

Akute und subchronische Wirkung von Sauerstoff auf den pulmonalen Phospholipid- und Surfactant-Stoffwechsel der Ratte

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte

Dissertation

von

Diplom-Chem. Heike Dombrowsky
geboren am 10.12.1968 in Braunschweig

2000

Referent: Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler

Koreferent: Prof. Dr. Walter Müller

Tag der Promotion: 20.04.2000

Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt, denen ich an dieser Stelle meinen Dank ausdrücken möchte.

Zuallererst möchte ich denjenigen danken, ohne deren Unterstützung ich diese Arbeit vielleicht nie begonnen oder nicht fertiggestellt hätte. Meinen Eltern Rainer und Barbara Dombrowsky bin ich dankbar dafür, daß sie mich während meiner Ausbildung mit allen Kräften unterstützt haben und mir immer noch das Gefühl geben, bei ihnen zuhause und jederzeit willkommen zu sein. Meinem Freund Stephen Illenseer danke ich für seine Geduld, seine Rücksicht und vor allem für seinen unnachahmlichen Humor. Meinen Freundinnen Ines Funke, Simone Hoffmann und Birgit Raake möchte ich für ihren Glauben an mich und ihre mentale Unterstützung danken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst von der Hardt für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für das wache Auge, das er stets über meine Arbeit hatte. Herrn Dr. Wolfgang Bernhard danke ich für die Betreuung der Arbeit und für alles, was ich durch ihn gelernt habe.

Herrn Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler möchte ich für die Übernahme des Referats danken und dafür, daß er sich trotz seiner straffen Terminplanung Zeit für mich nahm. Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bärbel Isenberg gilt mein Dank für die Durchführung der Gelelektrophorese der BALF-Proben. Den technischen Assistentinnen Frau Christa Acevedo und Frau Ivonne Strenger bin ich dankbar für ihre stete Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit. Allen Mitarbeitern der Surfactant-Gruppe danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. BESTANDTEILE DES SURFACTANT	2
1.2. FUNKTIONEN DES SURFACTANT	4
1.3. SURFACTANTMETABOLISMUS	5
1.4. SURFACTANT-TRANSPORT	7
1.5. DER HYPEROXISCHE LUNGENSCHADEN.....	8
1.5.1. Histologische Veränderungen durch Sauerstoff	9
1.5.2. Veränderungen in der Zusammensetzung und Funktion des Surfactant.....	10
1.1.3. Veränderungen in Synthese und Transport des Surfactant	13
1.6. DAS MODELL DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN RATTENLUNGE.....	13
1.7. AUFGABENSTELLUNG	14
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. NOMENKLATUR.....	17
2.2. VERSUCHSTIERE.....	17
2.3. CHEMIKALIEN	18
2.4. REAGENZIEN	18
2.4.1. Perfusionsmedium	23
2.5. GASE.....	24
2.6. EXPERIMENTELLER AUFBAU.....	24
2.7. <i>IN VIVO</i> -BEGASUNG	25
2.8. ISOLIERTE PERFUNDIERTE LUNGE	26
2.8.1. Ventilation der isolierten Lunge	28
2.8.2. Perfusion der isolierten Lunge.....	29
2.8.3. ³ H-Markierung während der Perfusion.....	31
2.9. PRÄPARATION DER RATTEN	32
2.9.1. Vorbereitung der isolierten ventilierten perfundierten Lunge	32
2.9.2. Lungenpräparation für funktionelle Surfactantanalytik und Zelldifferentiation.....	33
2.9.3. Lungenpräparation für die histologische Untersuchungen	34
2.9.4. Lungenpräparation für die Immunhistochemie.....	34
2.10. PRÄPARATION VON INTRAZELLULÄREM SURFACTANT.....	34
2.10.1. Präparation von Rohsurfactant	36
2.10.2. Reinigung des IZS durch Dichtegradientenzentrifugation.....	36
2.10.2.1. Verarbeitung des Surfactantpellets für die funktionelle Analytik.....	37
2.10.2.2. Verarbeitung des Surfactantpellets für die Phospholipid-Analytik.....	37
2.11. BIOCHEMISCHE ANALYTIK.....	38

2.11.1. Phospholipid-Extraktion.....	38
2.11.1.1. Extraktion nach Bligh & Dyer [Bligh et al, 1959].....	38
2.11.1.2. Extraktion nach Folch [Folch et al, 1956]	39
2.11.2. Phosphocholin-Analytik.....	39
2.11.2.1. Trennung von Phosphocholin und Cholin	40
2.11.2.2. Quantifizierung von Phosphocholin	40
2.11.3. Phospholipid-Analytik.....	40
2.11.3.1. Phosphatbestimmung nach Bartlett [Bartlett, 1959].....	40
2.11.3.2. Separierung von Phosphatidylcholin mittels Festphasenextraktion.....	42
2.11.3.3. Quantifizierung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin mittels RP-HPLC	42
2.11.4. Bestimmung der ³ H-Markierung	48
2.11.5. Proteinbestimmung nach Lowry [Lowry et al, 1951].....	49
2.12. FUNKTIONELLE SURFACTANTANALYTIK.....	50
2.12.1. Vorbereitung der Proben	51
2.12.2. Durchführung der Messung.....	52
2.13. HISTOLOGIE	53
2.13.1. Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Lungenschnitte	53
2.13.2. Bestimmung der Zellzahl in bronchoalveolärer bzw. peritonealer Lavageflüssigkeit.....	53
2.13.3. Bestimmung der Zellvitalität.....	53
2.13.4. Herstellung von Zytopspots aus bronchoalveolären bzw. Peritoneal-Lavagen	54
2.13.5. Panoptische Zellfärbung nach Pappenheim.....	54
2.13.6. Differenzierung der BALF-Zellen.....	54
2.14. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATEN	54
3. ERGEBNISSE.....	57
3.1. ISOLIERUNG VON INTRAZELLULÄR GESPEICHERTEM SURFACTANT.....	57
3.1.1. Auswahl einer Methode zur Homogenisierung des Lungengewebes	58
3.1.1.1. Phospholipidausbeute	59
3.1.1.2. Verminderung des Anteils nicht surfactanttypischer Zellbestandteile.....	60
3.1.1.3. Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin.....	61
3.1.2. Versuch der weiteren Reinigung des IZS mittels einer zweiten Dichtegradientenzentrifugation	63
3.1.2.1. Ausbeute an Surfactantphospholipid	63
3.1.2.2. Verminderung der Menge nicht surfactanttypischer Bestandteile	63
3.1.2.3. Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin.....	64
3.1.3. Funktionelle Charakterisierung des IZS	65
3.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse und Anwendung auf die Arbeit	68
3.2. QUANTIFIZIERUNG DER STOFFMENGE UND ³ H-AKTIVITÄT EINZELNER PHOSPHATIDYLCHOLIN-SPEZIES	68
3.2.1. Ausbeute bei der Isolierung von Phosphatidylcholin über Festphasenextraktion	69
3.2.2. Verhältnis von HPLC-Injektionsvolumen und Peakfläche.....	70
3.2.3. Versuch der Bestimmung der Fluoreszenzausbeute der verschiedenen Phosphatidylcholone.....	72
3.2.4. Ausbeute bei der Isolierung von ³ H-markiertem Phosphatidylcholin mittels Festphasenextraktion..	74
3.2.5. Verteilung der ³ H-Aktivität im HPLC-Eluat	75

1.3. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN ^3H -AKTIVITÄT VON PHOSPHOCHOLIN	76
1.3.1. Festphasenextraktion zur Trennung von Phosphocholin und Cholin	77
1.3.2. Enzymatischer Assay zur Quantifizierung von Phosphocholin	79
1.4. VALIDIERUNG DES MODELLS DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN RATTENLUNGE.....	80
1.4.1. Validitätskriterien	80
1.4.2. Kinetik des Einbaus von ^3H -Cholin.....	81
1.4.3. Veränderung des Volumens der BALF während der Perfusion.....	81
1.5. EINFLUß DER HYPEROXIE AUF DAS KÖRPER- UND LUNGENGEWICHT.....	83
1.6. HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DURCH HYPEROXIE	84
1.6.1. Veränderungen in der Lungenmorphologie durch 85% O_2	85
1.6.2. Einbau von BrdU als Zellproliferationsmarker.....	86
1.6.3. Immunhistochemischer Nachweis von mononukleären Phagozyten.....	93
1.6.4. Veränderung der Menge und Zusammensetzung der Zellen in der BALF	93
1.6.4.1. Zellvitalität.....	93
1.6.4.2. Zellzahl und -zusammensetzung in der BALF.....	94
1.7. VERÄNDERUNG DER SURFACTANTFUNKTION DURCH HYPEROXIE	98
1.8. STÖRUNG DER BARRIERE ZWISCHEN KAPILLARE UND ALVEOLE	100
1.8.1. Lungenfeucht- zu Lungentrockengewichtverhältnis.....	100
1.8.2. Proteingehalt und -zusammensetzung der BALF	101
1.9. ABHÄNGIGKEIT DER SURFACTANTFUNKTION VOM PL/PROTEIN –VERHÄLTNIS.....	103
1.10. VERÄNDERUNGEN DER PHOSPHOLIPIDPOOLS IN LUNGENGeweBE, IZS UND BALF	105
1.10.1. Phospholipid-Stoffmenge in Lungengewebe, IZS und BALF	106
1.10.2. Anteil von Phosphatidylcholin an Phospholipid.....	107
1.10.3. Stoffmengen und Zusammensetzung der Phosphatidylcholone in Lungengewebe, IZS und BALF	108
1.10.4. Einfluß von Plasma-Phosphatidylcholin auf die Phosphatidylcholone in BALF und Lungengewebe	112
1.10.5. Einfluß von neutrophilen Granulozyten auf die Phosphatidylcholone des Lungengewebes	115
1.11. SURFACTANT-PHOSPHOLIPIDMETABOLISMUS IN DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN RATTENLUNGE.....	116
1.11.1. Aufnahme von ^3H -Cholin in die Lunge	117
1.11.2. Spezifische Aktivität des Phosphocholinpools	118
1.11.3. Einbau von ^3H -Cholin in die Lungenphospholipidfraktionen	118
1.12. METABOLISMUS UND TRANSPORT DER INDIVIDUELLEN PHOSPHATIDYLCHOLINE.....	120
1.12.1. Synthese und Einbau in den Surfactant in der gesunden Lunge	121
1.12.1.1. Vergleich von Neusynthese und Gleichgewichtszusammensetzung.....	121
1.12.1.2. Intrazellulärer Transport der neusynthetisierten Phosphatidylcholone in den Surfactantpool	123
1.12.1.3. Sekretion von neusynthetisiertem Surfactant in die BALF.....	124
1.12.2. Metabolismus und Transport der Phosphatidylcholone nach hyperoxischem Lungenschaden	125
4. DISKUSSION	129
4.1. ENTZÜNDUNGSPARAMETER	130
4.2. OBERFLÄCHENAKTIVITÄT DES SURFACTANT	132

1.1.1. Oberflächenaktivität des Surfactant in der Akutphase der Hyperoxie.....	132
1.1.2. Oberflächenaktivität des Surfactant in der Adaptationsphase der Hyperoxie	135
1.3. POOLGRÖßEN UND ZUSAMMENSETZUNG DER PHOSPHOLIPIDE.....	136
1.3.1. Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens.....	137
1.3.2. Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens.....	137
1.3.2.1. Phospholipid-Poolgrößen	137
1.3.2.2. Zusammensetzung der Phosphatidylcholine.....	139
1.4. PHOSPHOLIPID-METABOLISMUS UND -TRANSPORT.....	140
1.4.1. Einbau von ³ H-Cholin	142
1.4.2. Neusynthese von Phosphatidylcholin.....	142
1.4.3. Transport des neusynthetisierten Phosphatidylcholins in den IZS	144
1.4.4. Sekretion des neusynthetisierten Phosphatidylcholins in die Alveole.....	145
1.5. METABOLISMUS UND TRANSPORT DER INDIVIDUELLEN PHOSPHATIDYLCHOLIN-SPEZIES	146
1.5.1. Metabolismus und Transport in der gesunden Lunge.....	147
1.5.2. Metabolismus und Transport nach hyperoxischem Lungenschaden	148
5. ZUSAMMENFASSUNG	153
5.1. AKUTPHASE DES HYPEROXISCHEN LUNGENSCHADENS	153
5.2. ADAPTATIONSPHASE DES HYPEROXISCHEN LUNGENSCHADENS	154
6. ABSTRACT.....	157
6.1. ACUTE PHASE OF HYPEROXIC LUNG INJURY	157
6.2. ADAPTIVE PHASE OF HYPEROXIC LUNG INJURY	158
7. LITERATUR.....	159
8. ANHANG.....	167
8.1. FORMELN.....	167
8.2. SYMBOLE.....	169
8.3. ABKÜRZUNGEN.....	169
9. PUBLIKATIONSLISTE	173
9.1. VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT	173
9.2. SONSTIGE VERÖFFENTLICHUNGEN	174
10. LEBENSLAUF.....	175

1. EINLEITUNG

Die Lunge ist das Organ, in welchem der Gasaustausch zwischen Organismus und Umgebung stattfindet. Sauerstoff aus der Atemluft wird vom Blut aufgenommen und im Körper metabolisch umgesetzt. Das dabei gebildete Kohlendioxid wird über die Lunge wieder ausgeschieden. In der Evolution hat sich bei den Säugetieren, Amphibien und Reptilien im Gegensatz zu Vögeln und Fischen ein Lungensystem herausgebildet, welches sackartig angelegt ist und den Gasaustausch durch die zyklische Vergrößerung und Verminderung seines Volumens bewerkstelligt. Die Trachea mündet in zwei Stammbronchien, die die Luft über ein sich immer weiter verzweigendes System aus Bronchien und Bronchiolen in die gasaustauschenden Elemente leitet. Während es sich bei den Bronchioli respiratorii noch um eine bifunktionale Übergangsstruktur handelt, die auch die Luftleitung ermöglicht, dienen die Ductus alveolares und Sacci alveolares allein dem Gasaustausch. Die Alveolen sind polygonal geformt und von einer Schicht flacher Epithelzellen (Typ-I-Pneumozyten) und kubischen Nischenzellen (Typ-II-Pneumozyten) ausgekleidet. Das im Alveolarbereich dichte Kapillarnetz ist von einem einschichtigen Endothel umgeben [Junqueira et al, 1991].

