaften. Bei der FOT-Messmethode wird davon ausgegangen, dass die Lunge nicht nur aus einem Rohr mit angeschlossenem, elastischen Ballon besteht (2.4 A), sondern dass zusätzliche, frequenzabhängige Kräfte in der Lunge wirken (Viscoelastisches Modell) (Abb. 2.4 B) (Irvin, 2003).

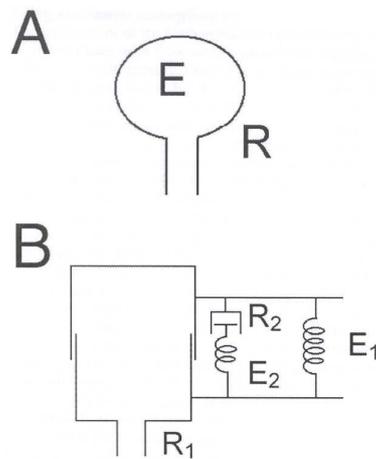


Abb. 2.4. A Rohr-Ballon- Lungenmodell 1. Ordnung und 2.4 B: homogenes Lungenmodell mit singularer Atemwegsresistance und „Klein-Körper“ mit zwei Spiralen E1, E2 sowie ein Kolben-Resistor, um den viscoelastischen Kräften der Lunge gerecht zu werden, Modell 2. Ordnung (Irvin 2003).

Du Bois et al. beschrieben die FOT als eine Methode, die Impedanz also die Schwingungseigenschaften des gesamten respiratorischen Systems durch ein oszillierendes Signal zu bestimmen.

Über eine Lautsprechermembran bzw. wie unserem Fall über den Kolben eines Respirators wird die Luftsäule in den Beatmungsschläuchen in Schwingung versetzt. Diese Schwingung besteht aus einer komplexen Oszillation, deren Frequenz aus dem Primzahl-Vielfachen einer Sinusschwingung mit 0,1 Hz besteht. Damit wird vermieden, dass harmonische Schwingungen erzeugt werden. (Hantos et al. 1992). Untersucht wurde jeweils ein Frequenzintervall von 0,25-19,65 Hz.

Diese variierenden sinusförmigen Schwingungen (Oszillation) werden in die Lunge appliziert und der resultierenden Druck (P_{rs}) und der Flow (V') werden gemessen. Der P_{rs}/V' Bruch, den man Impedanz nennt, wird durch den Betrag der Amplitude ($|Z|$) und die Phasenverschiebung (Φ) beider Signale ausgedrückt.

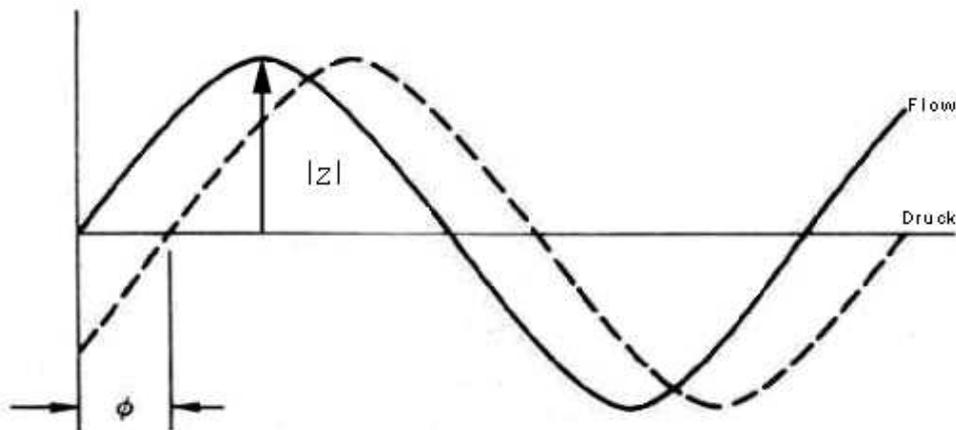


Abb. 2.5. Sinuskurve, Amplitude ($|Z|$), Phasenverschiebung (Φ).

Misst man die Impedanz, so werden P_{rs} und V' am selben Punkt gemessen.

Während Druck und Flow im Zeitverlauf gemessen werden, wird die Berechnung von Z im Frequenzraum durchgeführt, indem man mathematische Methoden wie die Fouriertransformation heranzieht. Im Prinzip kann jede zeitlich dargestellte komplexe Wellenform durch eine Anzahl Sinuswellen unterschiedlicher Frequenzen, Amplituden und Phasen dargestellt werden. Die Fouriertransformation bildet zeitlich verlaufende Wellenformen in ihren sinusförmigen Komponenten im Frequenzraum ab.

Um das Prinzip der FOT zu verstehen, ist ein einfaches Modell des respiratorischen Systems hilfreich, das verständlich macht, wie die mit dieser Technik ermittelten Parameter mit denen aus der Analyse des Zeitverlaufs

korrespondieren. Für Frequenzen unter etwa zwei Hertz kann das respiratorische System mechanisch als eine Reihe aus einem Widerstandselement (Resistance R_{rs}) und einem elastischen, kapazitiven Element (Compliance C_{rs}) dargestellt werden. Der leitende Druck (P_{rs}) erzeugt einen Fluss (Flow) durch die Resistance und Volumenänderungen $V(t)$ in der Compliance. Sind $P_{rs}(t)$ bzw. $P_{el}(t)$ die Druckabfälle an den Widerstands- bzw. der elastischen Komponenten, so gilt:

$$R_{rs} = P_{rs}(t) / V'(t) \quad (1)$$

und

$$C_{rs} = V(t) / P_{el}(t) \quad (2).$$

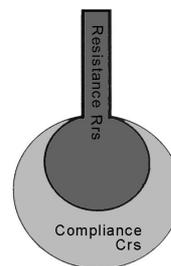


Abb 2.6:
Schematische
Darstellung der
Atemwege bzw.
Lungenparenchyms.

Da die Elemente in Reihe geschaltet sind, gilt:

$$P(t) = P_{rs}(t) + P_{el}(t) \quad (3)$$

Kombiniert man die Gleichungen(1), (2) und (3), so erhält man

$$P(t) = R_{rs} \cdot V' + V/C_{rs} \quad (4)$$

Diese Differentialgleichung 1. Ordnung stellt die Bewegungsgleichung eines 1-Kompartimentmodell dar (z.B. ein einzelner Ballon mit einer Compliance C_{rs} an einer Röhre mit einer Resistance R_{rs}) und kann gelöst werden, indem man den exponentiellen Volumenabfall $V(t)$ beobachtet, der einem Input-Step V_0 folgt:

$$V(t) = V_0 e^{-t/T_{rs}} \quad (5)$$

Hierbei ist $T_{rs} = R_{rs} \cdot C_{rs}$ die Zeitkonstante, welche die Dynamik des Systems charakterisiert.

Das gleiche System kann studiert werden, indem man statt einer auslösenden Treppenfunktion eine sinusförmige Funktion mit einer vorgegebenen Frequenz ($\omega = 2\pi$) benutzt. Der Druckabfall in der Resistance ist in Phase mit dem Flow (V') und der Druckabfall in der elastischen Komponente ist in Phase mit dem Volumen (V). Anstatt beide Größen, Flow (V') und Volumen (V) zu berücksichtigen, kann es von Vorteil sein, nur eine Variable (z.B. den Flow) zu berücksichtigen. Verwendet man die exponentielle Schreibweise sinusförmiger Funktionen, kann man folgende Beziehung zwischen V und V' darstellen:

$$V = V'/\omega j \quad (6)$$

Hierbei ist $j = \sqrt{-1}$; j ist die Einheit der imaginären Zahlen. j hat einen reellen Nutzen, da es die gleichzeitige Beobachtung der Komponenten des Flows ermöglicht, die in Phase bzw. nicht in Phase mit dem Druck sind.

Um die Bedeutung von j zu verstehen, betrachten wir einen Vektor der Länge a auf einer positiven horizontalen Achse (Abb. 2.7 a). Ein Vektor gleicher Länge und Ursprungs, aber entgegengesetzter Richtung wird als $-a$ bezeichnet. Daraus ergibt sich, dass eine Multiplikation mit -1 einer Rotation des Vektors um 180° entspricht. Für eine Rotation um 90° multiplizieren wir a mit einem Wert j . Um eine weitere Rotation um 90° zu erhalten, muss a ein weiteres Mal mit j multipliziert werden. Dann gilt: $-a = j \cdot j \cdot a$. Daraus folgt $j^2 = -1$. Die Multiplikation einer Quantität mit j entspricht also einer Rotation der vektoriellen Darstellung dieser Quantität um 90° (Abb. 2.7 b.) Hierauf basiert die vektorielle Darstellung in der komplexen Ebene, indem man die reelle Komponente auf die X-Achse und die imaginäre auf die Y-Achse projiziert.

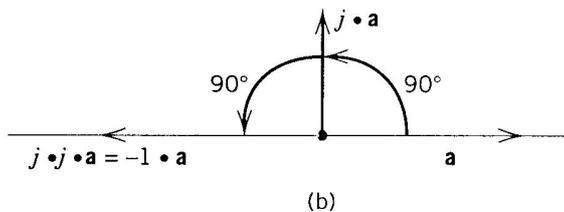
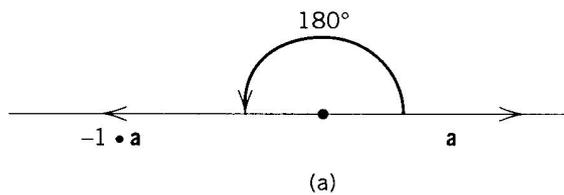


Abb. 2.7 (a)
 Projektion eines Vektors der Länge a auf eine horizontale Achse. Multipliziert a mit -1 , ist dies mit einer Rotation um 180° gleichzusetzen.

Abb. 2.7 (b) multipliziert man a mit j erhält man eine 90° rotation, so dass gilt:
 $j^2 = -1$ und $j = \sqrt{-1}$
 (Stocks J, 1996)

Da $j \cdot j = -1$ und $1/j = -j$ kann man Gleichung (6) folgendermaßen umformen:

$$V = -j \cdot V' / \omega \quad (7).$$

Setzt man dies für V in Gleichung (4) ein, führt dies zu

$$P_{rs} = R_{rs} \cdot V' - j \cdot V' / C_{rs} \cdot \omega \quad (8)$$

Dividiert man auf beiden Seiten durch V' , erhält man:

$$P/V' = R_{rs} - j / C_{rs} \cdot \omega \quad (9).$$

Der komplexe Bruch P/V' entspricht Z_{rs} und ist durch den Betrag der Amplitude ($|Z_{rs}|$) und dem Phasenwinkel (Φ) zwischen P_{rs} und V' definiert. In diesem Fall ist R_{rs} die 'in-Phase' Komponente von Z_{rs} und $-1/C_{rs} \cdot \omega$ oder die Reactance (X_{rs}) die phasenverschobene Komponente.

Z_{rs} kann in einer allgemeineren Form geschrieben werden, die für jedes lineare System gilt, so kompliziert es auch sein mag:

$$Z_{rs} = R_{rs} + X_{rs} \cdot j \quad (10)$$

Wobei

$$R_{rs} = |Z_{rs}| \cdot \cos \Phi \quad (11)$$

$$X_{rs} = |Z_{rs}| \cdot \sin \Phi \quad (12)$$

Und

$$\Phi = \arctan (X_{rs}/R_{rs}) \quad (13)$$

Desweiteren gilt:

$$|Z_{rs}| = (R_{rs}^2 + X_{rs}^2)^{0.5} \quad (14)$$

Da in dem oben beschriebenen linearen 1-Kompartiment-Modell des respiratorischen Systems $X_{rs} = -1/C_{rs} \cdot \omega$, kann Gleichung (13) mit folgendem Term gleichgesetzt werden:

$$\Phi = \arctan [-1/(R_{rs} \cdot C_{rs} \cdot \omega)] = \arctan[-1/\tau_{rs} \cdot \omega] \quad (15)$$

Hierdurch erlaubt die FOT die Berechnung der gleichen Parameter wie jede andere Technik, unter der Annahme, dass das respiratorische System durch ein lineares Modell dargestellt werden kann.

Oszilliert P_{rs} in höherer Frequenz als die spontane Atem- bzw. Beatmungsfrequenz, muss zusätzlich ein Trägheitselement (Inertance I_{rs}) in das Modell eingeführt werden, um Druckveränderung in Phase mit Volumenbeschleunigungen beurteilen zu können. So besteht das übliche Modell mit dem man Impedanzdaten interpretiert aus Resistance, Inertance und Compliance in Reihe (Abbildung 2.8a). Die Resistance repräsentiert das gesamte R_{rs} und die Inductance resultiert aus der Trägheit der Luft in den Atemwegen, die durch oszillierende Drücke hin und her bewegt wird. Die Capacitance stellt die Complianceeigenschaften der Lunge dar. Diese Elemente

lassen sich am besten durch ihre Äquivalente aus der Elektrizitätslehre beschreiben.

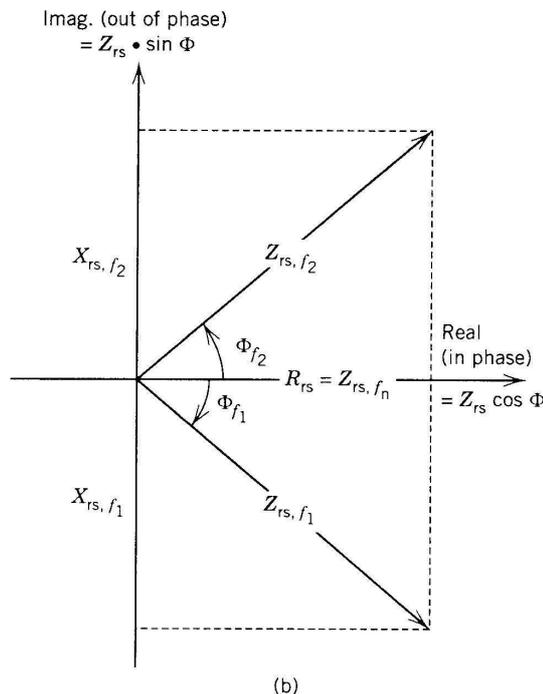
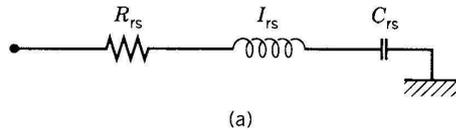


Abb. 2.8 (a) Konventionelles Modell 2. Ordnung des respiratorischen Systems, wobei R_{rs} , I_{rs} und C_{rs} für Resistance, Inertance und Compliance stehen. I_{rs} steht für Druckänderungen in Phase mit Volumenbeschleunigung, die bei hohen Frequenzen signifikant ist.

Abb. 2.8 (b) U als Vektor in der komplexen Ebene. Der reelle Anteil R_{RS} (in phase) und der imaginäre Anteil X_{rs} (out of phase) von Z_{RS} werden bestimmt durch $|Z_{RS}| \cos\Phi$ und $|Z_{RS}| \sin\Phi$. X_{rs} ist negativ bei niedriger Frequenz, wobei es bestimmt wird durch das elastische Element $(-1/C_{rs} \cdot \omega)$, ist Null bei der Resonanzfrequenz (f_n) und positiv bei hoher Frequenz, wobei es bestimmt wird durch die Inertia ($I_{rs} \omega^2$). Bei diesem Modell ist R_{RS} n.b. frequenzunabhängig. (Stocks J, 1996)

Aus der Elektrizität wissen wir, dass die Potentialdifferenz (U) über $R(U_R)$ in Phase ist mit der Stromstärke (I) im Stromkreis. Bei U über dem induktiven Element (U_L) eilt sie dem Strom I um 90° voraus, wohingegen I bei U über einem kapazitiven Element um -90° verschoben ist. Die Vektorsumme von $(U_L - U_C)$ und U_R ist gleich der Differenz U , weshalb gilt:

$$U^2 = U_R^2 + (U_L - U_C)^2 \quad (16)$$

Da $U_R = I \cdot R$, $U_L = I \cdot X_L$ und $U_C = I \cdot X_C$, wobei X_L und X_C den Widerstand der des induktiven bzw. kapazitiven Elementes darstellen, darf man schreiben:

$$U = I[R^2 + (X_L - X_C)^2]^{0,5} \quad (17)$$

Da $Z = U/I$ ist $Z = [R^2 + (X_L - X_C)^2]^{0,5}$ und $\tan\Phi = (X_L - X_C)/R$.

Da $X_L = \omega L$ und $X_C = 1/\omega$ variiert Z mit der Frequenz der eingesetzten Wechelspannung. Tatsächlich wird X_C kleiner und X_L größer mit steigender Frequenz. Bei der sogenannten Resonanzfrequenz erreicht Z ein Minimum, wenn $X_L - X_C = 0$.

Wenn das respiratorische System genau durch ein lineares Modell, welches aus Resistance und Compliance oder Resistance, Inertance und Compliance in Serie (RLC-Modell) besteht, wiedergegeben werden könnte, würde der reelle Anteil der Impedanz nicht mit der Frequenz variieren. Allerdings beobachtet man auch bei gesunden Subjekten eine sog. negative Frequenzabhängigkeit des reellen Teils der Resistance.

Eine frequenzabhängige Erniedrigung des reellen Teils von Z , weist darauf hin, dass sich das respiratorische System nicht wie ein einfaches lineares RLC-Modell verhält. Dieser Effekt kann von einer Reihe von Mechanismen z.B. der Viscoelastizität des Gewebes, der Compliance der Atemwegswände oder der Ungleichmäßigkeit der Beatmung hervorgerufen werden. Seine Beschreibung würde ein deutlich komplizierteres Modell des respiratorischen Systems erfordern. Die FOT nimmt allerdings an, dass sowohl das Meßsystem als auch die mechanischen Eigenschaften des respiratorischen Systems während der

Messung und für die angewendete Druckamplitude linear sind (Goldman M 1970; Landser FJ 1976; Landser FJ 1979).

Dies impliziert:

1. Z_{rs} ist unabhängig von der Amplitude des oszillatorischen Drucks und des resultierenden Flows; d.h. Z_{rs} ist konstant über dem Bereich des angewendeten Drucks und des gemessenen Flows
2. Für eine gegebene Frequenz sind Z_{rs} -Werte aus komplexen forcing-Funktionen, wenn sie im Frequenzraum analysiert werden, denen gleichzusetzen, die man von einer einfachen, sinusförmigen Schwingung bei entsprechender Frequenz im zeitlichen Verlauf erhält.

Wenn das respiratorische System linear, ist kann die forcing-Funktion der spontanen Atmung überlagert werden, womit es möglich ist Z_{rs} für jede Frequenz der forcing-Funktion zu mitteln (Fry DL 1960; Goldsmith 1958; Hyatt 1950)

Mit Hilfe der verwendeten Auswertungsprogramme Flexdat und Anadat (Scireq, Toronto, Canada, RHT Infodat Inc. Montreal, Que., Canada) wurde ein 4-Komponenten-Modell angepasst. Durch die Kurvenauswertung mittels Fourier-Analyse (FFT, s.a. 2.4.3) konnten so Daten für Resistance, Lungenelastance, Inertance (Trägheit) und Gewebedämpfung errechnet werden. Die Gewebedämpfung beschreibt dabei die frequenzabhängige Komponente des reellen Teils der Impedanzkurve und gibt somit Aufschluß über die viscoelastischen Eigenschaften der Lunge. Der Vorteil der FOT in der isolierten Kleintierlunge besteht in der Möglichkeit, differenzierte Informationen über diese

gewebemechanischen Eigenschaften der Lunge durch Analyse einer Impedanzkurve zu erhalten. Das bedeutet, dass mit einer Messung sensitive Aussagen über die mechanischen Eigenschaften der Lunge erhoben werden können. Um einen Anhalt über viscoelastische Kräfte der Lunge zu erhalten, wird in der Regel eine statische Messung der Druck- Volumenänderung vorgenommen. Da Kleintiere mit einer hohen Frequenz atmen und die Atemwege sehr klein sind, ist die Bestimmung mittels klassischer statischer Messung wenig genau.

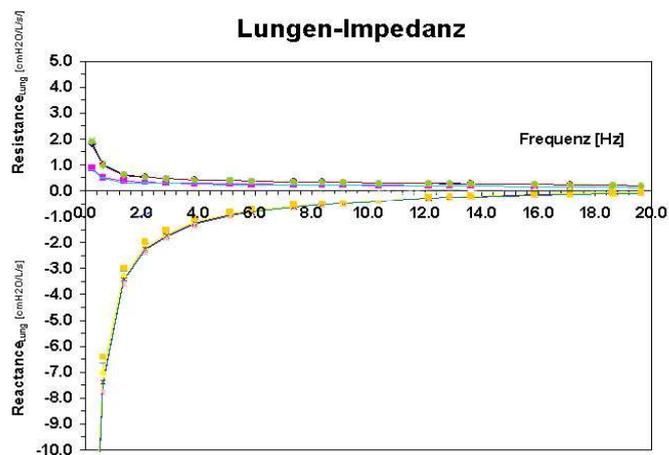


Abb 2.9: Darstellung der Lungen-Impedanz im Frequenzraum. Positiver Anteil: Resistance des respiratorischen Systems (Rrs), negativer Anteil: Reactance

2.4.2. klassische Lungenmechanik

In der klassischen Lungenmechanik wird das respiratorische System mechanisch als eine Reihe aus einem Widerstandselement (Resistance R_{rs}) und einem elastischen, kapazitiven Element (Compliance C_{rs}) dargestellt werden. Der leitende Druck (P_{rs}) erzeugt einen Fluss (Flow) durch die Resistance und Volumenänderungen $V(t)$ in der Compliance. Sind $P_{rs}(t)$ bzw. $P_{el}(t)$ die Druckabfälle an den Widerstands- bzw. der elastischen Komponenten, so gilt:

$$R_{rs} = P_{rs}(t) / V'(t) \quad (1)$$

und

$$C_{rs} = V(t) / P_{el}(t) \quad (2).$$

Die Resistance in $\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s}/\text{L}$ bezeichnet die zur Erzeugung eines bestimmten Atemgasflows (in L/s) erforderliche Druckdifferenz.

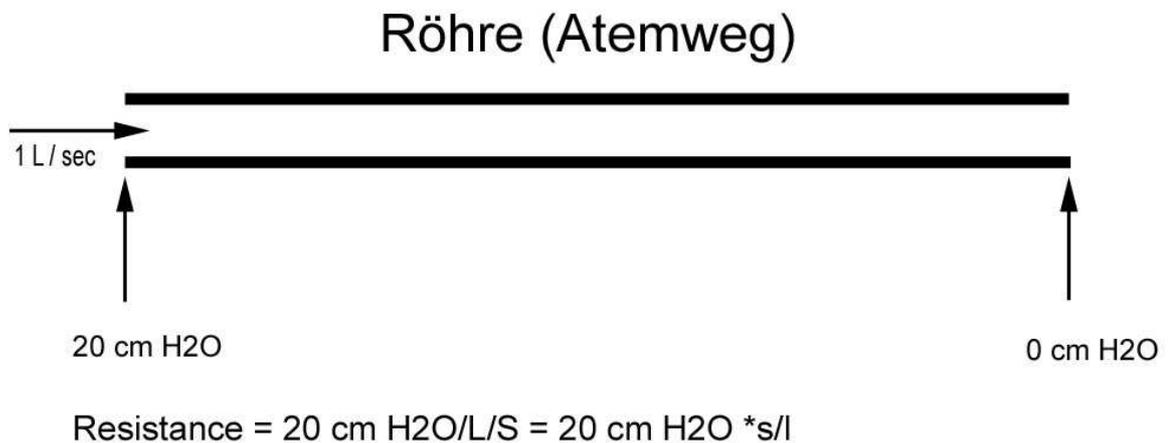


Abb. 2.10. Resistance

Die Compliance in mL/cmH₂O wiederum stellt die Volumenänderung pro Druckänderung dar.

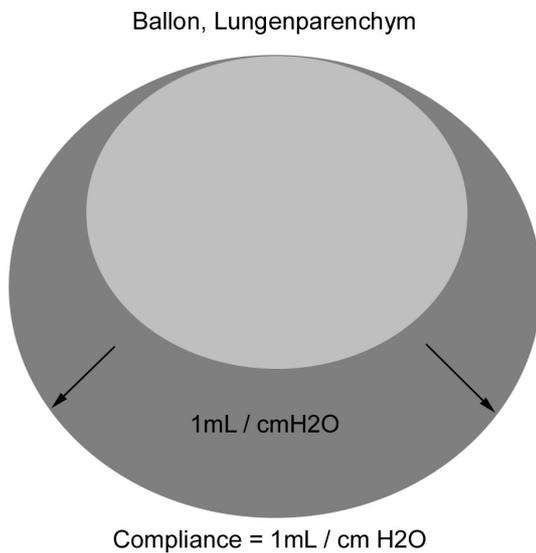


Abb. 2.11 Compliance

2.4.3. Fast Fourier Transformation (FFT)

Die FFT ist ein mathematischer Prozess, bei dem ein komplexes Signal als Summe von Sinusfunktionen in Abhängigkeit unterschiedlicher Amplituden und Phasenrelationen ausgedrückt werden kann. Dadurch entsteht eine Transformation des zeitlichen Verlaufs in den frequentiellen. Gemäss dem Prinzip der Überlagerung kann ein periodisches Signal in eine Anzahl von sinusoiden Komponenten zerlegt werden, deren Summe wieder das ursprüngliche Signal ergibt.

2.5. Weitere Messgrößen

2.5.1. Gesamtlungenwasser

Das Gesamtlungenwasser als Anhaltspunkt für den aktiven Ionen- bzw. Wassertransport der Pneumozyten wurde am Ende des jeweiligen Versuches ermittelt.

Hierzu wurde der rechte Lungenflügel entnommen, gewogen 48 Stunden bei 80°C getrocknet und abermals gewogen. Die Differenz zwischen Nass- und Trockengewicht entspricht dem Gesamtlungenwasser. Die Gewichtsänderungen in Prozent wurden dann miteinander verglichen.

2.5.3. Albumin-, Natrium-, Kalium-Konzentration im Perfusat

Zur Ermittlung der Änderung der Konzentrationen von Albumin, Natrium und Kalium . wurde zu Zeitpunkten 0', 10', 20', 30', 40', 50', 60' und 70' über eine Minute lang das Effluat aus dem venösen Schenkel gewonnen und zu einem späteren Zeitpunkt hinsichtlich der Konzentration von Albumin, Natrium und Kalium maschinell (Hitachi 917, Hitachi, Japan) analysiert.

2.5.4. Arterieller und venöser Perfusatdruck

Sowohl an der arteriellen als auch an der venösen Kanüle wurde über einen mit Wasser gefülltem Schlauch der Druck aufgenommen und jeweils alle 10 min an einen Drucktransducer (Druckaufnehmer P75 Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland) übermittelt und gemessen.

2.6 P-NKCC Bestimmung

2.6.1. Homogenisierung des Lungengewebes:

Die entnommene rechte Lungenhälfte wurde zur Bestimmung der Menge an phosphoryliertem NKCC homogenisiert. Hierzu wurde die Lunge zunächst gewogen und anschließend in 1,5 ml Homogenisierungspuffer pro Probe (Succrose 1M, Histidin 0,1M, Proteinase Inhibitor 1:500, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH Steinheim Germany, in PBS, LMU Klinikum Innenstadt, München, Deutschland) mit Caliculin-A (0,5 μM) (Alexis Biochemicals, Heidelberg, Deutschland), sowie einer gewichtsabhängigen Menge Proteinaseinhibitor, von 1 μl je 0,01g Gewebe manuell auf Eis homogenisiert. Der Proteaseinhibitor wurde hinzugefügt, um intrinsische Proteaseaktivität zu inhibieren.

Von diesem Homogenisat wurden 50 μl zur späteren Proteinbestimmung entnommen.