Mit diesem Aufbau ist die Lunge optimal an ihre Funktion adaptiert. Die große Alveolaroberfläche ermöglicht einen maximalen Gasaustausch. Die minimale zelluläre Barriere zwischen Gasraum und Kapillarlumen sorgt für eine kurze Diffusionsstrecke der Gase von nur etwa 2 μm [Junqueira et al, 1991]. Die hohe Dehnbarkeit der Alveolen kompensiert das im Bronchialbaum entstehende Totvolumen. Weiterhin kann über die Atemfrequenz und das Atemvolumen der Gasaustausch bedarfsgerecht reguliert werden. Der die Lunge umgebende Brustkorb schützt das sehr verletzbare Organ vor Stoßbelastungen.

Allerdings ergeben sich aus dem Aufbau der Lunge zwei wesentliche Probleme, die überwunden werden müssen. An der Grenzfläche zwischen der das Alveolarepithel bedeckenden flüssigen Subphase und der Gasphase entstehen kontraktile Kräfte (Oberflächenspannung). Die Oberflächenspannung γ einer kugelförmigen Blase muß nach dem Gesetz von LaPlace

$$\gamma = \frac{P * r}{2}$$

bei gleichem Druck P um so kleiner sein, je kleiner der Radius r der Alveole ist. Bei gleichbleibender Oberflächenspannung und sinkendem Blasenradius dagegen wird ein immer höherer Druck erforderlich, um die Blase zu stabilisieren. Da der Außendruck aber nahezu konstant ist, bestünde ohne ein effizientes System zur Reduktion dieser Oberflächenspannung die Gefahr eines Kollaps der Alveolen in der Endexpiration. Auch die in der Inspiration zu leistende Arbeit wäre sehr groß. Die große Oberfläche und die hohe Luftfeuchtigkeit in Verbindung mit der Nähe zum Blutstrom machen weiterhin ein effizientes Abwehrsystem gegen eindringende Mikroorganismen und Viren unverzichtbar.

Schon 1929 wurde von von Neergard die Existenz einer Substanz in der Lunge postuliert, die eine Verringerung der Oberflächenspannung bewirkt [von Neergard, 1929]. 1955 wurde in Lungenödemflüssigkeit eine solche oberflächenaktive Substanz entdeckt [Pattle, 1955]. Sie wurde mit dem Kunstwort Surfactant (*surface active agent*) belegt. Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactant, sein Metabolismus und Processing in der Lunge und die Abhängigkeit seiner Funktionen von den Bestandteilen waren seitdem Gegenstand intensiver Forschung. Es zeigte sich, daß Surfactant nicht nur für die Reduktion der Oberflächenspannung notwendig ist, sondern auch eine wichtige Rolle in der angeborenen Abwehr spielt. Hieraus ergeben sich zwei zentrale Bedeutungen des Surfactant für die Funktionalität der Lunge:

1. Erniedrigung der Oberflächenspannung in Alveolen und kleinen Atemwegen
2. Abwehr von Viren und Bakterien

Die Zusammensetzung und große Bereiche des Surfactantmetabolismus, -transports und der Regulation im gesunden Organismus können als aufgeklärt betrachtet werden, wohingegen Veränderungen dieser Größen unter dem Einfluß toxischer Gase noch unvollständig untersucht und verstanden sind.

1.1. Bestandteile des Surfactant

Surfactant ist eine komplexe Mischung aus Lipiden und Proteinen (siehe Abbildung 1). Etwa 80-85% der Masse bilden Phospholipide (PL), von denen das Phosphatidylcholin (PC) den Hauptanteil stellt. Enthalten sind weiterhin Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamin (PE) sowie kleine Mengen Phosphatidylinositol (PI) und Sphingomyelin (SPH). Hinzu kommen 5-10% Neutrallipide – hauptsächlich Cholesterol – und 10% Proteine. Von diesen Proteinen bilden allerdings Serumproteine den größten Anteil. Die surfactanttypischen Protei-

ne (SP) SP-A, SP-B, SP-C und SP-D sind nur zu etwa 2% der Gesamtmasse im Surfactant enthalten [Hamm et al, 1996].

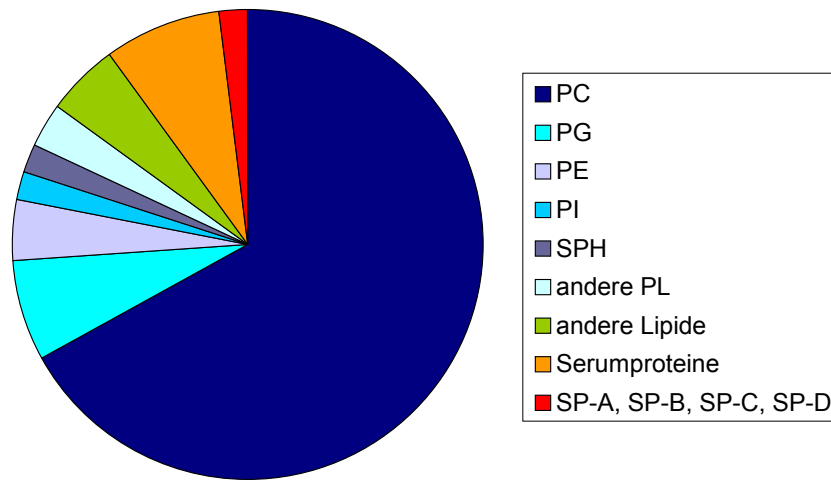


Abbildung 1: Bestandteile des pulmonalen Surfactant

Entnommen aus: Hamm et al, 1992. PC: Phosphatidylcholin, PG: Phosphatidylglycerol, PE: Phosphatidylethanolamin; PI: Phosphatidylinositol, SPH: Sphingomyelin; PL: Phospholipid; SP: Surfactantprotein.

Die verschiedenen Phospholipidklassen unterscheiden sich in der hydrophilen Kopfgruppe – z.B. Cholin oder Glycerol – voneinander. Jede Klasse setzt sich zudem aus verschiedenen molekularen Spezies zusammen, die eine unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung aufweisen. Hauptphospholipidbestandteile des Surfactant sind die disaturierten Phosphatidylcholin-Spezies Dipalmitoylphosphatidylcholin (PC16:0/16:0) und Palmitoylmyristoylphosphatidylcholin (PC16:0/14:0) sowie die einfach ungesättigten Spezies Palmitoylpalmitoleoylphosphatidylcholin (PC16:0/16:1) und Palmitoyloleoylphosphatidylcholin (PC16:0/18:1) [Bernhard et al, 1997]. Auf der Basis der Fettsäurezusammensetzung fanden sich vergleichbare Ergebnisse [Shelley et al, 1982; Baritussio et al, 1981; Shelley et al, 1984]. Die genaue Bedeutung dieser surfactanttypischen Substanzen ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Bei den Surfactantproteinen werden die hydrophilen Proteine SP-A und SP-D von den hydrophoben Proteine SP-B und SP-C unterschieden. SP-A und SP-D sind Collectine (Lectine der Gruppe III) und besitzen Kohlenhydrat-Bindungsdomänen [Haagsman, 1994]. SP-B und SP-C sind mit einem Molekulgewicht von 18000 bzw. 4000 Da kleiner als die hydrophilen Surfactantproteine und enthalten viele hydrophobe Aminosäuren. SP-C enthält darüber hinaus zwei Thioester-verknüpfte Palmitoylgruppen [van Eijk et al, 1995].

1.2. Funktionen des Surfactant

Die Funktion, die dem pulmonalen Surfactant seinen Namen gegeben hat, ist die Reduktion der Oberflächenspannung. Die Tendenz der Lunge zur Volumenkontraktion kommt unter anderem durch die Elastizität des Lungenparenchyms, im wesentlichen aber durch die Oberflächenspannung zwischen flüssiger Subphase und Gasphase in der Alveole zustande [von Neergard, 1929; Goerke, 1992]. Eine Schlüsselrolle bei der Reduktion der Oberflächenspannung kommt dem Dipalmitoylphosphatidylcholin zu. Aufgrund der beiden saturierten, geraden Fettsäureketten und der sich daraus ergebenden hohen Packungsdichte [Akino, 1992] hat dieses Molekül eine Phasenübergangstemperatur von 41,5 °C. Ein Monolayer aus Dipalmitoylphosphatidylcholin ist demnach bei Körpertemperatur flüssigkristallin. Die im Surfactant enthaltenen Phospholipide lagern sich an der Grenzschicht zwischen Gasphase und flüssiger Subphase mit den Fettsäureresten zum Gasraum hin an [Creuwels et al, 1997]. In der Expiration wird Dipalmitoylphosphatidylcholin in der Grenzschicht angereichert und stabilisiert durch die Bildung eines rigiden Films die Alveole [van Golde et al, 1994]. Zwar ist die genaue Funktion der Phospholipide mit einfach und doppelt ungesättigten Fettsäureresten nicht bekannt, es wird aber ein Einfluß auf die schnelle Adsorption und das Spreiten des Surfactant auf der Oberfläche vermutet [King, 1982]. Auch die hydrophoben Surfactantproteine sind wichtig für die Oberflächenaktivität des Surfactant. SP-B und SP-C erhöhen die Phasenübergangstemperatur von Dipalmitoylphosphatidylcholin und Dipalmitoylphosphatidylglycerol [Shiffer et al, 1993] und stabilisieren den alveolären Monolayer [Hamm et al, 1996].

Eine Besonderheit des pulmonalen Surfactant gegenüber anderen Detergenzien ist aber die Tatsache, daß die Oberflächenspannung sich dynamisch und in Abhängigkeit vom Radius der Alveole verändert [Enhorning, 1977]. Dies ist nötig, um bei gleichem (Außen-)Druck Alveolen verschiedener Größe zu stabilisieren. Ein weiteres Charakteristikum ist die schnelle Adsorption an die Oberfläche, die auch in Belastungssituationen mit erhöhter Atemfrequenz für eine ausreichende Funktion des Surfactant sorgt. Eine weitere Funktion des pulmonalen Surfactant ist die lokale Abwehr. Hier spielen vor allem die Collectine SP-A und SP-D eine Rolle. Beide aktivieren vermutlich Alveolarmakrophagen [Creuwels et al, 1997]. SP-A verbessert die Phagozytose verschiedener Mikroorganismen und Viren [Hamm et al, 1996]. SP-D agglutiniert Bakterien und schützt die Lunge vor nichtbakteriellen Mikroorganismen und Viren [Creuwels et al, 1997]. Weiterhin dient Surfactant unter anderem der Stabilisierung der kleinen Atemwege, der Verhinderung von Ödembildung und dem Abtransport von Mucus [Brown et al, 1993].

1.3. Surfactantmetabolismus

Surfactant-Phospholipide werden ausschließlich in Typ-II-Pneumozyten synthetisiert. Im Hinblick auf den Metabolismus ist unter den Surfactant-Phospholipiden Phosphatidylcholin am besten untersucht [Review: Batenburg, 1992]. Mit Synthesebausteinen – Cholin, Glucose,

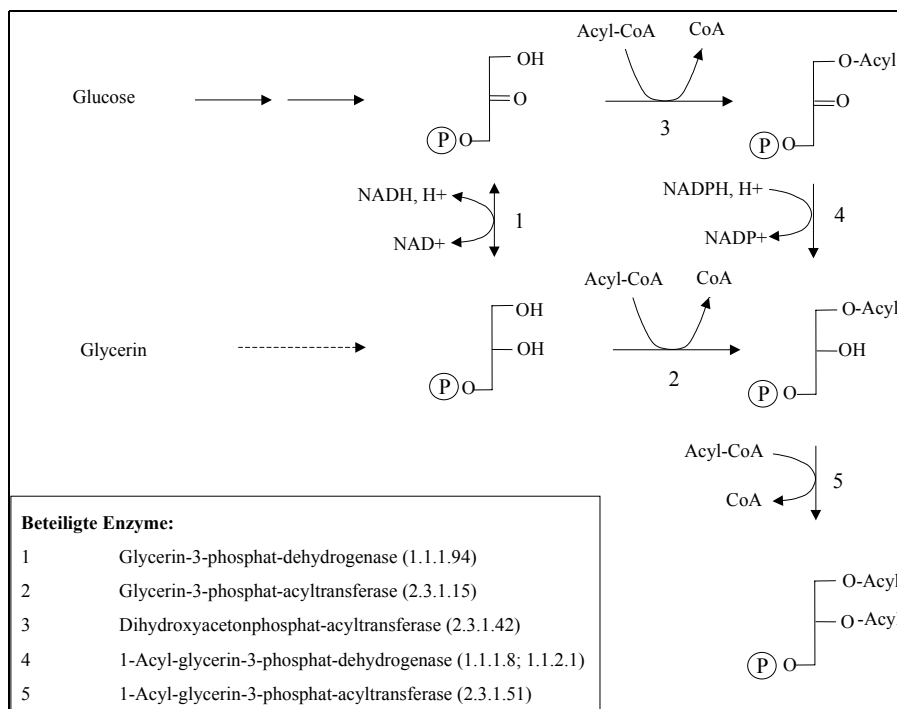


Abbildung 2: Bildung von Phosphatidsäure

Nach Batenburg, 1992

Glycerin und Fettsäuren – versorgt sich die Zelle aus dem Blut. Allerdings sind Typ-II-Pneumozyten in der Lage, Fettsäuren sowohl *de novo* aus Lactat bzw. Glucose zu synthetisieren, als auch aus der Hydrolyse von aus dem Alveolarraum aufgenommenen Phospholipiden zu gewinnen. Glycerin-3-Phosphat als Ausgangspunkt der Synthese von Phosphatidsäure (siehe Abbildung 2) entsteht aus Glucose über die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (Reaktion 1). Die Phosphorylierung von Glycerin spielt zur Gewinnung von Glycerin-3-Phosphat in der adulten Lunge nur eine untergeordnete Rolle. Durch die aufeinanderfolgende Übertragung von zwei Acylgruppen (Reaktion 2 und 5) wird aus Glycerin-3-Phosphat Phosphatidsäure gebildet. Der Anteil an dipalmitoylierter Phosphatidsäure ist offenbar von der Zusammensetzung der molekularen Spezies von Acyl-CoA abhängig. In Mikrosomen und Cytosol von Typ-II-Pneumozyten wurden fast 50% Palmitoyl-CoA gefunden [Batenburg, 1990]; der Anteil an Dipalmitoylphosphatidsäure wurde auf 26% berechnet [Batenburg, 1990]. Anstelle der an der Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat anschließenden Acylier-

rung ist auch der umgekehrte Weg über eine Reduktion von Acyldihydroxyacetonphosphat (Reaktion 3 und 4) möglich.