Der verbleibende Rest wurde zunächst für 10 min bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert, um grobe Zellbestandteile zu separieren.

Der hieraus resultierende Überstand wurde für 30 min mit 75000 rpm wiederum bei 4°C ultrazentrifugiert. Damit wurden Zellmembranen im entstehenden Pellet konzentriert.

Der nun entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 μl Homogenisierungspuffer pro 0.1g Ausgangs-Lungengewebe resuspendiert. Diese Membranpräparation wurde bis zur weiteren Verarbeitung (Proteinbestimmung und Dot-Blotting) bei -80°C aufbewahrt.

2.6.2 Proteinbestimmung

Die Gesamt-Proteinkonzentration der Membranpräparation wurde photometrisch mit Hilfe eines kommerziellen Protein-Assays (BCA-protein Assay Reagent A und B, Pierce, Boston, USA) bestimmt. Hierzu wurde zunächst eine Albumin-Standardreihe (Biochrom AG Seromed, Berlin Deutschland) hergestellt.

Es wurden 10 verschiedene Albumin-Konzentrationen (0, 12.5, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 und 1000 µg/ml) hergestellt, mit deren Hilfe eine Eichgerade ermittelt wurde.

Je 50 µl der jeweiligen Standardverdünnungen wurden in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Von jeder Membranpräparation wurde eine 1:25 bzw. 1:50 Verdünnung hergestellt, wovon ebenfalls 50µl in ein Eppendorfgefäß gegeben wurde. Die Verdünnung war notwendig, um im linearen Messbereich der hier verwendeten Standardreihe zu bleiben.

Der Standardreihe und den Membranpräparationen wurde jeweils 1 ml des BCA-Assay in einem Verhältnis von 50 Reagenz A : 1 Reagenz B beigemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Daraufhin wurde die Extinktion bei 562 nm photometrisch bestimmt und mit Hilfe der Standardreihe der Proteingehalt der Proben ermittelt. Die Extinktion wurde dreimal gemessen und der daraus resultierende Mittelwert zur Berechnung verwendet.

2.6.3 P-NKCC-Bestimmung mittels Dotblot-Technik

Für die Untersuchung der P-NKCC Expression in den ventilerten Lungen wurden die Membranpräparationen mit Hilfe der Dotblot-Technik untersucht. Dies war möglich, da zuvor gezeigt werden konnte, dass R5 spezifisch und sensitiv den phosphorylierten NKCC in verschiedensten Geweben detektiert (Flemmer et al. 2002). Für die Untersuchung wurde die Dotblot-Apparatur der Firma Biorad (BIO RAD, BIO DOT APPARATUS, Richmond CA, USA) verwendet. Über eine 96-Well Abdeckung können dabei die Proben direkt auf einzelne Vertiefungen (Wells) auf einer Membran (PVDF-Membranes, Hybond-P, Amersham, Buckinghamshire, England) aufgebracht werden. Die Proben wurden dann langsam mit minimalem Sog in die PVDF-Membran transferiert, welche Proteine kovalent binden kann. Jedes Well wurde mit 10 µg in 150 µl Transferbuffer (100 ml 10x Tris/Glycine Buffer, BIO RAD Richmond CA, USA , 100 ml Ethanol, Merck, Frankfurt, Deutschland und 800 ml destilliertes Wasser) befüllt. Pro Blot wurden je 8 Wells mit identischen Proben befüllt, um durch Ergebnismittelung Pipettiervariabilität auszugleichen.

Die Membran wurde danach für 1 h in 20ml 7.5%iger PBS-Tween-Milch geblockt (PBS, LMU Klinikum Innenstadt, München; Tween, ICN biomedical Inc., Eschwege, Deutschland, Magermilchpulver, Merck, Frankfurt, Deutschland).

Die Membran wurde über Nacht bei 4° C im mit PBS-Milch verdünntem primärem Antikörper R5 (1:1000) inkubiert

Der nicht an Protein gebundene primäre Antikörper R5, wurde 3 x in 20 ml 7,5% Tween-Milch für jeweils 20 min abgewaschen. Die Membran wurde dann für eine

Stunde in dem mit PBS-Tween-Milch 1: 10000 verdünnten sekundären Antikörper inkubiert (Anti-Rabbit IgG mit Peroxidase Konjugat, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH Steinheim Germany). Nun wurde die Membran für jeweils 20 min in PBS-Tween drei weitere Male gewaschen. Zur Detektion der Antikörperbindung wurde eine Chemielumineszenzreaktion des gebundenen sekundären Antikörpers mit Luminalsubstrat (Super Signal West Dura Extended, Pierce, Boston, USA) induziert.

Die Chemielumineszenz-Reaktion wurde mit einer CCD-Kamera (UVT 20M, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland) detektiert, optisch dargestellt und schließlich mit Hilfe der AIDA Software (AIDA, Raytest, Straubenhardt, Deutschland) densitometrisch ausgewertet. Die elektronische Detektion stoppt automatisch vor Erreichen einer Überexposition an einer Stelle des Bildes. Damit ist die Signaldetektion im linearen Bereich der Reaktion gewährleistet.

2.7 Versuchsprotokoll, Interventionen, Versuchsgruppen, Meßgrößen

2.7.1 Versuchsprotokoll

Vor Beginn eines jeden Versuches wurde die jeweilige Versuchsgruppe durch eine a priori Randomisierung ermittelt.

Jeder Versuch wurde, unabhängig von seiner Versuchsgruppe, nach dem gleichen Schema und abgestimmt auf das Körpergewicht des Versuchstieres durchgeführt. Die ersten 15 min dienten bei allen Versuchen als sogenannte Baseline, die zur Vergleichsgrundlage herangezogen wurde. Nach diesem

Zeitraum wurde die jeweilige Intervention durchgeführt und das Protokoll erneut gestartet. Die Lunge wurde nun über einen Zeitraum von 60 min beobachtet, woraus sich eine Nettoversuchszeit von 75 min ergab.

Alle 10 Minuten wurden Lungenmechanik und Perfusionsdrücke ermittelt.

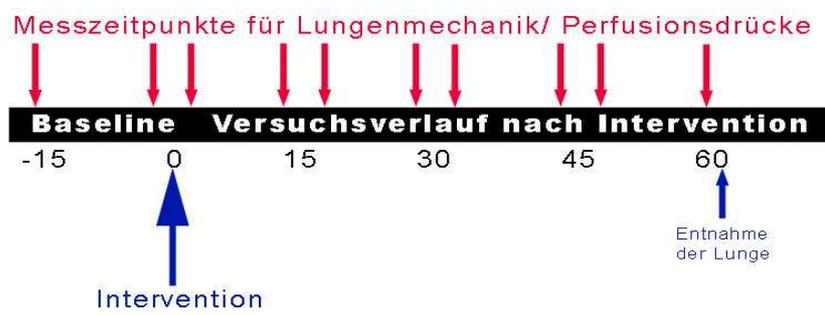


Abb.: 2.12 schematische Darstellung des Versuchsverlaufes.

2.7.2 Interventionen

Jeder Gruppe wurde nach der Baseline endotracheal Amiloride ($10^{-3}M$) in DMSO bzw. DMSO (Sigma-Aldrich, Ismaning, Deutschland) alleine in einem Volumen von 3 μ l/g KG 0.9% NaCl, welches etwa 10% der funktionellen Residualkapazität (30 ml/kg/KG) entsprach, in die Lunge instilliert. Zusätzlich wurden ca. 5 μ l/g KG Luft aufgezogen, die dann gleichzeitig insuffliert wurden, um eine möglichst gut Verteilung des jeweilig applizierten Stoffes zu gewährleisten. Zur endotrachealen Applikation wurde der Tubus diskonnektiert, eine stumpfe 24 G Kanüle über die Trachealkanüle in die Trachea eingeführt und die der jeweiligen Intervention entsprechenden Flüssigkeit instilliert. Der Tubus wurde dann wieder rekonnektiert.

Das Perfusat wurde gewechselt, wobei entweder auf Perfusat + Isoproterenol 10µM oder Perfusat + DMSO, die Trägersubstanz für Isoproterenol, umgestellt wurde.

Zum Perfusatwechsel musste die zuführende Leitung abgeklemmt werden. Die Schläuche und die Blasenfalle wurden entleert und mit neuem Perfusat blasenfrei befüllt, um einen Stepchange zu erreichen, d.h. um ein langsames Ansteigen der Medikamentenkonzentration zu vermeiden. Erst dann wurde die Zuleitung wieder geöffnet und die Lunge perfundiert.

2.7.4 Optische Validierung der endotrachealen Applikation

Bei einer kleinen Reihe von Versuchstieren wurde mit Methylenblau gefärbtes destilliertes Wasser in gleicher Weise wie bei den übrigen Experimenten endotracheal in die Lunge instilliert. Ziel dieser Prozedur war es, zu validieren, ob auch die distalen Atemwege mit diesem Vorgehen erreichbar sind.

Zur endotrachealen Applikation wurde der Tubus diskonnektiert, eine 24G Kanüle wurde über die Trachealkanüle in die Trachea eingeführt und Flüssigkeit instilliert. Die Kanüle wurde dann wieder rekonnektiert.

Wir applizierten wie in der Versuchsreihe ein Volumen von 3 µl/g KG mit Methylenblau gefärbten destillierten Wassers in die Lunge, welches etwa 10% der funktionellen Residualkapazität von 30 ml/kg(KG) entspricht.

Zusätzlich wurden ca. 5 µl/g KG Luft aufgezogen, die dann gleichzeitig insuffliert wurden, um eine möglichst gut Verteilung des jeweilig applizierten Stoffes zu gewährleisten. Zur endotrachealen Applikation wurde der Tubus diskonnektiert,

eine stumpfe gelbe Kanüle wurde über die Trachealkanüle in die Trachea eingeführt und Flüssigkeit instilliert. Die Kanüle wurde dann wieder rekonnektiert.

Somit erhielten wir eine optische Kontrolle der Effektivität unseres Vorgehens.

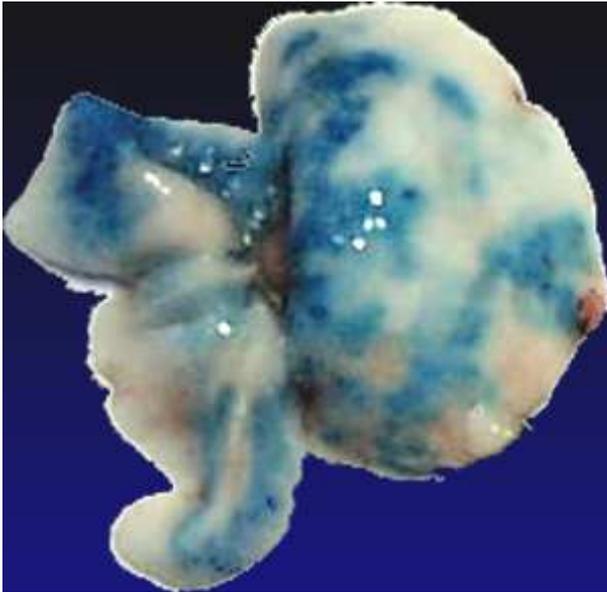


Abb. 2.13: mit Methylenblau gefüllte Lunge. Hierdurch wurde die adäquate Verteilung der instillierten Flüssigkeit kontrolliert.

Abbildung 2.13 zeigt sich die bis weit distal reichende Blaufärbung der Lunge.

2.7.4 Versuchsgruppen

Aus der Kombination der oben Beschriebenen Behandlungsformen ergaben sich

4 Gruppen:

- i) **Control(C):** Vehikel (DMSO) (e.t.) in 3 ml /kg KG NaCl 0.9% endotracheal (e.t.) + Vehikel intravenös (i.v.) (DMSO) im Perfusat.
- ii) **Amilorid (e.t.) (A):** Amilorid (e.t.) 10^{-3} M (gelöst in DMSO-Stock) in 3ml/kg KG NaCl0.9% + Vehicle (i.v.).
- iii) **Amilorid (e.t.) + Isoproterenol (i.v.) (A+I):** Amilorid 10^{-3} in 3ml/kg KG NaCl 0.9% (e.t.) + Isoproterenol 10^{-5} M (i.v.).
- iv) **Isoproterenol (I):** Vehikel (e.t.) (DMSO) in 3 ml/kg KG 0.9% NaCl + Isoproterenol 10^{-5} M (i.v.)

Pro Gruppe wurden 10 Lungen untersucht.

2.7.5 Messgrößen

Folgende Messgrößen wurden während des Versuches erhoben:

Perfusionsdruck:

Über die bereits beschriebenen Kanülen in der Arteria pulmonalis bzw dem linken Atrium wurden Perfusionsdruck bzw Druck im Effluat bestimmt. Der Effluatdruck ist mit dem transkapillären Druck im Lungengefäßbett gleichzusetzen.

Lungenmechanik:

Gemessen wurde die mechanische Impedanz der Lunge. Dabei wurden Elastance (E_{tis}), Resistance (R_{aw}), Inertia (I_{aw}), Tissue dumping (G_{tis}) mittels Forcierter Oszillationstechnik (FOT) errechnet, die Impedance (Z_{tis}) und die Resistance (R_{rs}) und quasistatische Elastance (E_{rs}) durch multiple Regression ermittelt.

Lungenwasser

Die Gewichtsänderung über die Zeit wird über den ganzen Versuchszeitraum hinweg mit einer Waage (Sartorius) gemessen.

Elyte und Albumin

Zusätzlich wurde zu Zeitpunkten 0', 10', 20', 30', 40', 50', 60' und 70' über eine Minute lang das Effluat aufgefangen und zur späteren Analyse auf Na, K und Albumin (Hitachi 917, Hitachi, Japan) eingefroren.

P-NKCC:

Nach dem Versuch wurde der rechte Lungenflügel in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einem Mörser zerkleinert und bis zur Homogenisierung und Proteinbestimmung aufbewahrt. Der linke Lungenflügel hingegen wurde zur Gesamtlungenwassermessung herangezogen.

2.8 Analyse-Software

Mit Hilfe der Software Flexdat war es möglich, die Volumen –bzw. Drücke, die während des Versuches durch Flexivent gemessen worden sind, in ASCII-Format abzuspeichern. Damit wurden die verschiedenen weiterführenden Analysen der Daten ermöglicht.

Das Programm Anadat wandelt die Impedanzdaten mittels Fast Fourier Transformation und die Daten der klassischen Lungenmechanik mit Multipler Linearer Regression in Lungenmechanische Messgrößen um.

Als Maß für die Datenqualität wurde der COD (Coherence of Determination) bestimmt. Nur Daten mit einem $COD > 0,98$ wurden in die Auswertung aufgenommen.

Exkludiert wurden ferner auch die Daten, die durch Sekret in den Atemwegen bzw. durch ein Luftleck verfälscht worden waren.

2.9 Statistische Analyse

Die Gruppengröße jeder experimentellen Bedingung wurde anhand von Pilotversuchen berechnet, woraus sich eine Anzahl von zehn Tieren (Gruppe endotrachealer Applikation) pro Versuchsgruppe ergab, um einen 20 %igen Unterschied bei Lungenmechanik und Gesamtlungenwasser zu erzielen. Die Daten wurden mit ANOVA für unabhängige Gruppen ermittelt. Unter den entsprechenden Voraussetzungen wurde der least significant difference Test LSD angewandt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% angesetzt. (SPSS 13. X, SPSS Corp. Illinois, USA).

3. Ergebnisse:

3.1 Beschaffenheit der Gruppen:

Zwischen den vier Behandlungsgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des postnatalen Alters und des Körpergewichts.

Intervention	C	A	I	I+A
Alter in Tagen Mittelwert \pm SD	18.6 \pm 1.1	18.4 \pm 1.1	18.7 \pm 1.1	18.9 \pm 1.1
Körpergewicht in Gramm Mittelwert \pm SD	33.2 \pm 5.1	36.4 \pm 4.5	37.2 \pm 6.7	37.0 \pm 6.1

Tab. 3.1 Alter der Versuchstiere

3.2 Perfusionsdruck:

Der Pulmonalarterielle Druck stieg in allen vier Gruppen über die Zeit an.

Intervention	C	A	I	I+A
Blutdruckanstieg in mmHG Mittelwert \pm SD	6.7 \pm 0.7 auf 8.5 \pm 1.4	7.1 \pm 0.7 auf 8.2 \pm 1.2	6.8 \pm 0.9 auf 9.1 \pm 4.3	6.1 \pm 1.5 auf 6.8 \pm 1.4

Tab. 3.2 Pumonalarterieller Druck über die Zeit.

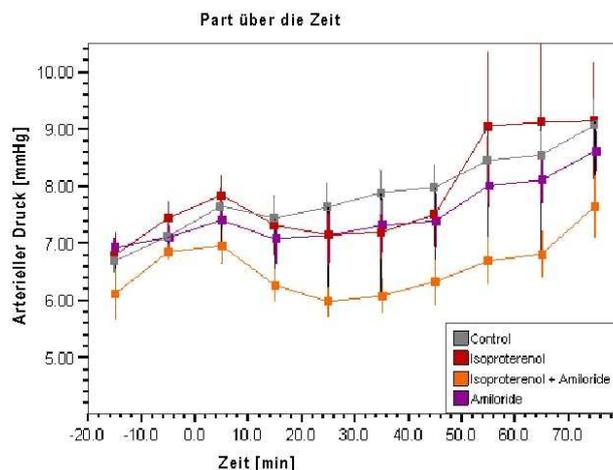


Abb. 3.1: Pulmonalarterieller Druck über die Zeit, Mittelwert \pm SEM ($p=0.023$ 5 min vs. 25 min, I+A)

In den beiden Gruppen, die Isoproterenol (**I und A+I**) erhielten, sank der arterielle Druck nach der Gabe von Isoproterenol in das Perfusat über einen begrenzten Zeitraum (**I**: von 7.8 ± 1.0 auf 7.1 ± 1.7 mmHg, $p= 0.29$; **I+A**: von 6.9 ± 1.0 auf 6.0 ± 0.8 mmHg, 5 min vs. 25 min, $p= 0.023$; Mittelwert \pm SD). Dies weist auf einen vorübergehenden Abfall des pulmonalvaskulären Widerstandes hin, ausgelöst durch Isoproterenolinfusion. (Abbildung 3.1). Der pulmonalvenöse Druck blieb konstant und war in allen vier Gruppen über die gesamte Versuchsdauer hinweg gleich (**C**: 1.0 ± 0.9 , **A**: 1.2 ± 1.0 , **I**: 1.1 ± 1.0 , **I+A**: 1.4 ± 0.8 mmHg, mean \pm SD). In keiner der vier Gruppen verursachte die endobronchiale Instillation von $3\mu\text{l/g BW}$ Flüssigkeit mit oder ohne Amilorid oder Perfusion mit Isoproterenol eine Änderung des pulmonalvenösen Druckes.

3.3 Lungenmechanik:

Um die FOT am Modell der isoliert perfundierten Lunge zu validieren, verglichen wir zwei unterschiedliche Analyseverfahren: die Compliance-Werte der FOT verglichen wir mit denen der quasistatischen Compliance, die wir mittels multipler Linearer Regression analysierten. Die FOT-Messungen bestätigten die quasistatische Lungencompliance exakt. Dies stellt die lineare Korrelation mit einem Y-Achsenabschnitt -0.20 und einer Steigung von 0.95, $r^2 = 0.95$ ($p < 0.005$) dar. Bland-Altman Analyse (Abbildung 3.2) zeigt eine mittlere Differenz der FOT-Messungen gegenüber der quasistatischen Compliance von $+0.27 \pm 0.13$ ml/cmH₂O (Mittelwerte \pm SD).

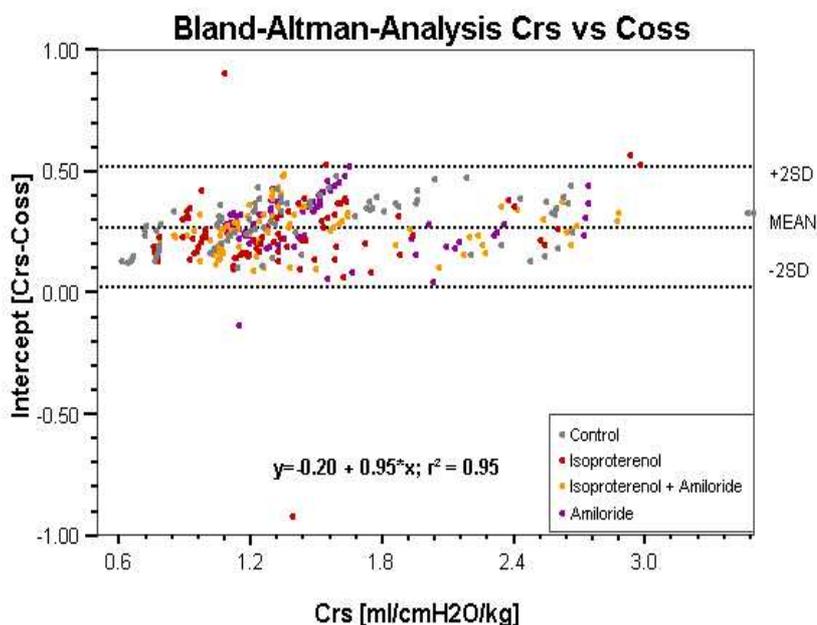


Abb. 3.2 : Bland-Altman Analyse der quasistatischen Compliance-Messung und der durch FOT Compliance. Die Gleichung zeigt den Grad der Korrelation mit zugehöriger Geradengleichung .

Im Modell der isoliert perfundierten und ventilerten Lunge überschätzt die FOT folglich die Lungencompliance verglichen mit der quasistatischen Compliance. Messungen der Lungenimpedanz mit FOT vor der Intervention zeigten im höchsten Maße reproduzierbare Ergebnisse in allen vier Behandlungsgruppen. Unabhängig von der jeweiligen Frequenz unterschieden sich in den vier Gruppen weder Lungenresistance noch -reactance. Die Belastung der Lunge durch die Instillation 3µl/g BW, mit oder ohne Amiloridzugabe in die applizierte Flüssigkeit, ergab einen sofortigen sprunghaften Anstieg in der Lungenresistance und -reactance, vor allem im niedrigen Frequenzbereich von unter 2 Hz.

Lungenresistance und -reactance unterschieden sich über alle Messzeitpunkte hinweg in keiner der vier Gruppen.

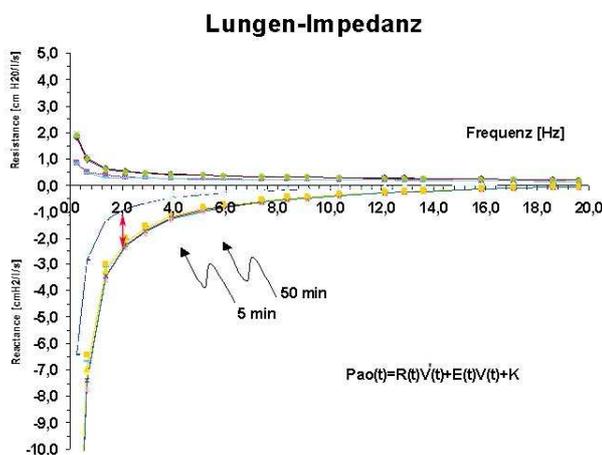
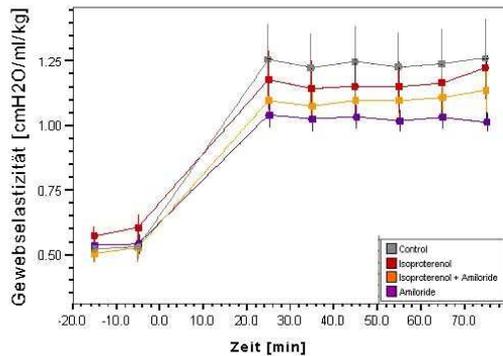


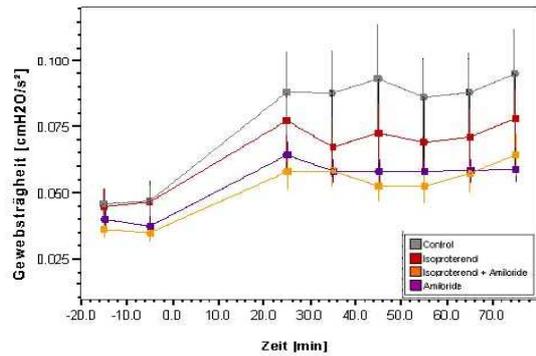
Abb. 3.3: Exemplarische Darstellung der Impedanzmessung. Der reelle Teil entspricht der Resistance, wobei der nicht reelle Teil der Reactance entspricht, aufgezeichnet jeweils über die Frequenz. Die Farben entsprechen der jeweiligen Zeit. Auffallend die Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften nach Intervention.

Die endobronchiale Instillation von 3µl/g BW resultierte in einem sofortigen Abfall der Gewebscompliance, einem Anstieg der Inertia (Gewebssträgheit), des tissue damping (Gewebsdämpfung) und der Gewebsresistance in jeder der vier

Gruppen ohne jeglichen Unterschied am Ende des Experimentes. (Abbildung 3.4 a-d).

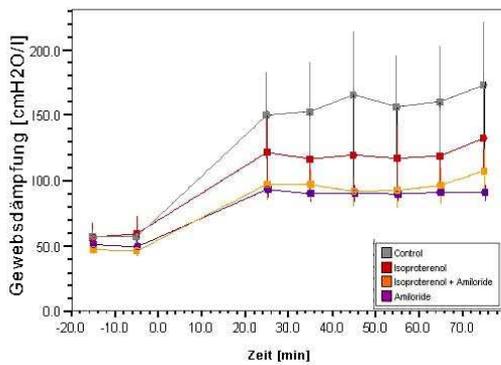


(a)

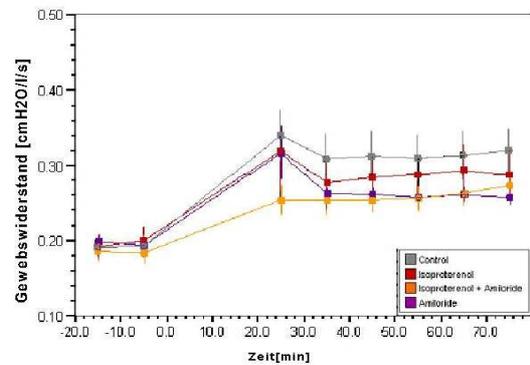


(b)

Abb. 3.4. (a) und (b) Gewebselastizität bzw. Gewebsträgheit über die Zeit.



(c)



(d)

Abb. 3.4 (c) und (d) Gewebisdämpfung bzw. Gewebswiderstand über die Zeit

3.4 Lungenwasser:

Das Gesamtlungenwasser, das am Ende des Versuchs bestimmt wurde, war, verglichen mit den anderen Gruppen, in den mit Isoproterenol perfundierten Lungen erniedrigt. (**C**: 88.6 ± 1.8 , **A**: 88.9 ± 3.4 , **I**: 86.4 ± 2.2 , **I+A**: 89.2 ± 1.7 % Flüssigkeit/Nassgewicht, Mittelwert \pm SD, $p = 0.05$ **I** vs. Andere Gruppen, Abbildung 3.5), was eine signifikante Erniedrigung des Gesamtlungenwassers aufgrund einer β -adrenergen Stimulation impliziert. Bei gleichzeitiger Amiloridgabe in die Lunge konnte der Wassergehalt nicht länger durch Isoproterenol erniedrigt werden. In dieser Versuchsreihe wurde der Gesamtwassergehalt nicht mit den Daten der Lungenmechanik verglichen, da wir keine Korrelation zwischen den beiden Messgrößen darstellen konnten.