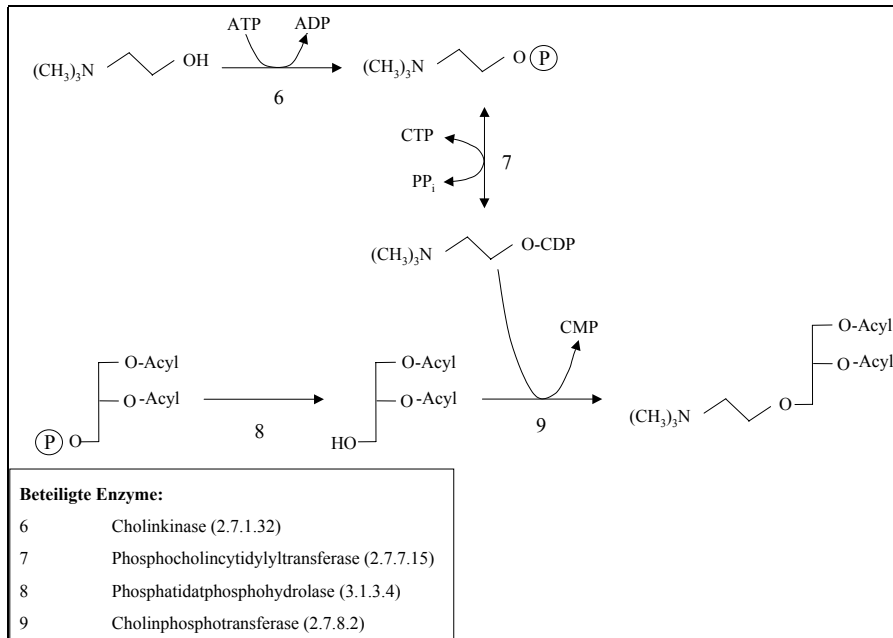


Abbildung 3: de novo-Synthese von Phosphatidylcholin

Nach Batenburg, 1992

Zur Bildung von Phosphatidylcholin wird Phosphatidsäure zu Diacylglycerin dephosphoryliert (siehe Abbildung 3, Reaktion 8). Diacylglycerin wird mit CDP-Cholin, welches aus Cholin via Phosphocholin (Reaktion 6 und 7) gebildet wurde, zu Phosphatidylcholin umgesetzt (Reaktion 9). Die Bildung von Phosphatidylcholin durch sukzessive Methylierung von Phosphatidylethanolamin spielt in der Lunge keine wesentliche Rolle [Morgan, 1971]. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß der in der Lunge vorhandene Anteil an Dipalmitoylphosphatidylcholin nicht ausschließlich aus der *de novo*-Synthese stammen kann, sondern zu ca. 50% auf dem Wege des Remodelling durch einen Austausch der ungesättigten Fettsäure in der sn-2-Position des Phosphatidylcholin-Moleküls durch Palmitinsäure hergestellt wird [Burdge et al, 1993; Caesar et al, 1991; Batenburg et al, 1990; Rüstow et al, 1985]. Hauptsyntheseprodukte und damit vermutlich Vorläufer von Dipalmitoylphosphatidylcholin sind PC 16:0/18:2 und PC16:0/18:1 [Burdge et al, 1993; Caesar et al, 1991].

1.4. Surfactant-Transport

Einen Überblick über den Transport von pulmonalem Surfactant gibt Abbildung 4. Surfactant-Phospholipide werden am endoplasmatischen Reticulum der Typ-II-Pneumozyten synthetisiert [Batenburg, 1992]. Über den Golgi-Apparat werden sie in die Lamellarkörperchen transportiert, die den Surfactant-Speicher im Lungengewebe bilden. Während der Transport der Surfactant-Phospholipide vom Golgi-Apparat in die Lamellarkörperchen möglicherweise über Phospholipid-Transportproteine vermittelt wird [Batenburg, 1992], gelangen die Surfactant-Proteine über multivesikuläre Körperchen dorthin [van Golde et al, 1994]. Surfactantlipide werden via Exocytose von Lamellarkörperchen sezerniert [Chander et al, 1990] und bilden

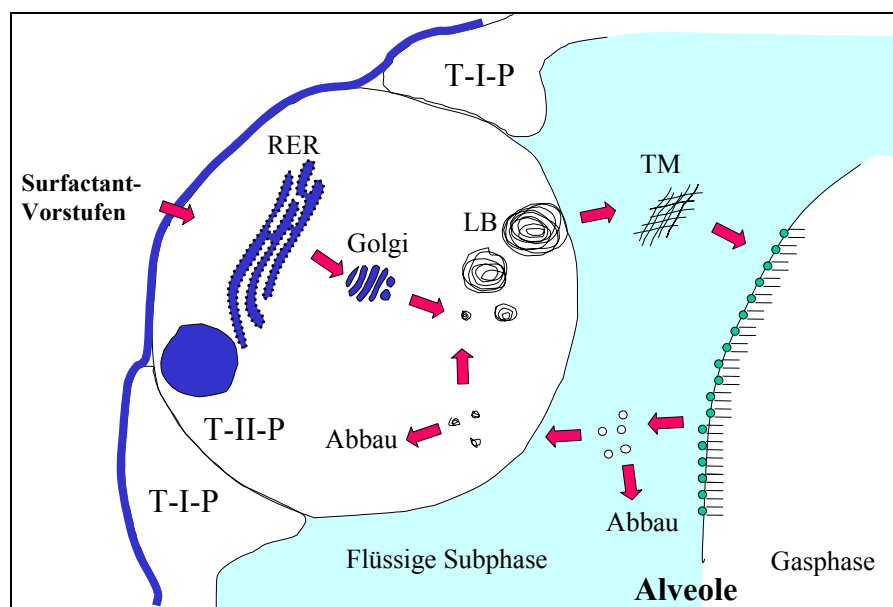


Abbildung 4: Synthese und Transport des pulmonalen Surfactant

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Alveolarepithel mit der angrenzenden flüssigen Subphase der Alveole und dem Surfactantfilm an der Grenzfläche zur Gasphase. Der Surfactant-Metabolismus und das Surfactant-Phospholipid-Transport folgen den Pfeilen. RER: rauhes endoplasmatisches Reticulum; Golgi: Golgi-Apparat; LB: Lamellarkörperchen; T-II-P: Typ-II-Pneumozyt; T-I-P: Typ-I-Pneumozyt; TM: tubuläres Myelin

in der wässrigen Subphase der Alveole zunächst eine tubuläres Myelin genannte Struktur. Die Turnoverzeit des Surfactants in der Alveole ist mit 5-10 h [Wright, 1990] relativ kurz. Bis zu 85% der alveolären Phospholipide werden wieder in die Typ-II-Zelle aufgenommen; der Rest wird über die mucociliäre Clearance abtransportiert, von Alveolarmakrophagen abgebaut oder nach dem Transport durch das Alveolarepithel dem Lymphsystem zugeführt [van Golde et al, 1994]. Das wieder in den Typ-II-Pneumozyten integrierte Material wird teils auf dem Wege des Recycling erneut in die Lamellarkörperchen aufgenommen, teils aber auch abgebaut. Die Abbauprodukte können erneut für die Synthese von Phospholipiden eingesetzt werden [van Golde et al, 1994].

1.5. Der hyperoxische Lungenschaden

Die Funktionalität der Lunge als Gasaustauschorgan ist essentiell für die Vitalität des Organismus. Allerdings gibt es einige Krankheitsbilder, bei denen diese Funktionalität beeinträchtigt ist. Das erworbene Atemnotsyndrom (acquired respiratory distress syndrome, ARDS) des Kindes und des Erwachsenen tritt bei Intensivpatienten z.B. nach schweren Verbrennungen, Multitraumata oder Sepsis auf und geht mit Surfactantdysfunktion und veränderter Surfactantzusammensetzung einher [Hartog et al, 1995]. Beim Neugeborenenatemnotsyndrom (infant respiratory distress syndrome, IRDS) wird von der noch unreifen Lunge Frühgeborener zuwenig Surfactant gebildet [Hartog et al, 1995]. Beide Krankheitsbilder haben gemein, daß es wegen des Surfactantmangels bzw. seiner Dysfunktion zur Bildung von Atelektasen in der Lunge und zu einer unzureichenden Versorgung des Organismus mit Sauerstoff kommt. Um Sauerstoffmangelschäden zu vermeiden, muß in schweren Krankheitsverläufen mit erhöhtem Sauerstoffpartialdruck beatmet werden [Hartog et al, 1995]. Es hat sich allerdings schon früh gezeigt, daß es durch diese therapeutische Maßnahme zu weiteren Lungenschäden kommen kann [Lachmann, 1992].

In der klinischen Praxis erweist es sich als schwierig, den Effekt verschiedener Parameter auf die Schädigung der Lunge zu evaluieren, da in der Regel die Grunderkrankung, Sauerstofftoxizität und mechanische Beatmung zusammenwirken. Um diesem Problem aus dem Weg zu gehen, wird in der Grundlagenforschung am Tiermodell die Auswirkung eines einzelnen Faktors, wie z.B. Hyperoxie [Gross et al, 1981; Balaan et al, 1995; Polak et al, 1992; D'Angio et al, 1997], akuter Lungenschaden durch N-Nitroso-N-methyl-urethan [Harris et al, 1989; Lewis et al, 1992] bzw. Paraquat [So et al, 1993] oder der Effekt mechanischer Beatmung [Dreyfuss et al, 1995] untersucht.

Der hyperoxische Lungenschaden wird inzwischen allgemein auf die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen zurückgeführt, weil

- die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen bei Hyperoxie erhöht ist [Freeman et al, 1982]
- der Organismus auf hyperoxischen Streß mit einer Hochregulierung des antioxidativen Systems reagiert [Crapo et al, 1974, Forman et al, 1981; Kimball et al, 1976; Crouch et al, 1988; Jenkinson et al, 1988; Ho et al, 1996]

- das Überleben in erhöhter Sauerstoffkonzentration durch Verbesserung des antioxidativen Status verlängert werden kann [Coursin et al, 1996; Mansour et al, 1988]
- andere Modelle radikalinduzierter Lungenschäden vergleichbare Schäden setzen [Crapo et al, 1978].

Der Schaden, der durch Begasung mit Sauerstoff im Organismus und insbesondere in der Lunge gesetzt wird, ist von der Dosis der Noxe abhängig. Ist die Sauerstoffkonzentration sehr hoch, entstehen in kurzer Zeit große Zellschäden. Der Organismus ist nicht in der Lage, diese Schäden schnell genug zu kompensieren, und die Schädigung schreitet immer weiter fort, bis das Lebewesen stirbt. Wird der Organismus einer geringeren Konzentration an Sauerstoff ausgesetzt, ist der Schaden an den Zellen geringer und kann soweit kompensiert werden, daß das Tier überlebt. Es setzen Reparaturmechanismen ein, die zur Adaptierung an diese Sauerstoffkonzentration führen. Die durch Hyperoxie hervorgerufenen Schäden sind aber nicht nur von der Sauerstoffkonzentration, sondern auch von der Spezies und vom Alter des Individuums abhängig. So reicht z.B. die Überlebensdauer bei 95-100% Sauerstoff von 60-67 h bei Ratten [Ghio et al, 1994; Mansour et al, 1998; Crapo et al, 1980; Rosenbaum et al, 1969] über 4,5 Tage bei Goldhamstern [Palazzo et al, 1992] bis zu 2 Wochen bei Affen [Weibel et al, 1971]. Neugeborene Ratten, Mäuse und Kaninchen überleben in > 97% O₂ mindestens doppelt so lange wie ihre adulten Artgenossen [Frank et al, 1978]. Allerdings muß prinzipiell zwischen dem letalen und dem adaptativen Schaden unterschieden werden. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 90-100% ist die am Lungenparenchym entstehende Schädigung so groß, daß die einsetzenden Reparaturmechanismen nicht mehr ausreichen, um die Funktionalität des Organs aufrechtzuerhalten. Bei Sauerstoffkonzentrationen von ca. 60-90% dagegen überlebt der Organismus in der Regel. Allerdings kommt es im Verlauf der einsetzenden Entzündungsreaktion zu einer Umstrukturierung des Lungengewebes und Veränderungen des Surfactantgleichgewichts [Crapo, 1980; Young et al, 1982; Rice et al, 1989].

1.5.1. Histologische Veränderungen durch Sauerstoff

Einen guten Überblick über die histologischen Schäden im Lungengewebe durch Hyperoxie geben die Arbeiten von Crapo [Crapo et al, 1978; Crapo et al, 1980]. Er setzte adulte Ratten letalen und adaptativen Dosen von Sauerstoff aus. Elektronenmikroskopisch fanden sich bei den mit einer letalen Dosis von 100% O₂ begasten Ratten bis zu einer Hyperoxiedauer von 40h keine Veränderungen des Lungengewebes gegenüber der Kontrolle. Erst nach 60 h und

damit wenige Stunden vor dem Tod der Tiere konnte eine Verminderung der Zahl der Kapillarendothelzellen, eine Verdickung des Interstitiums – sowohl durch Vermehrung der Zellen und Einstrom von polymorphkernigen Granulozyten als auch durch eine Schwellung des nicht zellulären Raums – und eine Verengung des Kapillarlumens festgestellt werden. Nach Ausbildung pyknotischer Kerne und einer Schwellung der perinukleären Cisternae, des rauhen endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien kam es zum Platzen der Plasmamembran und zur Nekrose der Endothelzellen. Auf lichtmikroskopischer Basis vergleichbare Veränderungen fanden sich auch nach der Begasung von adulten Ratten mit $> 98\%$ O_2 für 61 h [Ghio et al, 1994] und bei Mäusen nach 96 h bei 95% O_2 [Arkovitz et al, 1997].

Bei einer Sauerstoffkonzentration von 85% fand sich nach drei Tagen als einzige Veränderung eine Vergrößerung des Kapillarlumens. Nach sieben Tagen war das Kapillarlumen verengt und der Durchmesser von Endothel, Interstitium und Epithel hatte zugenommen. Die Anzahl der Endothelzellen war vermindert und die noch vorhandenen Zellen waren hypertroph. Im Interstitium konnte ein Einstrom von Granulozyten und Monozyten sowie eine Proliferation aller vorhandenen Zelltypen festgestellt werden. Obwohl an den Typ-I-Pneumozyten zu keinem Zeitpunkt Veränderungen festgestellt werden konnten und ihre Anzahl auch nach sieben Tagen unverändert war, hatte sich die Anzahl der Typ-II-Pneumozyten verdoppelt; dieser Zelltyp bedeckte zu diesem Zeitpunkt 12% statt vorher 3% der Alveolaroberfläche [Crapo, 1980]. Lichtmikroskopisch wurden weiterhin während 2-8tägiger Begasung adulter Ratten mit 85% O_2 perivaskuläre und peribronchioläre Ödeme gefunden [Kimball, 1976].

Sugahara teilte die pulmonale Antwort auf akute Lungenschäden in drei Phasen ein. Innerhalb von ein bis vier Tagen setzt eine frühe exsudative Phase ein, die von einer proliferativen Phase nach 3-7 Tagen und einer diffusen fibrotischen Reaktion (7-10 Tage) abgelöst wird [Sugahara et al, 1996].

1.5.2. Veränderungen in der Zusammensetzung und Funktion des Surfactant

Die Veränderung der Phospholipid- und Proteinmenge in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und der Oberflächenaktivität durch Hyperoxie sind gut untersucht. Die Ergebnisse variieren allerdings mit dem verwendeten Modell und sind deshalb uneinheitlich (siehe Tabelle 1). Bei Modellen mit einer verminderten Überlebensrate gegenüber der Kontrollgrup-

pe findet sich aber in Regel eine verminderte Oberflächenaktivität des Surfactant und eine erhöhte Proteinmenge in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit. Bei Ratten wurde eine Erhöhung der Phospholipidmenge in der Lavageflüssigkeit gefunden, bei Kaninchen stagnierte die Phospholipidmenge bzw. die Menge an disaturiertem Phosphatidylcholin oder sank ab. Bei Langzeitmodellen mit geringeren Sauerstoffkonzentrationen oder hyperoxischer Schädigung und Regeneration in Raumluft wurde dagegen einheitlich eine Erhöhung der Phospholipidmenge gefunden.

Putman teilt die Reaktion auf Begasung mit erhöhter Sauerstoffkonzentration in drei Gruppen ein:

1. Hohe, letale Sauerstoffkonzentration: Es kommt zu einer Verminderung der Phospholipidmenge in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF), alveolärer Ödembildung und einer Entzündungsreaktion.
2. Hohe, nicht letale Sauerstoffkonzentration: Die Schädigung der Lunge ist ähnlich wie in 1., aber noch reversibel. Verminderte Surfactantmenge und Beeinträchtigung seiner Funktion werden direkt postexpositionell gefunden, im Anschluß folgt Adaptation und Toleranz gegenüber O₂.
3. Mäßig erhöhte Sauerstoffkonzentration: Es kommt direkt zu einer Erhöhung der Phospholipid-Poolgröße in der BALF, die mit einer Proliferation der Typ-II-Pneumozyten und Toleranz gegenüber O₂ gekoppelt ist [Putman et al, 1997].

Modell	PL in BALF	Protein in BALF	Oberflächenaktivität	Referenz
Letale Dosis				
Maus, 96h >98% O ₂	↓	↑		Gross et al, 1981
Ratte, 64h >97% O ₂	↑	↑	$\gamma_{\min} \uparrow, \gamma_{\max} \uparrow$	Balaan et al, 1995
Hohe Dosis, verminderte Überlebensrate				
Ratte, 60h 100% O ₂	↑			Välämäki et al, 1975
Frühgeb. Kaninchen, 20h 100% O ₂			$\gamma_{\min} \uparrow, \gamma_{\text{ads}} \uparrow$	Issa et al, 1999
Kaninchen adult, 64h 100% O ₂	↓	↑	$\gamma_{\min} \uparrow$	Matalon et al, 1988, Novotny et al, 1995; Holm et al, 1988
Neugeb. Kaninchen, 3d > 95% O ₂	DSPC ↔			Polak et al, 1992
neugeb. Kaninchen, 96h 100% O ₂	↓			Ward et al, 1984
neugeb. Kaninchen, 8d >95% O ₂	↔	↑	$\gamma_{\min} \uparrow$	D'Angio et al, 1997
Adaptative Dosis				
Ratte, 3d 85% O ₂	DSPC ↑			Rice et al, 1989
Ratte, 7d >90% O ₂	DSPC ↑			Ohashi et al, 1991
Ratte, 7d 85% O ₂	DSPC ↑			Young et al, 1982
Hamster, 8d 100% O ₂	↑			Minoo et al, 1992
Kaninchen adult, 64h 100% O ₂ und 200h Raumluft	↑			Holm et al, 1988

Tabelle 1: Auswirkungen von Hyperoxie auf die Zusammensetzung und Oberflächenaktivität des alveolären Surfactant

PL: Phospholipid, BALF: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, DSPC: disaturiertes Phosphatidylcholin, γ_{\min} : minimale Oberflächenspannung, γ_{\max} : maximale Oberflächenspannung, γ_{ads} : minimale Oberflächenspannung in der Adsorption

Die Zusammensetzung der Phospholipide und der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin in der BALF veränderte sich dagegen durch die Begasung mit 95-100% O₂ kaum oder gar nicht [Ward et al, 1984; Välimäki, 1975]. Allerdings berichteten einige Gruppen von einer Verminderung des Anteils an disaturierten Phosphatidylcholinen in der BALF [Balaan et al, 1995; King et al, 1989], was im Zusammenhang mit der Funktionalität des Surfactant von Bedeutung sein könnte. Dieses Ergebnis war aber nicht immer zu finden [Holm et al., 1985; Gross et al, 1981; Polak et al, 1992; Minoos et al, 1992].

1.5.3. Veränderungen in Synthese und Transport des Surfactant

Während die Zusammensetzung und die Funktion des alveolären Surfactant unter hyperoxischer Begasung gut untersucht ist, gibt es nur wenige Untersuchungen zum Surfactantmetabolismus und Transport [Holm et al, 1988; Novotny et al, 1995; Polak et al, 1992; Gross et al, 1981; Ward et al, 1984; Young et al, 1982]. Auch hier besteht das Problem, daß die Daten aufgrund der unterschiedlichen Modelle uneinheitlich sind. Insgesamt sprechen diese Daten aber für eine Verlangsamung des Surfactant-Phospholipid-Metabolismus auf der Stufe von Synthese, Sekretion und Reuptake in der akuten Phase des hyperoxischen Lungenschadens.

Phospholipid- und Proteinmenge in der BALF im hyperoxischen Lungenschaden sind gut untersucht. Dahingegen fehlen detaillierte Daten über die Zusammensetzung der Phospholipide und den Metabolismus der molekularen Spezies der Phospholipide. Auch der intrazelluläre Surfactant als Speicherform des alveolären Surfactant ist bis jetzt kaum auf Veränderungen durch Hyperoxie untersucht worden. In vielen Untersuchungen wurde zudem disaturiertes Phosphatidylcholin nach Mason [Mason et al, 1976] bestimmt. Inzwischen ist aber bekannt, daß die verwendete Technik zu falschen Ergebnissen führt, da ein großer Teil der monodesaturierten Phosphatidylcholone mitbestimmt wird [Holm et al, 1996].

1.6. Das Modell der isolierten perfundierten Rattenlunge

Zur Untersuchung des Metabolismus der Surfactant-Phospholipide nach hyperoxischen Lungenschaden wurde das Modell der isolierten perfundierten Lunge gewählt, weil es bei diesem Krankheitsbild anderen Modellen gegenüber entscheidende Vorteile hat (siehe Diskussion). Die isolierte perfundierte Lunge zeichnet sich durch den Erhalt des Zellverbandes und die Abkopplung des Organs von hormonellen Einflüssen des Körpers aus sowie durch die Mög-

lichkeit der Einflußnahme auf Ventilations- und Perfusionsparameter. Das Modell bietet die Möglichkeit, den Phospholipid-Metabolismus der Lunge detailliert zu untersuchen. Das ^3H -Cholin aus dem Perfusat wird in die Typ-II-Pneumozyten aufgenommen und via Phosphocholin in Phosphatidylcholin umgesetzt. Mit dem neusynthetisierten Phosphatidylcholin wird während der Perfusion ein Teil der Radioaktivität in den intrazellulären Surfactant-Pool, die Lamellarkörperchen, integriert. Wiederum ein Teil dieser ^3H -Aktivität wird in die Alveole sezerniert.

Aus der Messung der ^3H -Aktivität im Perfusat sowie im Phospholipid von Lungengewebe, intrazellulärem Surfactant (IZS) und BALF können nun verschiedene metabolische Größen bestimmt werden:

- Aus der Abnahme der ^3H -Aktivität im Perfusat kann die Cholinaufnahme der Lunge während der Perfusion berechnet werden.
- Die Summe der ^3H -Aktivität im Phospholipidextrakt des Lungengewebes und der BALF läßt eine Aussage über die Neusynthese von Phosphatidylcholin zu.
- Die Summe der ^3H -Cholin-Aktivität im Phospholipidextrakt IZS und in der BALF zeigt, welcher Teil der neusynthetisierten Phosphatidylcholone durch intrazellulären Transport in den Surfactant integriert wurde.
- Die Aktivität im Phospholipidextrakt der BALF ermöglicht eine Aussage über die Sekretion der neusynthetisierten Surfactant-Phosphatidylcholone.

1.7. Aufgabenstellung

In der klinischen Praxis wird durch Lungenfunktionsstörungen bedingte periphere Hypoxie mit möglichst geringer inhalativer Sauerstoffkonzentration therapiert, weil die Toxizität dieses Gases seit langem bekannt ist [Clark et al, 1971; Bonikos et al, 1976]. Der adaptative Lungenschaden durch subletale O_2 -Konzentration ist deshalb in der Praxis eher von Bedeutung. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Modell gewählt, welches durch Begasung von Ratten mit 85% Sauerstoff eine Adaptation an die Noxe hervorruft. Sowohl die Akutphase als auch die Adaptationsphase des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens ist im Hinblick auf die Surfactant-Lipidbiochemie und die Oberflächenaktivität des Surfactant kaum untersucht worden. Hieraus resultierte folgende Aufgabenstellung:

An einem Modell des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens durch die Begasung von adulten Ratten mit 85% Sauerstoff sollten sowohl in der akuten Phase (2 Tage) als auch in der adaptativen bzw. proliferativen Phase (7 Tage) Funktion, Poolgröße und Metabolismus der Surfactant-Phospholipide untersucht werden.

Die Surfactantfunktion sollte im Zusammenhang mit der Proteinbeladung der BALF untersucht werden.

Die Menge an Phospholipiden und deren Zusammensetzung sollte im intrazellulären und alveolären Surfactant-Pool sowie im Lungengewebe untersucht werden. Besonderes Interesse galt dabei den molekularen Spezies von Phosphatidylcholin aufgrund ihrer mengenmäßigen und funktionellen Bedeutung im pulmonalen Surfactant. Um Veränderungen deuten zu können, sollten weiterhin nicht direkt im Surfactant-Metabolismus bedingte Einflüsse auf die Menge und Zusammensetzung der Phospholipide evaluiert werden.

Der Surfactant-Phospholipid-Metabolismus sollte im Modell der isolierten ventilierten perfundierten Rattenlunge untersucht werden. Aus dem Einbau der Phosphatidylcholin-Vorstufe Cholin in die Phosphatidylcholine der Lunge und des Surfactant sollten im Zusammenhang mit den erhobenen Poolgrößen Rückschlüsse auf Veränderungen in Synthese, intrazellulärem Transport und Sekretion gezogen werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Nomenklatur

Für die Fettsäurereste der verschiedenen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurde im folgenden eine symbolische Schreibweise bzw. der Trivialname verwendet. Aus Tabelle 2 ist der systematische Name ersichtlich.