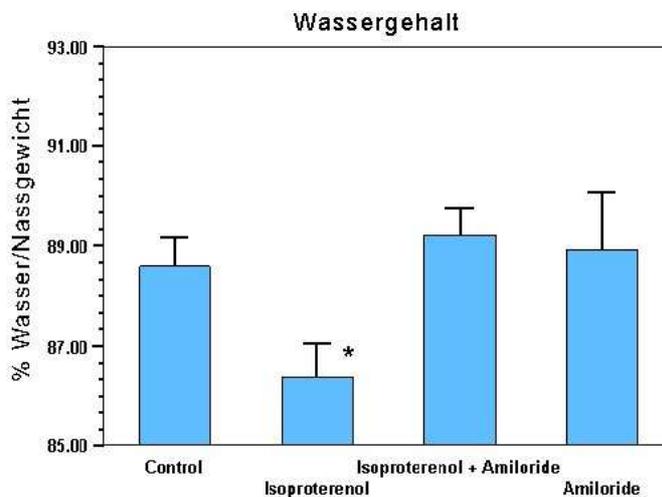


Abb. 3.5: Gesamtlungenwasser (%Wasser pro Nassgewicht), bestimmt am Ende des Versuchs (Mittelwert \pm SEM, * $p=0.05$ vs. alle anderen Gruppen)

3.5 Flüssigkeitsverschiebung:

Die Konzentrationen von Albumin, Natrium, Chlorid und Kalium im Perfusat waren vor dem Experiment in allen Behandlungsgruppen vergleichbar. Nach der Kontrollperiode ließ sich in der mit Isoproterenol behandelten Gruppe eine tendenzielle Erhöhung der Natrium- und Chloridkonzentration im gesammelten Perfusat erkennen (Na: 144.1 ± 3.3 vs. 145.6 ± 8.2 mmol/dl, n.s.; Cl: 106.4 ± 2.5 vs. 107.9 ± 6.3 mmol/dl, n.s., vor Behandlung vs. 50 min nach Behandlung). Die Albuminkonzentration des Perfusats veränderte sich innerhalb der Gruppe nicht über die Zeit, aber auch nicht im Vergleich der Gruppen untereinander.

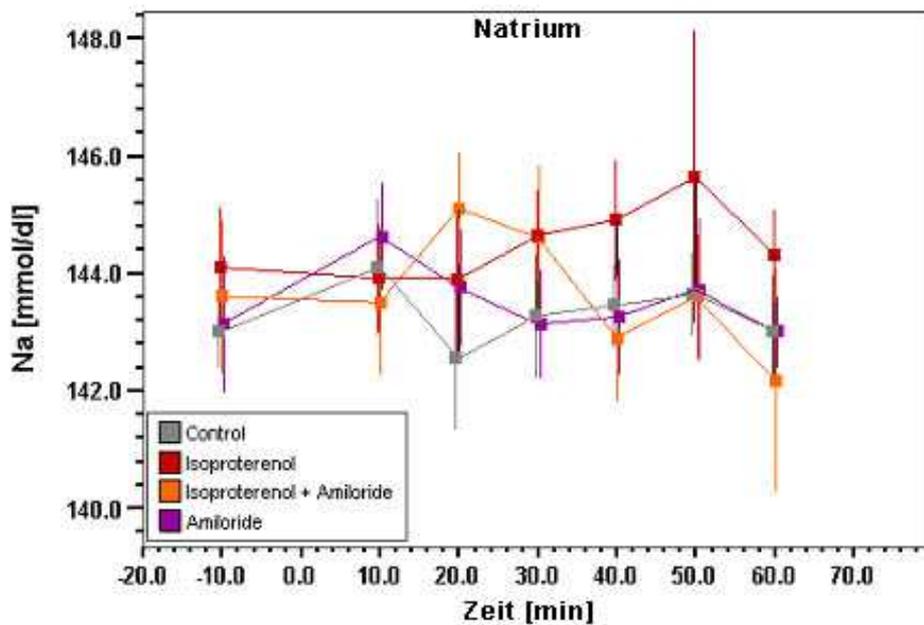


Abb 3.6a.: Konzentration von Natrium gemessen über der Zeit

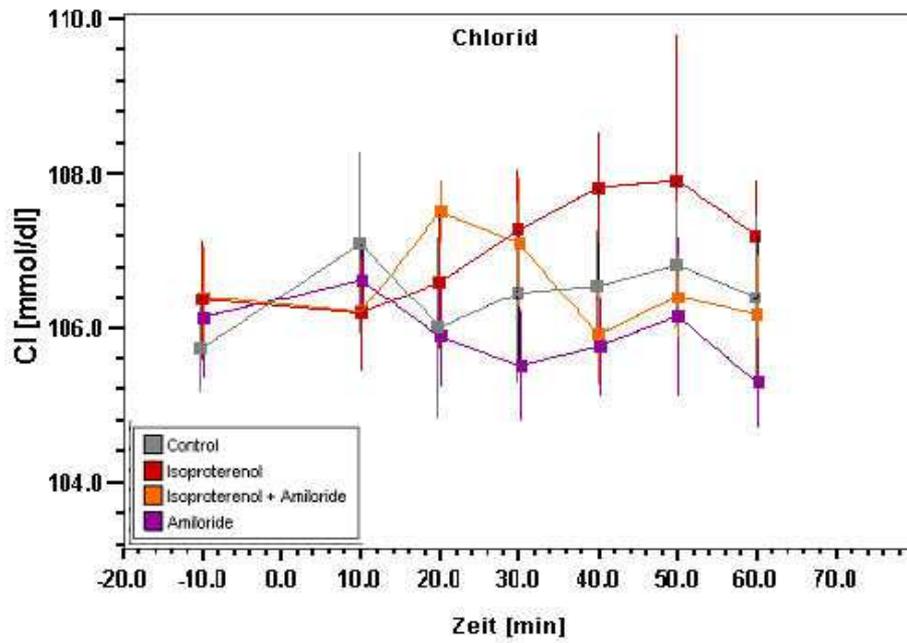


Abb. 3.6b: Konzentration von Chlorid gemessen über der Zeit

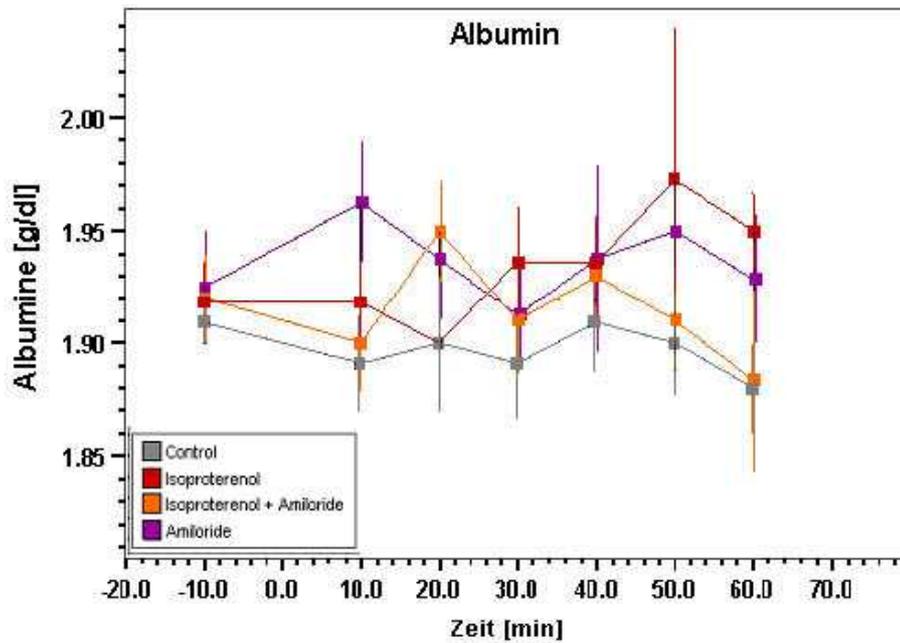


Abb. 3.6c: Konzentration von Albumin gemessen über der Zeit

3.6 NKCC Expression und Aktivität:

Die Aktivität des NKCC wurde mit Hilfe der Dotblot-Analyse bestimmt, wobei die Expression des phosphorylierten Cotransporters (p-NKCC) als Maß der Aktivität herangezogen wurde (siehe Methoden). Die Menge an p-NKCC unter Kontrollbedingungen wurde als Ausgangswert angenommen und mit den übrigen Gruppen verglichen. Dabei zeigte sich, verglichen mit den Lungen der anderen Gruppen eine relative Erhöhung der P-NKCC Expression in den Lungen, die mit der Kombination von Isoproterenol und Amilorid (**I+A**: $+34.6 \pm 110 \%$, $p < 0.02$ vs. andere Gruppen, Mittelwert \pm SD) oder mit Isoproterenol behandelt wurden (**I**: $+10.3 \pm 60.7\%$, Mittelwert \pm SD, n.s.). In den mit Amilorid behandelten Lungen wurde eine nicht signifikante Erniedrigung der P-NKCC Expression festgestellt (**A**: -17.3 ± 37.6 , Mittelwert \pm SD, $p = 0.145$ vs. **C**).

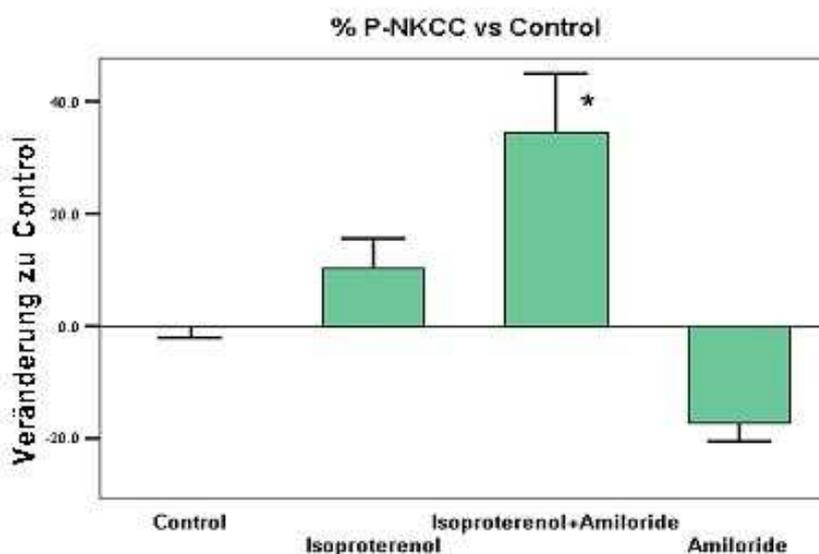


Abb. 3.7: Expression des aktivierten Na-K-2Cl Cotransporter (P-NKCC) verglichen mit der Kontrolle (Mittelwert \pm SEM, $p < 0.02$ I+A vs. die anderen Gruppen)

4. Diskussion:

Anhand der erzielten Ergebnisse wird diskutiert, inwiefern die Aktivierung bzw. Hemmung des natriumabhängigen transzellulären Flüssigkeitstransportes in der Typ II Pneumozyte Auswirkungen auf den Gesamtlungenwassergehalt und damit auf die Lungenmechanik hat.

Außerdem wird besprochen, ob eine Hemmung des natriumabhängigen Flüssigkeitstransportes, also eine Hemmung des in der apikalen Membran lokalisierten amiloridsensitiven Natriumkanals (eNaC), eine Erhöhung des sekretorischen Potentials des in der basalen Membran befindlichen Cotransporters NKCC bewirkt.

4.1 Versuchstiere:

In der vorgelegten Studie wurden circa 18 Tage alte Sprague Dawley Ratten untersucht. Dieses Alter entspricht einem juvenilen Entwicklungsstadium.

Zu diesem Zeitpunkt ist die Rattenlunge noch nicht vollständig entwickelt. Michaut et al. zeigten, dass Rattenlungen den für unsere Studie wichtigen Na^+ -Transport, eNaC und Na^+/K^+ -ATPase enthält (Michaut et al. 1996).

Zusätzlich ist es gelungen die Expression von NaK_2Cl -Cotransporter in der ATII-Pneumozyte der adulten Rattenlunge darzustellen.

Außerdem hängt die sich entwickelnde pränatale Rattenlunge ebenso wie die humane Lunge von einem durch Bumetanide hemmbaren, Cl^- -abhängigen Sekretionsmechanismus ab (McCray et al. 1992a; McCray et al. 1992b).

Somit stellen Ratten um den 18. postnatalen Tag ein ideales Tiermodell dar

(Held et al. 2000), um wie in unserem Fall den beeinträchtigten Elektrolyttransport und damit reduzierten Flüssigkeitstransport zu simulieren, der als einer der Hauptpathomechanismen bei der Entstehung eines Atemnotsyndroms angesehen wird. (Sartori et al. 2001)

4.2 Vor und Nachteile der isolierten, ventilerten und perfundierten Lunge (Uhlig et al. 1998)

Im Gegensatz zu Experimenten mit Zellkulturen oder Zellhomogenisaten, können physiologische Parameter ermittelt werden. Es ist ein besonderer Vorteil der isolierten, perfundierten Lunge, dass Studien am intakten Organ mit physiologischen Zellverbindungen und mit intrazellulärer Matrix durchgeführt werden können.

Es gibt Experimente mit Lungenzellen oder Homogenisaten, welche die Ergebnisse von Versuchen in vivo oder am isolierten, perfundierten Lungenmodell nicht vorhersagen können.

Zum Beispiel weiß man, dass der Plättchen aktivierende Faktor (PAF) ein potenter Aktivator der glatten Atemwegsmuskulatur sowohl in vivo als auch an der isolierten perfundierten Lunge ist (Desquand et al. 1986; Uhlig et al. 1994b), aber keinen kontraktile Einfluß auf die isolierte Trachea mehr hat. (Vargaftig et al. 1980)

Ein weiteres Beispiel ist die endotoxin-induzierte Freisetzung von Thromboxane, die in vivo (Feuerstein et al. 1981) und in der isolierten und perfundierten Lunge (Uhlig et al. 1996), aber weder an Lungenschnitten noch an isolierten Lungenzellen gezeigt werden konnten. Während in vivo Experimente gute

Hinweise dafür liefern, daß eine bestimmte Substanz die Lunge beeinflußt, so können nur Versuche mit dieser Substanz am Perfusionsmodell die tatsächliche und isolierte Auswirkung auf die Lunge zeigen. Die Konzentration der zugeführten Substanz kann kontrolliert werden und zahlreiche Perfusatproben können entnommen werden.