Symbol*	Trivialname der Fettsäure	Trivialname des Esters	Systematischer Name
14:0	Myristinsäure	Myristoyl-	n-Tetradecansäure
16:0	Palmitinsäure	Palmitoyl-	n-Hexadecansäure
16:1	Palmitoleinsäure	Palmitoleoyl-	Δ^9 -cis-n-Hexadecansäure
18:0	Stearinsäure	Stearoyl-	n-Octadecansäure
18:1	Ölsäure	Oleoyl-	Δ^9 -cis-n-Octadecansäure
18:2	Linolsäure	Linoleoyl-	$\Delta^9,12$ -all-cis-n-Octadecadiensäure
20:4	Arachidonsäure	Arachidonoyl-	$\Delta^5,8,11,14$ -all-cis-n-Eicosatetraensäure
22:6	Docosahexaensäure	Docosahexaenoyl-	$\Delta^5,8,11,14,17,20$ -all-cis-n- Docosahexaensäure

Tabelle 2: Nomenklatur der Fettsäuren

Nach: Dawson et al, 1969. * Anzahl der Kohlenstoffatome : Anzahl der Doppelbindungen

2.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden spezifisch pathogenfreie männliche Sprague-Dawley-Ratten aus dem zentralen Tierlabor der MHH verwendet. Die für die Methodenetablierung verwendeten Schweinelungen stammten vom Schlachthof Hannover. Es wurden nur makroskopisch gesunde, unverletzte Lungen verwendet.

2.3. Chemikalien

Für diese Arbeit wurden analysenreine Substanzen der Firmen Sigma (Steinheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Baker (Deventer, Niederlande) und Riedel-de-Haen (Seelze) eingesetzt.

2.4. Reagenzien

- Nembutallösung

0,4 ml Nembutal (6%, Sanofi ceva, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Hannover) und 0,1 ml Liquemin N5000 (Hoffmann-La Roche AG, Basel) wurden vermischt. Diese Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt. Sie enthielt 24 mg Natrium-Pentobarbital und 1000 I.E. Heparin-Natrium in 0,5 ml.

- Insulin-Stammlösung

500 I.E. bovines Insulin (Sigma, Steinheim) wurden in 20 ml 1% BSA in aqua bidest. suspendiert. Durch tropfenweise Zugabe von insgesamt 120 μ l 1 M NaOH wurde das Insulin in Lösung gebracht. Die Lösung hatte anschließend einen pH-Wert von 10,5. Aliquots von 100 μ l wurden bei -20 °C gelagert.

- 3 H-Cholinchlorid-Stammlösung

18,5 MBq (500 μ Ci) [*methyl*- 3 H]-Cholinchlorid (3 H-Cholinchlorid) in Ethanol (Amersham, Braunschweig) wurden unter Stickstoff und leichter Erwärmung vom Lösungsmittel getrennt. Zur Trockensubstanz wurden 5 ml einer 25 mM Cholinchlorid-Lösung (Sigma, Steinheim) in aqua bidest. gegeben. Es ergab sich eine Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 8800 dpm/nmol. Die Lösung wurde in 100 μ l-Aliquots bei -20 °C gelagert.

Die Zusammensetzung der weiterer Reagenzien ergibt sich aus Tabelle 3.

Reagenz	Chemikalien	Lösungsmittel	Lösungsmittelvolumen	Verarbeitung und Lagerung
Ammoniumheptamolybdat-Lösung (25 mM in 2,5 N H ₂ SO ₄)	7,62 g Ammoniumheptamolybdat 17,35 ml 95% H ₂ SO ₄	aqua bidest.	+ 232,65 ml	Lagerung bei Raumtemperatur
Alkalische Phosphatase-Reagenz (100 U/ml in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 (22 °C))	4,5 µl alkalische Phosphatase (Sigma, Steinheim)	Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 (22 °C))	+ 995 µl	bei Bedarf frisch ansetzen, bis zur Verwendung bei 4 °C lagern
Ascorbinsäurelösung	1 g Ascorbinsäure	aqua bidest.	+ 9,2 ml	lichtgeschützt bei 4 °C, max. 1 Woche aufbewahren
Brij 35-Lösung (25%)	100 ml Brij 35 (30% (w/w) (Merck, Darmstadt)	aqua bidest	+ 20 ml	Lagerung bei Raumtemperatur
0,04%ige CaCl ₂ -Lösung	40 mg wasserfreies CaCl ₂ , 0,9 g NaCl	aqua bidest.	ad 100 ml	Lagerung bei Raumtemperatur
1,5 mM CaCl ₂ / 154 mM NaCl	220,5 mg CaCl ₂ · 2 H ₂ O 9g NaCl	aqua bidest.	ad 1 l	Lagerung bei Raumtemperatur
Cholinoxidase/Peroxidase-Reagenz (Peroxidase-Stammlösung mit 20 U/ml Cholinoxidase)	12 mg Cholinoxidase	Peroxidase-Stammlösung	+ 10 ml	bei Bedarf frisch ansetzen, bei 4 °C lagern, innerhalb weniger Tage verbrauchen

Tabelle 3: Herstellung gebräuchlicher Reagenzien

Reagenz	Chemikalien	Lösungsmittel	Lösungsmittel- volumen	Verarbeitung und Lagerung
DPH-Reagenz	10 mg DPH	THF	+ 10 ml	lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren, über Monate stabil
Fixierungslösung	40,5 ml 37%iges Formaldehyd und 8 ml 25%iges Glutaraldehyd	Ringerlösung (DAB 7, Braun, Melsungen)	+ 500 ml	bei Bedarf herstellen, nicht lagern
HPLC-Derivatisierungslösung	300 µl Brij 35 -Lösung (25%) 125 µl DPH-Reagenz	aqua bidest.	+ 2,5 l	Nach Zugabe des Detergenz rühren, nach Zugabe des DPH-Reagenz nochmals rühren und 15 min im Ul- traschallbad beschallen. Lichtge- schützt aufbewahren, max. 24h verwendet.
HPLC-Eluens	75 ml aqua bidest. 5,6 g Cholinchlorid	Methanol	+ 925 ml	rühren, 15 min im Ultraschallbad entgasen
13%ige NaBr-Lösung	9 g NaCl und 130 g NaBr	aqua bidest.	ad 1 l	Lagerung bei 4 °C
64%ige NaBr-Lösung	9 g NaCl und 640 g NaBr	aqua bidest.	ad 1 l	Lagerung bei 4 °C
0,05% NH ₃ (aq)	0,5 ml 25% NH ₃ (aq)	aqua bidest.	ad 250 ml	Lagerung bei 4 °C

Tabelle 3, Fortsetzung

Reagenz	Chemikalien	Lösungsmittel	Lösungsmittel- volumen	Verarbeitung und Lagerung
6% NH ₄ HCO ₃ (aq)	6 g NH ₄ HCO ₃	aqua bidest.	ad 100 ml	Lagerung bei 4 °C
PC14:0/14:0-Standard (2 µmol/ml)	27 mg PC14:0/14:0 (Sigma, Steinheim)	TFE	20 ml	lösen im Ultraschallbad, Phospholipidbestimmung zur Kontrolle
Peroxidase-Stammlösung (0,2 mg/ml Phenol, 1,5 mM 4-Aminoantipyrin, 18,4 U/ml Meerrettichperoxidase, 100 mM Tris/HCl (pH 8,0 (22 °C)))	12 µl gesättigte Phenollösung (ICN, Eschwege), 15,2 mg Aminoantipyrin, 8 mg Meerrettichperoxidase, 606 mg Tris	aqua bidest.	ad 50 ml	pH bei 22 °C auf 8,0 einstellen, Lagerung bei 4 °C (pH bei 4 °C: 8,5; pH bei 37 °C: 7,6)
Phosphat-Standardlösung (2 mM)	136 mg KH ₂ PO ₄	aqua bidest	ad 500 ml	Lagerung bei 4 °C
Phosphocholin-Auftragsmittel	10 ml 0,05% NH ₃ (aq)	Methanol	+ 90 ml	Lagerung bei Raumtemperatur
Phosphocholin-Elutionsmittel	10 ml 0,05% NH ₃ (aq), 10 ml 6% NH ₄ HCO ₃ (aq)	Methanol	+ 40 ml	Lagerung bei Raumtemperatur
Cholin-Standardlösung (10 mM Cholin in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 (22 °C))	35 mg Cholin, 303 mg Tris	aqua bidest.	ad 25 ml	pH bei 22 °C auf 8,0 einstellen, Lagerung bei 4 °C (pH bei 4 °C: 8,5; pH bei 37 °C: 7,6)

Tabelle 3, Fortsetzung

Reagenz	Chemikalien	Lösungsmittel	Lösungsmittel- volumen	Verarbeitung und Lagerung
Phosphocholin-Standardlösung (10 mM Phosphocholin in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 (22 °C))	64 mg Phosphocholin, 303 mg Tris	aqua bidest.	ad 25 ml	pH bei 22 °C auf 8,0 einstellen, Lagerung bei 4 °C (pH bei 4 °C: 8,5; pH bei 37 °C: 7,6)
physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl)	9 g NaCl	aqua bidest.	ad 1 l	Lagerung bei Raumtemperatur
1%ige SDS-Lösung	1 ml 10%ige SDS-Stammlösung	aqua bidest.	+ 9 ml	bei Bedarf herstellen, nicht lagern
10%ige SDS-Stammlösung	10 g SDS	aqua bidest.	ad 100 ml	Lagerung bei 4 °C
100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0 (22 °C))	1,214 g Tris	aqua bidest.	ad 100 ml	pH bei 22 °C auf 8,0 einstellen, Lagerung bei 4 °C (pH bei 4 °C: 8,5; pH bei 37 °C: 7,6)
Trypan-Blau-Lösung	200 µl 0,5%ige (w/v) Trypan-Blau-Lösung in physiologischer Kochsalzlösung (Biochrom KGW, Berlin)	0,9% NaCl	+ 800 µl	Lagerung bei Raumtemperatur
Vorperfusionslösung für die Lungenperfusionsfixierung	162 mg CaCl ₂ · 2H ₂ O, I.E. Heparin (Hoffmann La-Roche, Basel) und 0,5% Procain (Steigerwald)	25000 (DAB 7, Braun Melsungen)	500 ml	10 min bei Raumtemperatur mit Carbogen begasen

Tabelle 3, Fortsetzung

2.4.1. Perfusionsmedium

Als Perfusionsmedium wurde ein Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer unter Zusatz von BSA und organischen Nährsubstanzen eingesetzt, wie er in der isolierten Lungenperfusion häufig verwendet wird [Godinez et al, 1973; Wali et al, 1993; Fisher et al, 1991]. Seine Zusammensetzung ist in Tabelle 4 angegeben.

Substanz	Konzentration	Molarität
NaHCO ₃	1,079 g/l	12,8 mM
NaCl	7,802 g/l	114 mM
CaCl ₂	282 mg/l	2,54 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	162 mg/l	0,66 mM
KH ₂ PO ₄	94 mg/l	0,69 mM
KCl	354 mg/l	4,75 mM
Glucose	1,009 g/l	5,6 mM
Glycerin	145 µl/l	2,0 mM
Na-Acetat	83 mg/l	1,0 mM
Na-Palmitat	28 mg/l	0,1 mM
Na-Oleat	31 mg/l	0,1 mM
BSA (FraktionV, >96%, Sigma, Steinheim)	50 g/l	

Tabelle 4: Zusammensetzung des Perfusionsmediums

Direkt vor der Perfusion wurden zu 100 ml Medium hinzugefügt:

Insulin-Stammlösung	100 µl (entsprechend 2,5 I.E. Insulin/100 ml Perfusat)
³ H-Cholinchlorid-Stammlösung	100 µl (370 kBq (10 µCi) ³ H-Cholinchlorid /100 ml Perfusat, 25 µmol/l Cholinchlorid, 148 kBq/µmol (4 µCi/µmol), 8800 dpm/nmol)

Zur Herstellung des Perfusionsmediums wurde das BSA und die organischen Substanzen über Nacht in sterilem aqua bidest. (2-4 °C) in Lösung gebracht. Nach der Zugabe der anorgani-

schen Salze mit Ausnahme von NaCl und NaHCO₃ wurde mit sterilisiertem (121 °C, 20 min, wasserdampfgesättigt) aqua bidest. auf das Endvolumen aufgefüllt. 100 ml des Mediums wurden entnommen und in der Perfusionsapparatur unter Carbogen-Begasung und Erwärmung auf 37 °C rezirkuliert. Der sich einstellende pH-Wert wurde mit kristallinem NaHCO₃ auf 7,35 reguliert. Dem Restvolumen (Ausgangsvolumen –100 ml) an Perfusat wurde die entsprechende Menge an Puffersubstanz zugesetzt. Die Konzentration der anorganischen Kationen Na⁺, K⁺ und Ca⁺⁺ wurde im Bereitschaftslabor der MHH an einem automatischen Flammenphotometer AFM 5051 (eppendorff, Hamburg) bestimmt. Die zuzugebende Menge an NaCl wurde aus der Sollkonzentration 154 mM Na⁺ und der gemessenen Na⁺-Konzentration errechnet. Es ergaben sich die in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen an NaHCO₃ und NaCl. Das Perfusionsmedium wurde durch ein Cellulose-Nitrat-Filter (Schwarzrand, 5 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel) vorfiltriert und durch ein Cellulose-Acetat-Filter (Rotrand, 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel) sterilfiltriert. Es wurde in 125 ml-Portionen bei -20 °C gelagert.

2.5. Gase

Für die Begasungs- und Perfusionsversuche wurden folgende Gase der Firma Linde (Hannover) eingesetzt:

Sauerstoff (99,5%)¹

Druckluft (medizinisch)

Carbogen (95% O₂ (4.6), 5% CO₂ (99,5%))

Luft mit 5% CO₂ (Dreistoffgemisch 5% CO₂ (99,5%), 20% O₂ (4.6), 75% N₂ (4.6))

2.6. Experimenteller Aufbau

Für die in *vivo*-Begasungsexperimente mit anschließender isolierter Perfusion der Lunge wurden spezifisch pathogenfreie, männliche Sprague-Dawley-Ratten eingesetzt. Es wurden fünf Gruppen zu je 5-8 Tieren gebildet:

¹ Bei allen Gasen ist die Reinheit des Gases in Klammern angefügt.

- Nicht behandelte Kontrolle (keine Begasung, isolierte Lungenperfusion direkt nach Entnahme aus der SPF-Station)
- 2 Tage 21% O₂ (zweitägige Begasung mit Druckluft, isolierte Lungenperfusion)
- 2 Tage 85% O₂ (zweitägige Begasung mit 85% Sauerstoff, isolierte Lungenperfusion)
- 7 Tage 21% O₂ (siebentägige Begasung mit Druckluft, isolierte Lungenperfusion)
- 7 Tage 85% O₂ (siebentägige Begasung mit 85% Sauerstoff, isolierte Lungenperfusion)

Die beiden Gruppen mit Druckluftbegasung wurden als direkte Vergleichsgruppen für die Hyperoxiegruppen gebildet, da Veränderungen der Meßgrößen durch den Streß der Begasungssituation nicht auszuschließen waren. Die nichtbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt, um diesen Einfluß feststellen zu können. Da bei keiner der untersuchten Größen ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Kontrollgruppen (nichtbehandelte Kontrolle, 2 Tage 21% O₂, 7 Tage 21% O₂) festgestellt werden konnte, wurden diese zusammengefaßt und im weiteren als Kontrolle bezeichnet.

Für die Experimente, die direkt nach der Begasung ohne isolierte Lungenperfusion durchgeführt wurden, wurde auf die nichtbehandelte Kontrollgruppe verzichtet. Auch hier wurden beide Begasungskontrollen in einer Gruppe zusammengefaßt, da keine Unterschiede zwischen 2 und 7 Tagen 21% O₂ Begasung bestanden.

2.7. In vivo-Begasung

Die Begasung der Ratten wurde in Plexiglaskammern mit den Innenmaßen (29 · 34 · 48)cm³ (Höhe · Breite · Länge) durchgeführt. Die Tiere wurden zu zweit in normalen Käfigen in die Kammern gesetzt; anstelle von Einstreu wurden Gitterroste verwendet, um eine Verwirbelung von Staubpartikeln und deren Inhalation sowie Koprophagie zu vermeiden. Die Tiere hatten freien Zugang zu sterilisiertem Futter (altromin 1314 FORTI, Altromin GmbH, Lage) und Wasser. Abbildung 5 stellt schematisch den Aufbau der Begasungsapparatur dar. Die Begasungsparameter sind in Tabelle 5 aufgeführt.

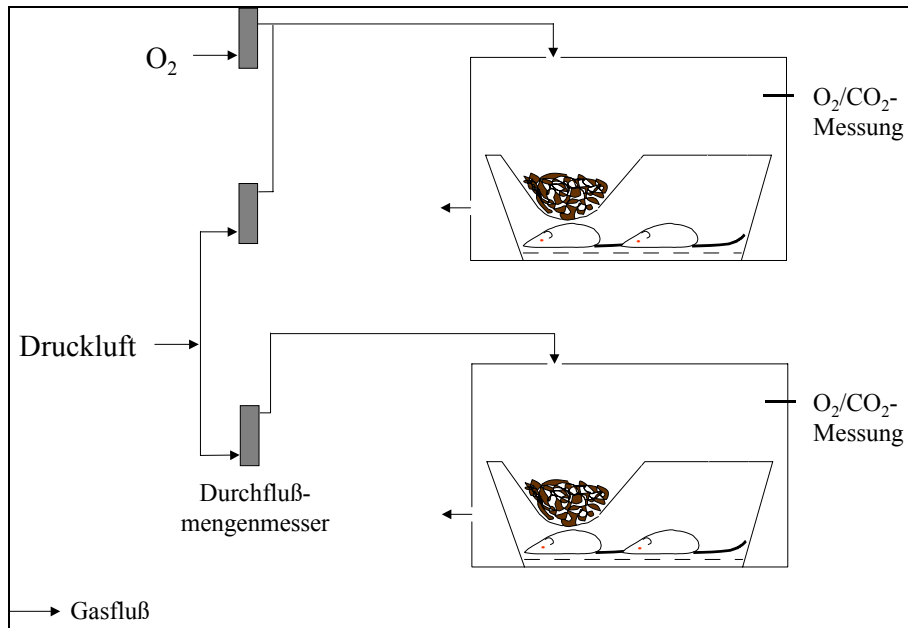


Abbildung 5: Apparatur zur Begasung von Ratten mit 21% O₂ und 85% O₂

Gasfluß	6 l/min ² (8 Gasaustausche / Stunde)
rel. Luftfeuchtigkeit	30-60%
Temperatur	21-25 °C
Sauerstoffkonzentration	21 bzw. 85% ³
Kohlendioxidkonzentration	< 0,13% ⁴

Tabelle 5: Begasungsparameter

2.8. Isolierte perfundierte Lunge

Für die isolierte ventilierte Lungenperfusion wurde eine von den technischen Werkstätten der MHH gebaute Apparatur eingesetzt. Diese besteht aus einem (40 · 50 · 100)cm³ (Tiefe · Höhe · Breite) großen Kasten mit verschiebbaren Plexiglastüren und abgedichteter Bodenwanne. Sie ist mit einer regelbaren elektrischen Heizung ausgestattet und enthält die Perfusionsgefäße und Aeratoren (siehe Abbildung 7) sowie die Anschlüsse für die Versorgung mit Ventilationsgas und Carbogen für die gleichzeitige Perfusion von bis zu drei Lungen. Diese Konstruk-

² Der Gasfluß (Druckluft und reiner Sauerstoff) wurde mit Durchflußmengenmessern verschiedener Kapazität (Dräger, Hannover) wie in Abbildung 1 dargestellt bestimmt.

³ Oxydig (Dräger, Hannover)

⁴ Mikro Gas 7650 (Kontron Instruments, Neufahrn)

tion stellte eine gleichmäßige Temperierung des Innenraums und der Gase sicher. Der schematische Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 7 zu sehen.

Für die Perfusion einer Lunge waren nötig:

- ein Glaszylinder mit drei seitlichen Öffnungen für die Einstabmeßkette und beide Schläuche für die Perfusatzirkulation (16 cm · 6,5 cm),
- eine Schlauchpumpe zur Rezirkulation des Perfusats,
- Silikonschlauch (8 mm Außen- / 5 mm Innendurchmesser für die Rezirkulation; 2,25 mm Außen- / 1,75 mm Innendurchmesser für die Zuleitung zum Perfusionskatheter)
- sterile Einmalfilterhalter (Schleicher & Schuell, Dassel) mit Luer-Lock mit 5 µm und 0,45 µm Porengröße,
- ein handgefertigter doppelwandiger Glas-Aerator, mit dem das Perfusat temperiert und mit Carbogen begast wird (siehe Abbildung 8),
- ein Kunststoffdeckel mit integriertem Metall-Y-Stück für Zu- und Ableitung von Ventilationsgas an der Oberseite des Deckels
- und Adapter für den Tubus an der Unterseite.

Das Perfusionsgefäß, der Aerator sowie alle perfusatführenden Schläuche wurden nach jedem Versuch gründlich mit aqua bidest. gereinigt und anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach jeder dritten Perfusion wurden diese Teile zusätzlich mit 10% H₂O₂ gereinigt.

Abbildung 6 zeigt die im Glaszylinder hängende Lunge während der isolierten Perfusion.



Abbildung 6: Isolierte ventilierte Perfusion einer Rattenlunge

Im Perfusionsgefäß hängt die Lunge am in die Trachea eingeführten Tubus. Im Gefäß befindet sich das Perfusatresevoir mit der pH- und Temperatur-Meßeinheit (rechts). Durch einen dünnen Schlauch wird Perfusat in den Perfusionskatheter im Truncus pulmonalis geleitet.

2.8.1. Ventilation der isolierten Lunge

Zur Ventilation der isolierten perfundierten Lunge wurde eine Kolbenpumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus, Southnatick, Mass, USA) mit wählbarem Hub und Frequenz eingesetzt. Es wurde ein 30 ml-Kolben verwendet. Um die Ventilation druckkontrolliert durchführen zu können, wurde das Ventilationssystem wie in Abbildung 7 dargestellt aufgebaut. Das Ventilationsgas (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) wurde aus der Pumpe über eine Glasfritte zur Anfeuchtung in ein auf 37 °C temperiertes Wasserreservoir geleitet. Das wasserdampfgesättigte, temperierte Gas gelangte von hier über eine Glasleitung in die Lungen. Über eine T-Verzweigung im System wurde das Gas gleichzeitig durch ein Rohr in ein wassergefülltes Glasgefäß geleitet, welches als Überdruckventil fungierte und einen Maximaldruck von 10 cm Wassersäule (980 Pa) zuließ. Für die Hyperventilation zur Wiedereröffnung von Mikroatelektasen wurde dieses Gefäß verschlossen. Ein weiteres Rohr führte in ein

zweites Gefäß, welches während der Hyperventilation einen Maximaldruck von 18 cm Wassersäule (1770 Pa) zuließ. In der Expirationsphase wurde die Luft über ein Schlauchsystem zur Pumpe zurückgeleitet. Am Pumpenausgang befand sich ein Schlauch, der 3 cm tief in ein Glasgefäß mit Wasser eintauchte. Hierdurch wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 3 cm Wassersäule (300 Pa) gewährleistet, der den kompletten Lungenkollaps verhinderte. Die Ventilationsbedingungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

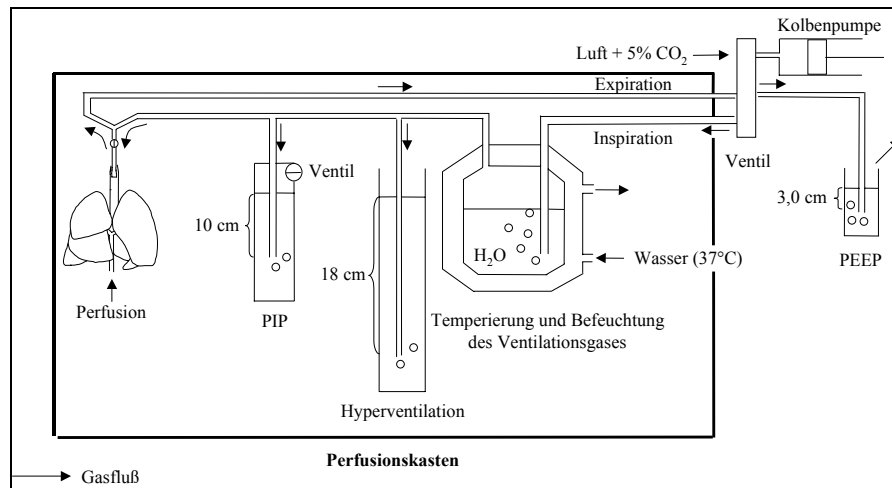


Abbildung 7: Druckkontrolliertes Ventilationssystem der isolierten perfundierte Lunge (Schema)

PIP: Peak inspiratory pressure (inspiratorischer Spitzendruck); PEEP: positive endexpiratory pressure (positiver endexpiratorischer Druck).

Ventilationsgas	20% Sauerstoff 5% Kohlendioxid 75% Stickstoff (T = 37 °C, wasserdampfgesättigt)
inspiratorischer Spitzendruck	10,0 cm H ₂ O (980 Pa)
positiver endexpiratorischer Druck	3,0 cm H ₂ O (295 Pa)
Ventilationsfrequenz	12/min
Hyperventilation	2 · 18,0 cm H ₂ O (1770 Pa) alle 15 min

Tabelle 6: Ventilationsparameter bei der isolierten Lungenperfusion

2.8.2. Perfusion der isolierten Lunge

Das Perfusat wurde am Tag der Perfusion aufgetaut. Vor der Perfusion rezirkulierte das Medium bei Carbogen-Begasung und Temperierung auf 37 °C ca. 1 h in der Perfusionsapparatur.

Das Perfusat rezirkulierte während der Perfusion wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt. In Flußrichtung hinter der Pumpe⁵ wurde durch Filter der Porengröße 5 µm (Cellulose-Nitrat, Schleicher & Schuell, Dassel) und 0,45 µm (Cellulose-Acetat, Schleicher und Schuell, Dassel) filtriert, um nach der Präparation in das Perfusat übergetretene Blutzellen und Gewebeste zu entfernen. Die Parallelschaltung von je zwei Filtern ermöglichte ein problemloses Wechseln von durch Partikeln verstopften Filtereinheiten. Das Perfusat wurde in einem temperierten, doppelwandigen Aerator auf eine große Oberfläche verteilt und mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid, wasserdampfgesättigt, T = 37 °C) begast.