Im Gegensatz zu Modellen am kompletten Versuchstier können hierbei, wie in dieser Arbeit deutlich wird, zahlreiche physiologische Parameter wie z.B. Lungenmechanik, Perfusionsdruck und Lungenödementwicklung zur selben Zeit beobachtet werden.

Der grundsätzlich limitierende Faktor des hier angewandten Modells ist der kurze Beobachtungszeitraum. Einige Veränderungen, die v.a. die Lungenmechanik betreffen, dürften sich erst im Verlauf detektieren (Uhlig & Wollin 1994a). Die isolierte und perfundierte Lunge ist weder innerviert noch wird durch das Lymphsystem drainiert. Die Auswirkungen, die sich hieraus ergeben sind weitestgehend unbekannt.

Für das hier gewählte Versuchsssetup und die mit dieser Arbeit verbundenen Fragestellung ist das Modell ausreichend lange stabil. Uhlig et al. zeigten im physiologischen Rahmen stabile Parameter wie z.B. Tidalvolumen, lungenmechanische Eigenschaften, Perfusatcharakteristika und prä- und postkapillaren Druck. Die Lungen zeigten sich biochemisch aktiv und reagierten auf diverse Stimuli. (Uhlig & Wollin 1994a).

4.3 Perfusionsdruck:

Wie gezeigt stieg der pulmonalarterielle Blutdruck in allen vier Gruppen stetig an. Thorsten Uhlig und Peter Sly berichteten, dass der pulmonalarterielle Druck im Rahmen pulmonaler Gefäßkongestion auf dem Boden einer linksatrialen Druckerhöhung überproportional ansteigt (Held & Uhlig 2000; Uhlig et al. 2000). Der pulmonalvenöse Druck veränderte sich in unseren Versuchen nicht und bleibt auch nach der endotrachealen Instillation in allen vier Gruppen unverändert.

Der pulmonalvenöse Druck, also eine pulmonalarterielle Druckerhöhung im Sinne eines Rückwärtsversagens kann also nicht Grund hierfür sein.

Da es sich hierbei um ein isoliertes Lungenmodell handelt, also keine steuernden Einflüsse etwa durch die Nebennieren auftreten können, ist anzunehmen, dass eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes im pulmonalarteriellen Bereich diesen Effekt induziert, wobei offen bleibt, welcher Genese diese Veränderung ist.

Einige Arbeitsgruppen, darunter die des Japaners Shirai (Shirai 1999), arbeiteten die vasokonstriktive Wirkung der akuten bzw. chronischen Hypoxie heraus.

Allerdings wurden die Versuchstiere in unserer Studie kontinuierlich mit reinem Sauerstoff beatmet, was eine durch chronischen Sauerstoffmangel hervorgerufene Vasokonstriktion unwahrscheinlich macht.

Angenommen es handelt sich um eine akute Hypoxie zu den Zeitpunkten, zu denen tracheotomiert bzw. der Lungenkreislauf etabliert wird, so dürfte es nicht zu dem beobachteten kontinuierlichen Druckanstieg kommen.

Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls den Effekt der Hypoxie auf das Gefäßbett, betonte aber dass der Gefäßwiderstand deutlich empfindlicher auf eine ventilatorische als eine perfusionsbedingte Hypoxie reagiert.

Die ventilatorische Hypoxie kann bei unserem Versuchssetup mit einer Beatmung mit 100% Sauerstoff und einer sehr raschen Tracheotomie und Intubation ausgeschlossen werden. (Onodera 1992).

Wenn überhaupt kann es sich nur um eine sehr kurze Hypoxiezeit handeln, die eher nicht Ursache für den überproportionalen und kontinuierlichen Druckanstieg sein kann.

Neben der Verringerung des Gefäßdurchmessers ist der mechanische Verschluss pulmonaler Gefäße denkbar.

Luftembolien können ursächlich für eine mechanische Obstruktion der Pulmonalgefäße sein.

Große, makroskopisch erkennbare Luftembolien führten zum sofortigen Versuchabbruch. Da sie durch einen raschen pulmonalarteriellen Druckanstieg gekennzeichnet waren. Ob durch die pulsatile Förderung des Perfusats durch die Rollerpumpe Mikro-Luftembolien entstehen, ist letztendlich nicht abschließend zu beurteilen, wurde aber bislang bei diesem sehr etablierten Versuchssetup noch nie beschrieben.

Aus der Lungentransplantationsforschung weiß man, dass nach Okklusion und Reperfusion der Lungenstrombahn der Gefäßdurchmesser deutlich absinkt und es zu einem Anstieg des Gefäßwiderstandes kommt.

Eventuell ist unser Vorgehen, d.h. das Einführen der Kanüle in die Pulmonalarterie bis zur endgültigen Perfusion der Lunge mit der Okklusion bei Transplantationen vergleichbar.

Miller zeigte 1999 allerdings in einer Hasenlunge eine Abnahme des Gefäßdurchmessers bis zu 57% während der ersten halben Stunde nach Reperfusion. Danach stieg der Durchmesser während der nächsten 30 Minuten wieder an und erreichte schließlich normale Werte. Bedenkt man, dass der Radius in der vierten Potenz in den Strömungswiderstand einer Röhre eingeht (Hagen-Poiseuillesches Gesetz), kann man eine erhebliche Steigerung des pulmonalarteriellen Druckes erwarten.

Diese Steigerung des pulmonalarteriellen Drucks kann außerdem nicht durch Beatmung mit hochkonzentriertem Sauerstoff verhindert werden (Miller et al. 1999).

Zusätzlich könnte es durch das Einlegen der pulmonalarteriellen Kanüle und der Ligatur oberhalb des rechten Vorhofs zu einem Ausfall des atrionatriuretischen Peptides (ANP) kommen. Es wurde gezeigt, dass ANP eine Vasodilatierende Wirkung auf die Gefäße der Lunge hat (Stewart et al. 1991). Fällt diese regulierende Komponente aus, und treten gleichzeitig eine oder mehrere der oben beschriebenen Problematiken auf, so wäre der Druckanstieg durchaus erklärbar.

Sehr interessant ist auch die Frage nach dem Einfluß ödematöser Veränderung auf den pulmonalarteriellen Druck. Hillyard lähmte mittels Papaverin Hydrochlorid

die Lungengefäße und hielt somit den Gefäßdurchmesser konstant und verhinderte damit muskuläre Einflüsse.

Er induzierte ein interstitielles Ödem durch hydrostatische Druckerhöhung des pulmonalvenösen Abflusses. Es zeigte sich bei mildem und mittlerem Lungenödem kein Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes. Dieser stieg erst bei schwerem Lungenödem an. Der ödeminduzierte Hypertonus kann also nur schwer den kontinuierlichen Druckanstieg erklären (Hillyard et al. 1991).

Isoproterenol als β 2-Mimetikum hat primär eine dilatierende Wirkung auf das pulmonalarterielle Gefäßsystem bis zu einer Dosis von 200 μ g/kgKG, kann aber ab einer deutlich höheren Konzentration auch durch eine α -mimetische Wirkung vasokonstriktiv wirken. (Takashio et al. 1989).

Der oben erwähnte Wert dürfte bei der von uns gewählten Konzentration nicht erreicht werden und auch eine Akkumulation des Medikaments scheint bei dem hier gewählten offenen Perfusionssystem eher unwahrscheinlich.

Da der pulmonalarterielle Blutdruck von Beginn der Messungen, das heißt ohne jegliche medikamentöse Beeinflussung, ansteigt, handelt sich hierbei auch deshalb eher nicht um eine α -mimetische Wirkung des Isoproterenols,.

Unterbrochen wird dieser Prozess nur kurzfristig in den Gruppen, die Isoproterenol alleine oder in Kombination mit Amiloride erhalten haben, was wiederum für die β 2-Stimulation spricht (Parker et al. 1997).

Diese Beobachtung zeigt, dass die regulatorischen Mechanismen der pulmonalen Strombahn im untersuchten Modell zumindest initial erhalten sind.

Es handelt sich bei dem kontinuierlichen pulmonalarteriellen Druckanstieg, um ein Phänomen, das sich nicht endgültig klären lässt. Die eigentliche Ursache kann hier nur vermutet werden.

Am ehesten allerdings kommt eine reperfusionsbedingte Vasokonstriktion mit konsekutiver Druckerhöhung im pulmonalen Gefäßbett in Frage.

4.4 Lungenmechanik:

Es wurden wie bereits beschrieben zwei unterschiedliche Analyseverfahren zur Bestimmung der lungenmechanischen Messgrößen verwendet. Einerseits die Forcierte Oszillationstechnik, mit der man ein sehr differenziertes Bild der gewebs- bzw. atemwegsabhängigen Eigenschaften der Lunge ermitteln konnte und andererseits die quasistatische Compliance, mit deren Hilfe die FOT validiert werden konnte. Die FOT ist eine etablierte Methode zur Messung der Lungenfunktion am Tier und erfordert keine aktive Mitarbeit des Probanden oder des Versuchstiers. (Reinhold 1997). Die beiden unterschiedlichen Analyseverfahren korrelieren wie gezeigt eng miteinander. Die mittels FOT gemessenen Compliance bestätigt, die durch multiple lineare Regression ermittelte quasistatische Compliance. In der Bland-Altman-Analyse zeigt sich lediglich, dass die FOT die Compliance gegenüber der quasistatischen Compliance etwas überschätzt. Die Korrelation konnte in allen vier Behandlungsgruppen beobachtet werden und validiert somit die mittels FOT gemessene Lungenimpedanz.

Vor der Intervention, also vor der endotrachealen Verabreichung von Amiloride bzw. DMSO, zeigt die Impedanzmessung über alle Behandlungsgruppen hinweg ein in höchstem Maße reproduzierbares Ergebnis. Unabhängig von der jeweiligen Frequenz unterschieden sich in den vier Gruppen weder Lungenresistance noch -reactance

Die Instillation von 3ml/kg KG, also etwa 10% der funktionellen Residualkapazität (ca. 30 ml/kg), verursachte eine deutliche Erhöhung der Lungenimpedanz. Dieser Effekt war so groß (bis zu 50% versus Baseline), dass in der Folge keine Veränderungen der Impedanz durch eNaC-Blockierung oder β -Stimulation detektiert werden konnten.

Hier gilt es zwei Fragen zu diskutieren:

1. Haben weder Isoproterenol noch Amilorid einen Einfluß auf das Gesamtlungenwasser und damit auf die lungenmechanischen Eigenschaften der Lunge?
2. Überdeckt der starke Effekt der Instillation den spezifischen Effekt der medikamente Isoproterenol und Amilorid auf das Gesamtlungenwasser und damit auf die Lungenmechanik?

Das Katecholamin Isoproterenol hat nachgewiesener Maßen einen β -adrenerge Effekt, wirkt sich also steigernd auf den transzellulären Na⁺-Transport und den konsekutiven Flüssigkeitstransport durch Stimulation der Na⁺-K⁺-ATPase und eNaC aus (Maron et al. 2006).

Maron et al. zeigten zwar, dass es bei längerfristiger Applikation, d.h. mehr als 24 h, von Isoproterenol zu einer Desensibilisierung der β -Rezeptoren und zu

einem verringerten Flüssigkeitstransport kommt, der im weiteren
Versuchsverlauf bis 96 h nach Infusionsbeginn auf den Ausgangswert
zurückgeht oder sich durch die Gabe von Proteinkinase A (PKA) verhindern läßt.
(Maron et al. 2005).

Isoproterenol sollte in unserem Versuchssetting über ca. 70 min noch voll
wirksam sein. Desweiteren muß man davon ausgehen, dass der erhöhte Na-
Transport mit einer Verbesserung der Lungencompliance korreliert
(Helve et al. 2005).

In einer Versuchsreihe mit einige wenige Tage alten Kaninchen zeigte Song,
dass die Applikation von Amiloride in einem Volumen von 2.5 ml/kg KG die
Lungencompliance nicht beeinflusste, wohingegen der Lungenwassergehalt
verglichen mit der Kontrollgruppe erhöht war.

Diese Ergebnisse sind insofern überraschend, da Flemmer et al. (Flemmer et al.
2000) in einer Studie an neugeborenen Ferkeln zeigen konnten, dass es eine
enge Korrelation zwischen dem Gesamtlungenwassergehalt und den
lungenmechanischen Eigenschaften gibt.

Wie oben erklärt, kann man davon ausgehen, daß beide Medikamente in ihrer
Wirkung unbeeinflusst waren. Daher ist es notwendig, die Methodik der
endotrachealen Instillation genau zu hinterfragen:

Durch Diskonnektion allein verändern sich verschiedene Parameter.
Ausschlaggebend ist sicher ein, wenn auch nur kurzfristiger, aber totaler PEEP-
Verlust.

Dies führt zu einer Reduktion der funktionellen Residualkapazität und einer Verschlechterung der Lungencompliance (da Silva et al. 1994; Dimitriou et al. 1999). Zusätzlich verringerten wir die funktionelle Residualkapazität nochmals um etwa 10 % was einen weiteren negativen Effekt auf die lungenmechanischen Eigenschaften hatte.

Ebenfalls wird durch die Instillation zumindest ein gewisser Anteil des Surfactants ausgewaschen. Welche Auswirkung Surfactantmangel auf die Lungenmechanik hat, ist hinlänglich bekannt und wurde in vielen Arbeiten bereits untersucht (Wierich 1980)

Die deutliche Verschlechterung der Lungenmechanik unmittelbar nach Intervention ist auf die Intervention selbst zurückzuführen und überdeckt damit die durch die eigentliche Aktivierung bzw. Inhibierung der Elektrolytkanäle und Cotransporter induzierte Änderung der Lungenmechanik.

4.5 Lungenwassergehalt:

In unserer Studie konnten wir Effekte der endotrachealen, respektive intravenösen Applikation der Medikamente Amilorid bzw. Isoproterenol beobachten. In der Gruppe, die ausschließlich mit Isoproterenol behandelt wurde, zeigt sich eine Erniedrigung des Gesamtlungenwassers. Dies deutet auf einen erhöhten Flüssigkeitstransport über das Lungenepithel hinweg. Dieser erhöhte Transport lässt sich auf die β -adrenerge Stimulation basolateraler Na-K-ATPasen durch das Katecholamin zurückführen (Azzam et al. 2001). In der Gruppe (A), die außer Amilorid endotracheal intravenös nur das Vehicle DMSO

erhielt und auch in der Gruppe(A+I), die Amilorid und Isoproterenol erhielten zeigte sich keine signifikante Veränderung des Gesamtlungenwassergehaltes. Wir bestätigen also mit unseren Ergebnissen die in zahlreichen Studien gezeigten Wirkungen der Beeinflussung von eNaC bzw. der Na⁺/K⁺-ATPase (Azzam et al. 2002; Chen et al. 2002). Dies lässt den Schluss zu, dass der eNaC-Blocker Amilorid den β -adrenergen Effekt von Isoproterenol aufhebt, allein aber keinen messbaren Einfluss auf die Flüssigkeitsverschiebung hat.

Dies deutet weiter daraufhin, dass nur ein Teil der Na-Kanäle durch Amilorid hemmbar ist, was wiederum zur Folge hätte, dass eine Restkapazität noch aktiver, nicht gehemmter Natriumkanäle den Effekt des Amilorides auf das Gesamtlungenwasser kaschiert.

Die Potenz der nicht amiloridsensitiven Natriumkanäle scheint demnach durchaus bedeutsam (Matthay et al. 2002)

Dies kann aber auch daran liegen, dass eNaC zwar in vitro mit geringen Mengen von Amilorid hemmbar ist, in vivo allerdings eine deutlich höhere Menge an Amilorid verwendet werden müsste, um die Flüssigkeitsclearance zu unterbinden (Matthay et al. 2002).

Der in der basolateralen Membran befindliche NK2Cl-Cotransporter hat intrauterin und extrauterin eine sekretorische Aufgabe. Dennoch reflektiert sich der theoretische Ansatz, dass bei einer verminderten Flüssigkeitsclearance durch die Natriumtransporthemmung mittels Amilorid vermehrt Flüssigkeit in die Lunge durch NK2Cl sezerniert wird, nicht im Lungenwassergehalt. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Dotblutuntersuchung, die durchaus eine

solche Tendenz vermuten lassen. Wahrscheinlich ist die Menge des durch NK2Cl sezernierten Wassers zu gering, um sie neben der endotracheal instillierten Flüssigkeit durch Gewichtsänderung darstellen zu können. Es wird nämlich postuliert, dass die sekretorische Aktivität postpartal dazu beiträgt ein gewisses Lung-Liquid-Layer aufrecht zu erhalten. Die Gesamtmenge dieses Layers beträgt in einer gesunden Lunge - die Werte beziehen sich auf Hundelungen, lediglich etwa 1ml/kgKG (Walters 2002).

4.6 Flüssigkeitsverschiebung:

Dennoch war es uns nicht möglich im Rahmen der Flüssigkeitsverschiebung hinsichtlich Veränderungen der Albuminkonzentration in den entnommenen Perfusatproben nachzuweisen.

Wahrscheinlich ist die Flüssigkeitsverschiebung über die Zeit zu gering, um die Albumin oder NaCl-Konzentration signifikant zu verändern. Folgt Wasser dem Elektrolyttransport passiv, so sollte es in der Elektrolytkonzentration überhaupt keine Unterschiede geben (Sartori et al. 2001). In unserer Studie ließen sich dennoch Tendenzen erkennen, auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren. Sowohl die Natrium- als auch die Chloridkonzentration sind in der mit Isoproterenol (I) behandelten Gruppe tendenziell am höchsten. Berücksichtigt man bei diesen Daten die bereits erwähnten Resultate hinsichtlich des Gesamtlungenwassergehaltes, so kann man davon ausgehen, dass Isoproterenol den transepithelialen NaCl-Transport von der Alveole in das

Gefäßsystem erhöht, was einer Erhöhung der Flüssigkeitsreabsorption entspricht.

4.7 NaK2Cl Expression und Aktivität:

Der NaK2Cl Cotransporter ist ein wichtiger Mechanismus für die Sekretion von Flüssigkeit in die Lunge. (Gillie et al. 2001). Wir konnten erst kürzlich NaK2Cl über Transkription und Expression in postnatalen Rattenlungen darstellen und mit elektrophysiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass NaK2Cl Cotransporter für Elektrolyttransport verantwortlich ist, vor allem nach postnataler eNaC Inhibierung durch Amilorid (Clerici et al. 1995; Gillie et al. 2001; Shabarek et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit demonstrierten wir die Aktivierung des NKCC durch Isoproterenol bei gleichzeitiger Amiloridgabe. Wenn NKCC in Lungen mit durch Isoproterenol erhöhter eNaC Aktivität aktiviert ist, würde dies die fehlenden Isoproterenolwirkung auf den Gesamtlungenwassergehalt erklären. In anderen sekretorischen Epithelien ruft Isoproterenol eine Flüssigkeitssekretion mittels NKCC-Aktivierung hervor (Haas & Forbush 2000). Furosemid, ein etablierter NKCC-Hemmer verminderte die Flüssigkeitssekretion und verbesserte damit durch einen geringere Gesamtlungenwasser die Lungenmechanik bei Tieren mit RDS und analog zu Studien mit Patienten (Flemmer et al. 2000; Martin 2000; Reising et al. 1999). Diese Daten sind die ersten Hinweise einer NKCC-Aktivierung auf dem Boden einer eNaC- Blockade durch Amilorid auch wenn

sich dies weder in einer Veränderung des Gesamtlungenwasser noch in einer Veränderung der Lungenmechanik niederschlägt.

5. Zusammenfassung

Nach wie vor ist das Atemnotsyndrom eine der limitierenden Erkrankungen des Früh- bzw. des Neugeborenen (Stranak et al. 2002), dessen Pathomechanismus nicht ausschließlich über einen Surfactant-Mangel erklärt werden kann. Die Funktionsfähigkeit der alveolären Lungenclearance und damit verbunden die Funktionsfähigkeit der in Typ II Pneumozyten gefundenen Kanäle und Cotransporter ist der zweite entscheidende Parameter, der zur Entwicklung eines RDS führen kann (O'Brodovich 1996).

Das hier angewandte Modell der isoliert, perfundierten Rattenlunge nach Uhlig et al. (Uhlig & Wollin 1994a) eignet sich, um die Aktivität der erwähnten Kanäle und Cotransporter ohne unkontrollierbare Einflüsse z.B. der Nebenniere zu beobachten.

Die Methode der forcierten Oszillationstechnik nach Dubois (Frey et al. 1998) ist, wie wir in dieser Studie zeigen konnten, eine validierte Möglichkeit, die Einflüsse, von Inhibierung bzw. Aktivierung der alveolären Lungenclearance auf die Lungenmechanik zu messen. Die Wichtigkeit der Lungenmechanik als prädiktiver Faktor für das Outcome von RDS-Patienten (Simbruner et al. 1982) wurde bereits besonders hervorgehoben.

Allerdings muß gesagt werden, dass ein Einfluß der unterschiedlichen Behandlungsarten auf die Lungenmechanik dieser Lungen, die mit bis zu 10% ihrer FRC mit Flüssigkeit gefüllt worden waren, nicht gezeigt werden konnte.

Die hier ermittelten Ergebnisse zeigen, daß Verschiebung von Flüssigkeit durch die Typ II Pneumozyte stattfindet. Das ermittelte Gesamtlungenwasser

zeigt, daß diese Verschiebung alveolärer Flüssigkeit in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlungsart der isolierten Lunge geschah. Die β -adrenerge Wirkung von Isoproterenol bewirkt eine Verminderung des Gesamtwassergehalts der Lunge.

Dieser Effekt ist aufgehoben, wenn die apikal gelegenen eNac durch die Gabe von Amilorid geblockt werden und konsekutiv der sekretorische Cotransporter, NKCC, aktiviert ist.

Unserer Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl durch die Blockade des NKCC durch Furosemide als auch durch die Aktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase durch die Gabe von z.B. Isoproterenol die alveoläre Flüssigkeitsclearance gesteigert werden kann. Diese Erhöhung der alveolären Flüssigkeitsclearance hat bekanntlich einen eindeutig positiven Einfluß auf die Überlebenschance von Früh- und Neugeborenen und auch Erwachsenen (Ware & Matthay 2001), die am Atemnotsyndrom (RDS) erkrankt sind.

Weitere Studien müssen zeigen, ob unter anderen Versuchsbedingungen, z.B. ohne endotracheale Applikation der Einfluß von veränderter alveolärer Flüssigkeitsclearance gezeigt werden kann.

In jedem Fall trägt diese experimentelle Arbeit zum weiteren Verständnis der Pathomechanismen des RDS bei. Sie vermittelt hierbei aber auch Erkenntnisse, die über die physiologische Funktion des alveolären Flüssigkeitstransports weiter Aufschluß geben.

6. Literaturverzeichnis

Adir Y, Sznajder JI. Regulation of lung edema clearance by dopamine. *Isr Med Assoc J* 2003; 5 (1):47-50.

Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF et al. Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat* 1977; 123 (3):649-60.

Azzam ZS Adir, Crespo Y, Comellas A, Lecuona A, Dada E, Krivoy LA, Rutschman N, Sznajder DH, Ridge JI, Ridge KM Norepinephrine increases alveolar fluid reabsorption and Na,K-ATPase activity, *Am J Respir Crit Care Med* 170 (7) 730-6

Azzam ZS, Dumasius V, Saldias FJ et al. Na,K-ATPase overexpression improves alveolar fluid clearance in a rat model of elevated left atrial pressure. *Circulation* 2002; 105 (4):497-501.

Azzam ZS, Saldias FJ, Comellas A et al. Catecholamines increase lung edema clearance in rats with increased left atrial pressure. *J Appl Physiol* 2001; 90 (3):1088-94.

Barker PM, Gowen CW, Lawson EE et al. Decreased sodium ion absorption across nasal epithelium of very premature infants with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1997; 130 (3):373-7.

Bland RD. Loss of liquid from the lung lumen in labor: more than a simple "squeeze". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280 (4):L602-5.

Borok Z, Liebler JM, Lubman RL et al. Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282 (4):L599-608.

Brion LP, Soll RF. Diuretics for respiratory distress syndrome in preterm infants (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2001; 2:CD001454.

Cassin S, Perks AM. Estimation of lung liquid production in fetal sheep with blue dye dextran and radioiodinated serum albumin. *J Appl Physiol* 2002; 92 (4):1531-8.

Chen XJ, Eaton DC, Jain L. Beta-adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282 (4):L609-20.

Clerici C, Couette S, Loiseau A et al. Evidence for Na-K-Cl cotransport in alveolar epithelial cells: effect of phorbol ester and osmotic stress. *J Membr Biol* 1995; 147 (3):295-304.

da Silva WJ, Abbasi S, Pereira G et al. Role of positive end-expiratory pressure changes on functional residual capacity in surfactant treated preterm infants. *Pediatr Pulmonol* 1994; 18 (2):89-92.

De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K et al. Temporal pattern of accelerated lung growth after tracheal occlusion in the fetal rabbit. *Am J Pathol* 1998; 152 (1):179-90.

Desquand S, Touvay C, Randon J et al. Interference of BN 52021 (ginkgolide B) with the bronchopulmonary effects of PAF-acether in the guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 1986; 127 (1-2):83-95.

Dimitriou G, Greenough A, Laubscher B. Appropriate positive end expiratory pressure level in surfactant-treated preterm infants. *Eur J Pediatr* 1999; 158 (11):888-91.

Dumasius V, Sznajder JI, Azzam ZS et al. beta(2)-adrenergic receptor overexpression increases alveolar fluid clearance and responsiveness to endogenous catecholamines in rats. *Circ Res* 2001; 89 (10):907-14.

Feuerstein N, Ramwell PW. In vivo and in vitro effects of endotoxin on prostaglandin release from rat lung. *Br J Pharmacol* 1981; 73 (2):511-6.

Finley N, Norlin A, Baines DL et al. Alveolar epithelial fluid clearance is mediated by endogenous catecholamines at birth in guinea pigs. *J Clin Invest* 1998; 101 (5):972-81.

Flemmer A, Simbruner G, Muenzer S et al. Effect of lung water content, manipulated by intratracheal furosemide, surfactant, or a mixture of both, on compliance and viscoelastic tissue forces in lung-lavaged newborn piglets. *Crit Care Med* 2000; 28 (6):1911-7.

Flemmer AW, Gimenez I, Dowd BF et al. Activation of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1) detected with a phospho-specific antibody. *J Biol Chem* 2002; 26:26.

Folkesson HG, Matthay MA, Chapin CJ et al. Distal air space epithelial fluid clearance in near-term rat fetuses is fast and requires endogenous catecholamines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282 (3):L508-15.

Folkesson HG, Norlin A, Wang Y et al. Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats. *J Appl Physiol* 2000; 88 (2):416-24.

Frey U, Silverman M, Kraemer R et al. High-frequency respiratory impedance measured by forced-oscillation technique in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158 (2):363-70.

Fry DL HR. Pulmonary mechanics. A unified analysis of the relationship between pressure, volume and gasflow in the lung of normal and diseased human subjects. *Am J med* 1960; 29:672-89.

Geary C, Whitsett J. Inhaled nitric oxide for oligohydramnios-induced pulmonary hypoplasia: a report of two cases and review of the literature. *J Perinatol* 2002; 22 (1):82-5.

Gillie DJ, Pace AJ, Coakley RJ et al. Liquid and ion transport by fetal airway and lung epithelia of mice deficient in sodium-potassium-2-chloride transporter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25 (1):14-20.

Goldman M KR, Mead J, Peterson R, Schwaber JR, Wohl ME. A simplified measurement of respiratory resistance by forced oscillation. *J Appl Physiol*. 1970; 28:113-7.