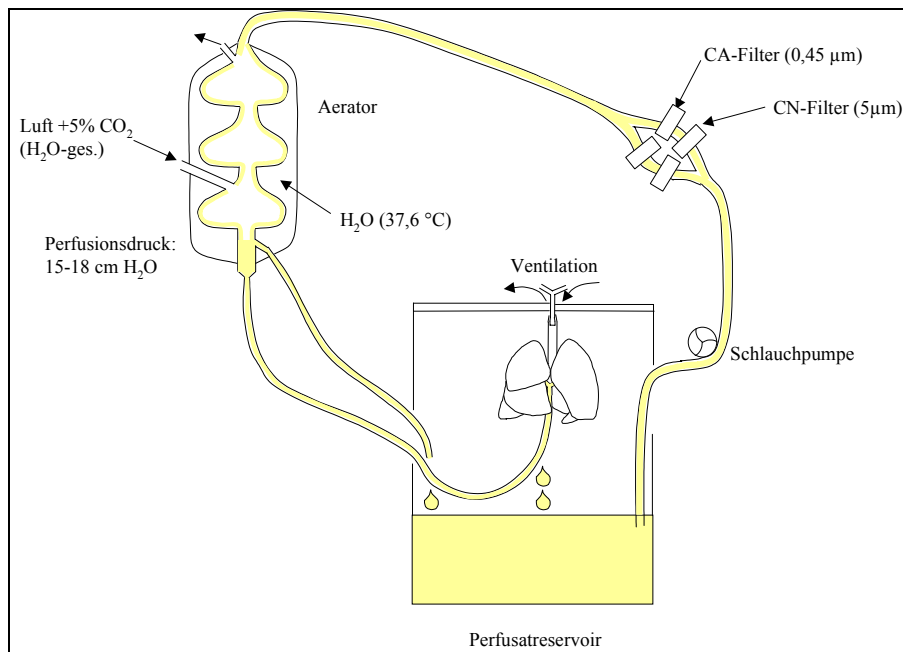


Abbildung 8: Perfusionssystem der isolierten perfundierten Lunge

CA: Cellulose-Acetat, CN: Cellulose-Nitrat

Im unteren Ende des Aerators befand sich ein Flüssigkeitsreservoir, aus dem das Perfusat über den Perfusionskatheter in die Lunge floß. Ein gleichbleibender Perfusionsdruck wurde durch den Überlauf am oberen Rand des Reservoirs garantiert, der in das Perfusatgefäß zurückführte. Die Perfusion fand unter den in Tabelle 7 angegebenen Bedingungen statt.

Bei einem Perfusatdruck von 15 cm H₂O (1470 Pa) wurde ein Perfusatfluß von 5-10 ml erreicht. Dieser Fluß liegt im Bereich der Literaturwerte [Nicholas et al, 1981; Wali et al, 1993;

⁵ Zur Rezirkulation des Perfusats wurde eine Schlauchpumpe (Masterflex modular drive P-07553-87, Cole Parmer Instrument Co, Niles, IL, USA) eingesetzt. Sie war mit zwei Pumpenköpfen (Masterflex easy-load model 7518-00, Cole Parmer Instrument Co, Niles, IL, USA) für die parallele Perfusion von zwei Lungen ausgestattet. Die Pumpe wurde von einem Masterflex Modular Controller (Cole Parmer Instrument Co, Niles, IL, USA) gesteuert.

Fisher et al, 1991; Barr et al, 1988; Post et al, 1983]. Bei der Perfusion mit einem Fluß von 13 ml/min wurde unter identischen Bedingungen kein höherer Einbau von ^3H -Cholinchlorid in die Lunge gemessen.

Die Perfusionszeit begann mit den ersten beiden Hyperventilationen (siehe 2.9.1). Während der ersten 15 min der isolierten Perfusion wurden die 0,45 μm -Filter gewechselt, sobald diese mit Zellmaterial besetzt waren. Dieser Zeitraum wurde außerdem dazu genutzt, den Perfusatfluß zu kontrollieren und gegebenenfalls den Perfusionsdruck zu erhöhen. Nach ca. 13 min wurde einer der beiden 0,45 μm -Filter entfernt. Zu diesem Zeitpunkt waren kaum noch Blutzellen im Perfusat. Das Perfusativolumen wurde auf 100 ml justiert. Nach 15 min begann der dreistündige Markierungszeitraum.

Perfusionsgeschwindigkeit	5-10 ml/min
Perfusionsdruck	15-18 cm H ₂ O (1470-1770 Pa)
Perfusionsmedium (siehe 2.4.1)	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit 5% BSA, organischen Nährsubstanzen, 25 I.E. Insulin/l, 25 $\mu\text{mol/l}$ Cholinchlorid wasserdampfgesättigt carbogenäquilibriert
Temperatur:	37 °C ⁶
PH-Wert:	7,30-7,40 ⁷

Tabelle 7: Perfusionsparameter

2.8.3. ^3H -Markierung während der Perfusion

Nach 15minütiger Perfusion wurde das Perfusat mit 100 μl ^3H -Cholin-Stammlösung (siehe 2.4) und 100 μl Insulin-Stammlösung (siehe 2.4) versetzt (t = 0 min). Beide Lösungen wurden vor der Hyperventilation zugegeben. Während der Perfusion wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (t = 5 min, 60 min, 120 min, 180 min) je 2 · 200 μl Perfusat zur Bestimmung des Cholineinbaus in die Lunge entnommen. Nach dreistündiger Markierung wurde das Experiment beendet.

⁶ Die Temperatur wurde während der Perfusion mit einem wtw pH-Meter pH 323 mit Einstabmeßkette SenTix 41 (OMNILAB, Gehrden) gemessen.

⁷ Der pH-Wert wurde während der Perfusion mit einem wtw pH-Meter pH 323 (s.o.) kontrolliert und mit 2 M HCl bzw. 2 M NaCl nachgestellt.

2.9. Präparation der Ratten

Alle für diese Arbeit durchgeführten Tierversuche waren im Rahmen des Versuchsvorhabens 42602-96/858 von der Bezirksregierung genehmigt.

2.9.1. Vorbereitung der isolierten ventilierten perfundierten Lunge

Die Ratten wurden gewogen und durch intraperitoneale Injektion von 0,5 ml frisch angesetzter Narkoselösung (24 mg Natrium-Pentobarbital und 1000 I.E. Heparin Natrium, siehe 2.4) narkotisiert. Nach Eintreten der Areflexie (Ohrpintreflex, Schwanzwurzelreflex) wurde das Fell bauchseitig mit 70% Ethanol angefeuchtet. In der Medianlinie wurde die Haut vom unteren Bauch bis zum Angulus mandibularis aufgetrennt und im Bereich von Brustkorb und Hals vom Muskelgewebe abgetrennt. Die Trachea wurde unterhalb des Kehlkopfes freigelegt und mit einem Faden (ca. 20 cm handelsübliche Zahnseide, gewachst) umschlungen. Nach einem Einschnitt in die Trachea parallel zu den Knorpelspannen ca. 1 cm unter dem Kehlkopf und nötigenfalls einem Entlastungsschnitt senkrecht nach oben wurde intubiert und der Tubus⁸ mit einem Doppelknoten gesichert. Die Ventilation erfolgte mit den unter 2.8.1 aufgeführten Parametern. Mit der Durchtrennung der Bauchmuskulatur entlang der Linea alba und Entlastungsschnitten kaudal der Rippenbögen wurden die Eingeweide freigelegt. Das Zwerchfell wurde dorsal des Processus xiphoideus eingeschnitten und entlang der Rippenbögen abgetrennt. Die Lunge wurde hierbei und während ihrer Freipräparation nicht berührt. Die Rippen wurden entlang der Medioklavikularlinie durchtrennt und der Thymus entfernt. Der Truncus pulmonalis wurde entlang des Sinus pericardius transversus mit einem Faden (s.o.) umschlungen. Nach dem Einschneiden des linken Vorhofes und der rechten Herzkammer wurde der Perfusionskatheter⁹ unter Perfusatfluß durch die rechte Kammer in den Truncus pulmonalis geschoben und dort mit dem Faden gesichert. Anschließend wurde die linke Herzhälfte entfernt und die Lunge apikal und dorsal freigelegt und am Tubus hängend entnommen. Sie wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (Raumtemperatur) von Blutresten befreit, in das

⁸ Der Tubus bestand aus einer kurzen Knopfkanüle aus Edelstahl mit Luerlockanschluß. Die Kanüle hatte folgende Maße: Länge incl. Luerlock 34,5 mm; Außendurchmesser 1,6 mm; Innendurchmesser 1,2 mm; Länge des Knopfes 4,4 mm; Außendurchmesser des Knopfes 2,2 mm.

⁹ Der Perfusionskatheter bestand aus einem Edelstahlrohr mit aufgesetztem Knopf. Er wurde am Ende des Perfusionsschlauches befestigt und mit dem Knopf voran in den Truncus pulmonalis geschoben. Die Fixierung erfolgte, indem der Faden hinter dem Knopf verknotet wurde. Der Perfusionskatheter hatte die folgenden Maße: Länge 16,8 mm; Außendurchmesser 1,6 mm; Innendurchmesser 1,2 mm; Länge des Knopfes 2,2 mm; Außendurchmesser des Knopfes 2,2 mm.

Perfusionsgefäß gehängt und zweimal hyperventiliert. Die Präparation der isolierten ventilierten perfundierten Lunge dauerte 10-12 min. Die Perfusion wurde unter den in Abschnitt 2.8.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Im Anschluß an die Perfusion wurde die Lunge am Tubus hängend aus der Anlage entnommen und für die biochemische Analytik präpariert. Alle Proben wurden während dieser Verarbeitung bei 0-4 °C und im Anschluß bei -80 °C gelagert. Die Lunge wurde standardisiert mit 4 · 8 ml physiologischer Kochsalzlösung (Raumtemperatur) lavagiert. Die BALF wurde zur Abtrennung der Zellen zentrifugiert (200 g, 10 min, 4 °C¹⁰) und eingefroren. Die rechte und linke (incl. der akzessorischen) Lunge wurden freipräpariert, gewogen und getrennt verarbeitet. Die rechte Lunge wurde für die spätere Lipidextraktion eingefroren, aus der linken wurde direkt anschließend Rohsurfactant präpariert (siehe 2.10.1), welcher bei -80 °C gelagert wurde.

2.9.2. Lungenpräparation für funktionelle Surfactantanalytik und Zelldifferentiation

Die Präparation wurde bis zum Legen des Perfusionskatheters wie oben beschrieben durchgeführt. Der Perfusionskatheter wurde mit einem Druck von 15-20 cm H₂O (1470-1960 Pa) aus einem Gefäß mit physiologischer Kochsalzlösung gespeist. Nach der Perfusion der Lunge zur Entfernung des Blutes wurde sie mit 4 · 8 ml physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Sie wurde aus dem Thorax entnommen und von Fremdgewebe befreit. Die lavagierbaren Zellen wurden pelletiert (200 g, 10 min, Raumtemperatur¹¹) und für die Bestimmung der Zellvitalität und Zelldifferentiation (siehe 2.13) verwendet. Der Überstand wurde tiefgefroren (-80 °C) zwischengelagert. Später wurde die zellfreie BALF aufgetaut, zentrifugiert (80000 g, 60 min, 4 °C¹²) und der sedimentierte Surfactant emulgiert wie unter 2.12.1 beschrieben.

¹⁰ Präparative Kühlzentrifuge Modell J-6, Beckman Instruments GmbH, München

¹¹ Präparative Kühlzentrifuge Modell J-6, Beckmann Instruments GmbH, München

¹² L8-70 Ultrazentrifuge, Beckman (München)

2.9.3. Lungenpräparation für die histologischen Untersuchungen

Die Präparation wurde bis zum Legen des Perfusionskatheters analog durchgeführt. Der Perfusionskatheter wurde mit einem Druck von 15-20 cm H₂O aus einem Gefäß mit Vorperfusionslösung (siehe 2.4) gespeist. Nachdem die Lunge vollständig weiß war, wurde die Beatmungspumpe in der Endexpiration abgestellt und die Lunge in situ unter einem Beatmungsdruck von 3 cm H₂O mit der Fixierlösung (siehe 2.4) perfundiert. Die Lunge wurde freipräpariert, aus dem Thorax entnommen und in Fixierlösung aufbewahrt. Die fixierten Lungen wurden von Mitarbeitern der Anatomie 1 der MHH in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin [Burck, 1988] gefärbt.

2.9.4. Lungenpräparation für die Immunhistochemie

1,5 h vor der Präparation wurde den Ratten 5 mg BrdU pro 100 g Körpergewicht in PBS in die Schwanzvene injiziert [Westermann et al, 1989]. Die Präparation wurde bis zum Legen des Perfusionskatheters analog durchgeführt. Die ventilierte Lunge wurde mit einem Druck von 15-20 cm H₂O (1470-1960 Pa) mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, bis alles Blut aus dem Gefäßsystem entwichen war. Anschließend wurde die Lunge in situ durch den Tubus mit OCT/PBS gefüllt, bis bei einem Druck von 10 cm Flüssigkeitssäule (980 Pa) oberhalb des Hilus kein Fixans mehr von der Lunge aufgenommen wurde. Die einzelnen Lungelappen wurden mit dem Skalpell in kleine Blöcke zerschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt. Die intravenöse Injektion von BrdU sowie die Kryoschnitte und die immunhistochemische Färbung mit anti-BrdU [Gratzner, 1982] und einem Antikörper gegen ED1 [Westermann et al, 1989] als Marker für Monozyten und Makrophagen wurde von Mitarbeitern der Anatomie 1 der MHH durchgeführt.

2.10. Präparation von intrazellulärem Surfactant

Die Präparation von intrazellulärem Surfactant (IZS) erfolgte nach der Methode von Shelley [Shelley et al, 1977; Shelley et al, 1982]. Hierfür wurde zunächst das Lungengewebe homogenisiert und durch Zentrifugation von Geweberesten befreit und anschließend der durch Zellbestandteile verunreinigte Surfactant im Überstand mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) isoliert. Während der gesamten Präparation wurde bei 0-4 °C gearbeitet. Das Fließschema der Präparation ist in Abbildung 9 dargestellt. Für die Etablie-

rung dieser Methode zur Isolierung von IZS aus lavagiertem Lungengewebe wurde Schweinelungengewebe verwendet, weil es in großen Mengen kostenlos zur Verfügung stand. Vom Schlachthof Hannover wurden makroskopisch gesunde, unverletzte Schweinelungen geholt und sofort verarbeitet. Während des Transportes und der Zentrifugationsschritte wurde das Material auf 0-4 °C gekühlt. Die Lungen wurden von äußerem Blut befreit. Es wurde jeweils die halbe Lunge (rechts bzw. links) lavagiert. Hierzu wurde ein blockbarer Katheter mit aufgesetztem Trichter in einen der beiden Stammbronchien geschoben und arretiert. Physiologische Kochsalzlösung (Raumtemperatur) wurde in die Lungenhälfte gefüllt. Durch Absenken des Katheters unter das Lungenniveau konnte die surfactanthaltige Kochsalzlösung in ein Becherglas laufen. Dieser Spülvorgang wurde mehrfach wiederholt, bis die Spülflüssigkeit kaum noch Surfactant enthielt.