Goldsmith. A simple test of maximal expiratory flow for detecting ventilatory obstruction. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 1958; 78:180 -90.

Haas M, Forbush B, 3rd. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:515-34.

Hantos Z, Adamicza A, Govaerts E et al. Mechanical impedances of lungs and chest wall in the cat. *J Appl Physiol* 1992; 73 (2):427-33.

Held HD, Uhlig S. Basal lung mechanics and airway and pulmonary vascular responsiveness in different inbred mouse strains. *J Appl Physiol* 2000; 88 (6):2192-8.

Helve O, Pitkanen O, Kirjavainen T et al. Sodium transport in airway epithelium correlates with lung compliance in healthy newborn infants. *J Pediatr* 2005; 146 (2):273-6.

Helve O, Pitkanen OM, Andersson S et al. Low expression of human epithelial sodium channel in airway epithelium of preterm infants with respiratory distress. *Pediatrics* 2004; 113 (5):1267-72.

Hillyard R, Anderson J, Raj JU. Effect of edema on segmental vascular resistance in isolated perfused rat lungs. *Lung* 1991; 169 (2):97-108.

Hummler E, Barker P, Gatzky J et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 1996; 12 (3):325-8.

Hyatt R. Relationship between maximum expiratory flow flow and degree of lung inflation. *J Appl Physiol* 1950; 13:331-6.

Irvin, C. G. Lung volume: a principle determinant of airway smooth muscle function. *Eur Respir J* 2003; 1:3-5

Jaitovich AA, Bertorello AM. [Respiratory distress. New Perspectives to lung edema treatment]. *Medicina (B Aires)* 2002; 62 (2):181-8.

Jakobovits A. [Fetal uropathies and pulmonary hypoplasia]. *Orv Hetil* 2003; 144 (19):939-43.

Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L et al. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (4):1966-71.

Kerem E, Bistrizter T, Hanukoglu A et al. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. *N Engl J Med* 1999; 341 (3):156-62.

Landser FJ NJ, Demedts M, Billiet L, Van de Woestijne KP. A new method to determine frequency characteristics of the respiratory systems. *J Appl Physiol* 1976; 41:101-6.

Landser FJ NJ, Van de Woestijne KP. Implementation by means of microprocessor techniques for measurement of total respiratory impedance during spontaneous breathing. *Prog Resp Res* 1979; 11:135-41.

Löffler G., Petrides P.E. *Biochemie und Pathobiochemie* 5. Auflage Berlin New York 1997

Maron MB, Folkesson HG, Stader SM et al. Impaired alveolar liquid clearance after 48 h isoproterenol infusion spontaneously recovers by 96 h of continuous infusion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006.

Maron MB, Folkesson HG, Stader SM et al. PKA delivery to the distal lung air spaces increases alveolar liquid clearance after isoproterenol-induced alveolar epithelial PKA desensitization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289 (2):L349-54.

Martin GS. Fluid balance and colloid osmotic pressure in acute respiratory failure: emerging clinical evidence. *Crit Care* 2000; 4 (Suppl 2):S21-5.

Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 2002; 82 (3):569-600.

Matthay MA, Fukuda N, Frank J et al. Alveolar epithelial barrier. Role in lung fluid balance in clinical lung injury. *Clin Chest Med* 2000; 21 (3):477-90.

McCray PB, Jr., Bettencourt JD, Bastacky J. Developing bronchopulmonary epithelium of the human fetus secretes fluid. *Am J Physiol* 1992a; 262 (3 Pt 1):L270-9.

McCray PB, Jr., Bettencourt JD, Bastacky J. Secretion of lung fluid by the developing fetal rat alveolar epithelium in organ culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992b; 6 (6):609-16.

Michaut P, Planes C, Escoubet B et al. Rat lung alveolar type II cell line maintains sodium transport characteristics of primary culture. *J Cell Physiol* 1996; 169 (1):78-86.

Miller DL, Roberts AM. Pulmonary artery occlusion and reperfusion causes microvascular constriction in the rabbit lung. *Ann Thorac Surg* 1999; 67 (2):323-8.

Murray CB, Chu S, Zeitlin PL. Gestational and tissue-specific regulation of C1C-2 chloride channel expression. *Am J Physiol* 1996; 271 (5 Pt 1):L829-37.

Mustafa SB, DiGeronimo RJ, Petershack JA et al. Postnatal Glucocorticoids Induce α -ENaC Formation and Regulate Glucocorticoid receptors in the Preterm Rabbit Lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003.

Nielsen VG, Duvall MD, Baird MS et al. cAMP activation of chloride and fluid secretion across the rabbit alveolar epithelium. *Am J Physiol* 1998; 275 (6 Pt 1):L1127-33.

Norlin A, Finley N, Abedinpour P et al. Alveolar liquid clearance in the anesthetized ventilated guinea pig. *Am J Physiol* 1998; 274 (2 Pt 1):L235-43.

Norlin A, Folkesson HG. Alveolar fluid clearance in late-gestational guinea pigs after labor induction: mechanisms and regulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280 (4):L606-16.

O'Brodovich H, Hannam V, Seear M et al. Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. *J Appl Physiol* 1990; 68 (4):1758-62.

O'Brodovich HM. Immature epithelial Na⁺ channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome. *Proc Assoc Am Physicians* 1996; 108 (5):345-55.

Onodera S. [Pulmonary vasoconstrictor responses]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1992; 30 Suppl:15-25.

Parker JC, Ivey CL. Isoproterenol attenuates high vascular pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1997; 83 (6):1962-7.

Pfister RE, Ramsden CA, Neil HL et al. Volume and secretion rate of lung liquid in the final days of gestation and labour in the fetal sheep. *J Physiol* 2001; 535 (Pt 3):889-99.

Pitkanen O. Lung epithelial ion transport in neonatal lung disease. *Biol Neonate* 2001; 80 Suppl 1:14-7.

Pitkanen OM, O'Brodovich HM. Significance of ion transport during lung development and in respiratory disease of the newborn. *Ann Med* 1998; 30 (2):134-42.

Pitkanen OM, Smith D, O'Brodovich H et al. Expression of alpha-, beta-, and gamma-hENaC mRNA in the human nasal, bronchial, and distal lung epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163 (1):273-6.

Rafii B, Gillie DJ, Sulowski C et al. Pulmonary oedema fluid induces non-alpha-ENaC-dependent Na(+) transport and fluid absorption in the distal lung. *J Physiol* 2002; 544 (Pt 2):537-48.

Reinhold P. [Respiratory mechanics in animals. 2. The forced oscillation technique-- review]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1997; 110 (7-8):257-66.

Reising CA, Chendrasekhar A, Wall PL et al. Continuous dose furosemide as a therapeutic approach to acute respiratory distress syndrome (ARDS). *J Surg Res* 1999; 82 (1):56-60.

Ridge KM, Rutschman DH, Factor P et al. Differential expression of Na-K-ATPase isoforms in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1997; 273 (1 Pt 1):L246-55.

Roth-Kleiner M, Wagner BP, Bachmann D et al. Respiratory distress syndrome in near-term babies after caesarean section. *Swiss Med Wkly* 2003; 133 (19-20):283-8.

Saldias FJ, Lecuona E, Comellas AP et al. beta-adrenergic stimulation restores rat lung ability to clear edema in ventilator-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 (1):282-7.

Sartori C, Allemann Y, Duplain H et al. Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema. *N Engl J Med* 2002; 346 (21):1631-6.

Sartori C, Matthay MA, Scherrer U. Transepithelial sodium and water transport in the lung. Major player and novel therapeutic target in pulmonary edema. *Adv Exp Med Biol* 2001; 502:315-38.

Shabarek F, Xu F, Oelberg DG. Sodium chloride cotransport at the basolateral membrane of type II pneumocytes. *Biochem Med Metab Biol* 1994; 52 (1):76-83.

Shirai M. [Vasomotor control of the pulmonary circulation]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999; 113 (4):235-48.

Simbruner G, Coradello H, Lubec G et al. Respiratory compliance of newborns after birth and its prognostic value for the course and outcome of respiratory disease. *Respiration* 1982; 43 (6):414-23.

Skou JC. The fourth Datta lecture. The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁽⁺⁾-pump. *FEBS Lett* 1990; 268 (2):314-24.

Skou JC. Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep* 1998; 18 (4):155-69.

Smith DE, Otulakowski G, Yeger H et al. Epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC) expression in the developing normal and abnormal human perinatal lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (4 Pt 1):1322-31.

Song Y, Fukuda N, Bai C et al. 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.

Stewart AG, Thompson JS, Rogers TK et al. Atrial natriuretic peptide-induced relaxation of pre-constricted isolated rat perfused lungs: a comparison in control and hypoxia-adapted animals. *Clin Sci (Lond)* 1991; 81 (2):201-8.

Stocks J SP, Tepper RS, Wayne JM. *Infant respiratory function testing*; 1996.

Stranak Z, Velebil P, Stembera Z. [Changes in causes of mortality in very low birth weight neonates]. *Ceska Gynekol* 2002; 67 Suppl 1:46-9.

Takashio T, Yamashita H, Onodera S. Effects of beta-agonist and antagonist on the pulmonary circulation and the pulmonary pressor response to 5-HT. *Eur J Pharmacol* 1989; 169 (1):179-82.

Tchepichev S, Ueda J, Canessa C et al. Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids. *Am J Physiol* 1995; 269 (3 Pt 1):C805-12.

Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 2002; 25 (2):173-94.

Uhlig S, Nusing R, von Bethmann A et al. Cyclooxygenase-2-dependent bronchoconstriction in perfused rat lungs exposed to endotoxin. *Mol Med* 1996; 2 (3):373-83.

Uhlig S, Wollin L. An improved setup for the isolated perfused rat lung. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1994a; 31 (2):85-94.

Uhlig S, Wollin L, Wendel A. Contributions of thromboxane and leukotrienes to PAF-induced impairment of lung function in the rat. *J Appl Physiol* 1994b; 77 (1):262-9.

Uhlig S, *Methods in pulmonary research*, AE Taylor, Basel, Boston, Berlin Birkhäuser 1998

Uhlig T, Wildhaber JH, Carroll N et al. Pulmonary vascular congestion selectively potentiates airway responsiveness in piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 (4 Pt 1):1306-13.

Umenishi F, Carter EP, Yang B et al. Sharp increase in rat lung water channel expression in the perinatal period. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15 (5):673-9.

Uystepuyst C, Coghe J, Dorts T et al. Optimal timing of elective caesarean section in Belgian White and Blue breed of cattle: the calf's point of view. *Vet J* 2002; 163 (3):267-82.

van den Berg A, van Elburg RM, van Geijn HP et al. Neonatal respiratory morbidity following elective caesarean section in term infants. A 5-year retrospective study and a review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 98 (1):9-13.

Vargaftig BB, Chignard M, Lefort J et al. Platelet-tissue interaction: role of platelet-activating factor (PAF-acether). *Agents Actions* 1980; 10 (6):502-6.

Verma RP. Respiratory distress syndrome of the newborn infant. *Obstet Gynecol Surv* 1995; 50 (7):542-55.

Walters DV. Lung lining liquid - the hidden depths. The 5th Nils W. Svenningsen memorial lecture. *Biol Neonate* 2002; 81 Suppl 1:2-5.

Wang D, Li MH, Hsu K et al. Air embolism-induced lung injury in isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 1992; 72 (4):1235-42.

Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163 (6):1376-83.

Wierich W. [Ventilation mechanics of isolated human lungs with surfactant deficiency (author's transl)]. *Prax Klin Pneumol* 1980; 34 (6):348-55.

Yasui M, Serlachius E, Lofgren M et al. Perinatal changes in expression of aquaporin-4 and other water and ion transporters in rat lung. *J Physiol* 1997; 505 (Pt 1):3-11.

Yoshimura S. [Experimental study on cause of pulmonary hypoplasia in the rabbit fetus]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1993; 45 (1):1-8.

7. Lebenslauf

Mathias Heiner Klemme

geboren 10.08.1973 in Böblingen, Baden-Württemberg

wohnhaft 81379 München, Kleinstr 3D

Familienstand verheiratet

Ehefrau Tina Klemme, geb. Kavšek

Eltern Karlklaus Klemme
Gabriele Klemme, geb. Wannemacher

Ausbildung:

- 1980-1984 Grundschule Sindelfingen-Darmsheim.
- 1984-1993 Stiftsgymnasium Sindelfingen, Baden-Württemberg.
- 1993-1994 Zivildienst, Deutsches Rotes Kreuz Kreisverband Böblingen.
- 1994-1995 Studium der Umwelttechnik an der TH-Stuttgart
- 1995-1997 Ausbildung zum Rettungsassistenten, Promedic
Rettungsdienst GmbH Karlsruhe.
- 1997-1998 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karl-Universität
Tübingen.
- 1998-2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-
Universität München.
- 2002 Teilnahme am New Investigator Award im Mount-Desert-
Island-Biological-Laboratoy, Maine, USA unter der Leitung
von Dr. med. Andreas W. Flemmer.
- 2000-2008 Dissertation. Dr. v. Haunersches Kinderspital (Abt. für
Neonatologie).
- 2004-2006 Beginn der Facharztausbildung auf der neonatologischen
Intensivstation, Klinikum Großhadern, Ludwigs-
Maximiliansuniversität München.
- Seit Nov. 2006 Fortführung der Facharztausbildung am Dr. von
Haunerschen Kinderspitals der Ludwigs-
Maximiliansuniversität München

8. Danksagung:

Herrn Professor Dr.med. A. Schulze danke ich für die Überlassung des Themas.

Besonderen Dank schulde ich Dr.med. Andreas W. Flemmer für die außerordentlich gute, intensive und freundschaftliche Betreuung.

Ich bedanke mich bei Dr.med. Yufeng Huang für seine Unterstützung und Freundschaft.

Dank an meinen Vater Karlklaus Klemme für sein besonderes Bemühen um die forcierte Oszillationstechnik.

Meiner Frau Tina möchte ich danken, die mich immer wieder zu motivieren wußte.