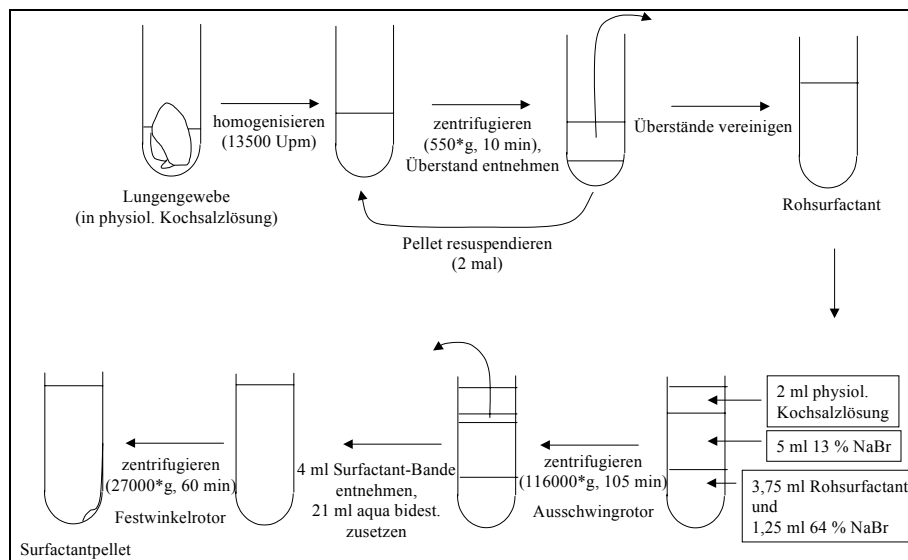


Abbildung 9: Ablaufschema der Präparation von intrazellulärem Surfactant mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation

Für die Präparation von alveolärem Surfactant wurden jedoch nur die ersten zwei Spülungen verwendet, da diese sehr konzentrierten Surfactant einhielten. Das lavagierte bzw. nicht lavagierte Lungengewebe wurde von größeren Bronchialästen befreit und in ca. 20 g schweren Stücken bei -20 °C gelagert. Die BALF wurde zunächst zur Abtrennung von Zellen zentrifugiert (270 g, 4 °C, 10 min¹³). Der zellfreie Überstand wurde erneut zentrifugiert (27000 g, 4 °C, 2 h¹⁴) und der Überstand verworfen. Der sedimentierte Surfactant wurde in 1,5 mM

¹³ Präparative Kühlzentrifuge Modell J-6, Beckman Instruments GmbH, München

¹⁴ Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments

CaCl₂ / 154 mM NaCl emulgiert und bei -80 °C gelagert. Für die Methodenetablierung wurde dieses Material durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt wie unter 2.10.2 beschrieben. Statt Rohsurfactant wurde in diesem Fall der emulgierte Surfactant eingesetzt.

2.10.1. Präparation von Rohsurfactant

Das Lungengewebe wurde mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und mit einem ULTRATURRAX^{®15} bei 13500 Upm homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert (550 g, 10 min, 4 °C¹⁶) und der Überstand mit dem darin enthaltenen Surfactant abgenommen. Das aus Geweberesten bestehende Pellet wurde mit 2 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und das Pellet nochmals reemulgiert und zentrifugiert. Die drei gepoolten Überstände wurden bei -80 °C gelagert. Um weder das Gewebe unnötig stark zu zerstören noch den Rohsurfactant zu sehr zu verdünnen, wurden die Bedingungen der Homogenisierung und das verwendete Flüssigkeitsvolumen der eingesetzten Probenmenge angepaßt (siehe Tabelle 8).

Art der Probe	Homogenisierungs-	Volumen an physiologischer
	dauer	Kochsalzlösung
3 g Schweinelunge (lavagiert)	1 min	(3+2+2) ml
½ Rattenlunge (nach dreistündiger isolierter Perfusion lavagiert, ca. 1,5 g)	30 sec	(1,5+1+1) ml

Tabelle 8: Homogenisierungsbedingungen bei der Herstellung von Rohsurfactant

2.10.2. Reinigung des IZS durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Reinigung des IZS geschah bei 0-4 °C. 3,75 ml Rohsurfactant (siehe 2.10.1) wurden im Zentrifugenröhrchen mit 1,25 ml 64% NaBr (siehe 2.4) gemischt. Die resultierende Suspension mit einem NaBr-Gehalt von 16% wurde sukzessive mit 5 ml 13% NaBr (siehe 2.4) und 2 ml physiologischer Kochsalzlösung überschichtet. Die Gefäße wurden in einem Aus-

¹⁵ ULTRATURRAX[®] T25 basic mit S25N-10G-Rotor (Stator-Durchmesser 10 mm, Rotor-Durchmesser 7,5 mm), beide Ika-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen.

¹⁶ Präparative Kühlzentrifuge Modell J-6, Beckman Instruments GmbH, München

schwingrotor zentrifugiert (116000 g, 4 °C, 105 min¹⁷). Während der Zentrifugation wandert der Surfactant aufgrund seiner Dichte zwischen 13%ige NaBr-Lösung und physiologische Kochsalzlösung und ist dort als weiße Bande [Shelley, 1982] sichtbar. Diese Bande wurde nach der Zentrifugation in 4 ml Flüssigkeit entnommen. Hierbei wurde darauf geachtet, keine Flüssigkeit unterhalb der Grenzschicht zwischen der 13%igen NaBr-Lösung und der physiologischen Kochsalzlösung abzapfen, um Verunreinigungen vollständig abzutrennen. Die Surfactantsuspension wurde in ein Zentrifugenglas gegeben, mit 21 ml aqua bidest. versetzt und erneut zentrifugiert (27000 g, 4 °C, 60 min¹⁸). Während dieser Zentrifugation sedimentiert der Surfactant und ist anschließend als weißes Pellet sichtbar, welches durch Abgießen des Überstandes von langsamer sedimentierenden Stoffen getrennt wird.

2.10.2.1. Verarbeitung des Surfactantpellets für die funktionelle Analytik

Das Surfactantpellet wurde für die funktionelle Analytik in 1,5 mM CaCl₂ / 154 mM NaCl emulgiert wie unter 2.12.1 beschrieben.

2.10.2.2. Verarbeitung des Surfactantpellets für die Phospholipid-Analytik

Bei IZS, der nach der isolierten Lungenperfusion gewonnen wurden, wurden aus dem Surfactantpellet nur die Lipide extrahiert. Das Zentrifugenglas wurde sukzessive mit 6 · 0,5 ml Methanol und 3 · 1 ml Chloroform vom oberen Rand her gespült, um die Surfactant-Phospholipide quantitativ zu lösen. Das Pellet wurde durch wiederholtes Abpipettieren und Einspritzen der Flüssigkeit aufgelöst. Die Lösungsmittelvolumina wurden vereinigt und mit 3 ml aqua bidest. extrahiert. Die in der Unterphase enthaltenen Phospholipide wurden bei -80 °C gelagert.

¹⁷ SW-40-Rotor, Sorvall OTD-2 Ultra Centrifuge – Oil Turbine Drive, Sorvall GmbH, Bad Homburg v.d.H.)

¹⁸ SS 34-Rotor, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments

2.11. Biochemische Analytik

2.11.1. Phospholipid-Extraktion

Zur Extraktion von Phospholipiden wurden je nach Art der Probe die Methoden von Bligh & Dyer [Bligh et al, 1959] oder die Methode von Folch [Folch et al, 1956] verwendet (siehe Tabelle 9). Beide Methoden funktionieren nach dem gleichen Prinzip. Zur wäßrigen Probe und dem darin nicht löslichen Extraktionsmittel Chloroform wird Methanol als Lösungsvermittler gegeben. Ein ternäres Gemisch entsteht, so daß die Extraktionsgeschwindigkeit nicht mehr durch eine Phasengrenzfläche limitiert ist und dadurch erheblich beschleunigt wird. Durch Zugabe von Wasser und Chloroform (Bligh & Dyer) bzw. 0,04% CaCl₂-Lösung (Folch) wird anschließend die Phasentrennung erzielt. Die hydrophoben Phospholipide befinden sich in der organischen Phase und können abgetrennt werden. Beide Methoden garantieren eine konstante Ausbeute von mehr als 90% [Bligh et al, 1959; Folch et al, 1956]. Jedoch ist bei der Methode von Folch das 15fache des Originalvolumens an Extraktionsmittel nötig, während bei der Methode nach Bligh & Dyer nur das 4fache Volumen benötigt wird.

Organische Extrakte wurden in Chloroform/Methanol bei -80°C aufbewahrt.

Material	Extraktionsmethode
Lungengewebe	Folch
Rohsurfactant	Folch
BALF	Bligh & Dyer
Surfactantemulsion (intrazellulär bzw. alveolär)	Bligh & Dyer
Plasma	Bligh & Dyer
Peritonealleukozyten	Bligh & Dyer

Tabelle 9: Einsatz der Extraktionsmethoden in Abhängigkeit vom Probenmaterial

2.11.1.1. Extraktion nach Bligh & Dyer [Bligh et al, 1959]

Die Extraktion wäßriger PL-Suspensionen bis zu einem Volumen von 1 ml wurde nach der Methode von Bligh & Dyer durchgeführt. Die Probe wurde mit 0,9% NaCl auf 1 ml aufgefüllt und mit 3 ml Methanol und 1 ml Chloroform versetzt. Das ternäre Gemisch wurde kräftig geschüttelt. Durch die Zugabe von 2 ml NaCl und 3 ml Chloroform setzte die Phasentrennung

zwischen der organischen und der wäßrigen Phase ein. Nach erneutem kräftigem Schütteln wurde zur Komplettierung der Phasentrennung zentrifugiert (1600 g, 4 °C, 10 min¹⁹) und die die Phospholipide enthaltende organische Unterphase isoliert. Größere Volumina (1-15 ml) wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein definiertes Volumen gebracht und mit der gleichen Menge an Methanol und Chloroform versetzt. Nach heftigem Schütteln für 5 min und Zentrifugieren zur Phasentrennung (s.o.) wurde die Unterphase abpipettiert und die Oberphase mit dem halben Volumen an Chloroform nochmals extrahiert.

2.11.1.2. Extraktion nach Folch [Folch et al, 1956]

Zur Extraktion der Lungen-Phospholipide wurde nach der Methode von Folch gearbeitet. Eine halbe Rattenlunge, 1 g lavagiertes Schweinelungengewebe oder 500-600 µl Rohsurfactant wurden mit 5 ml Methanol versetzt und mit einem ULTRA-TURRAX^{®20} sorgfältig homogenisiert. Nach der Zugabe von 10 ml Chloroform wurde nochmals homogenisiert und die Suspension auf ein mit Chloroform/Methanol (2:1 v/v) angefeuchtetes Faltenfilter gegeben. Der ULTRA-TURRAX[®], das Filter und das Extraktionsgefäß wurden sequentiell gründlich mit Chloroform/Methanol (2:1 v/v) gespült und der Extrakt mit dem Lösemittel auf 25 ml ergänzt. Es wurden 5 ml 0,04%ige CaCl₂-Lösung (siehe 2.4) hinzugefügt. Nach kräftigem Schütteln wurde zur Phasentrennung zentrifugiert (1600 g, 4 °C, 10 min²¹) und die Oberphase abpipettiert. Die organische Phase wurde unter Stickstoffstrom bei 40 °C eingetrocknet und in einem definierten Volumen Chloroform/Methanol (7:3 v/v) wieder aufgenommen.

2.11.2. Phosphocholin-Analytik

Phosphocholin wurde aus der Oberphase des Folch-Extraktes der rechten Lunge quantifiziert. Nach einer Festphasenextraktion an BondElut HF[®]NH₂-Säulen wurde die Phosphatgruppe katalytisch abgetrennt und das Cholin in einer Cholinoxidase/Peroxidase-katalysierten Farb-reaktion nachgewiesen.

¹⁹ Präparative Kühlzentrifuge Modell J-6, Beckman Instruments GmbH, München

²⁰ ULTRA-TURRAX[®] T25 basic, und Rotor S25N-10G, beide Ika Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen

²¹ Präparative Kühlzentrifuge Modell J-6, Beckman Instruments GmbH, München

2.11.2.1. Trennung von Phosphocholin und Cholin

Der Oberphase des Folch-Extraktes einer rechten Lunge wurde unter Vakuum²² das Lösungsmittel entzogen. Die trockene Substanz wurde in 1 ml Phosphocholin-Auftragsmittel durch zweiminütiges Beschallen mit Ultraschall suspendiert. Die nicht gelöste Substanz wurde abzentrifugiert (10000 g, 1 min, Raumtemperatur)²³. Sie enthielt kein Phosphocholin mehr. Die gesamte flüssige Phase wurde auf eine BondElut HF[®]NH₂-Säule 100 mg (varian, Harbor City, CA, USA) aufgetragen. Reste von Cholin wurden mit 1 ml Phosphocholin-Auftragsmittel eluiert. Phosphocholin wurde mit 1,5 ml Phosphocholin-Elutionsmittel eluiert. Das Lösemittel wurde unter Vakuum²⁴ entzogen.

2.11.2.2. Quantifizierung von Phosphocholin

Das vom Cholin getrennte, lösungsmittelfreie Phosphocholin wurde in 70 µl Tris-Puffer gelöst. Auf eine 96-well-Platte (Dynatech, Denkendorf) wurden zu 10 µl Alkalische Phosphatase-Reagenz je 20 µl dieser Phosphocholinlösung gegeben. Nach kurzem Schütteln wurde 50 min bei 38 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Cholinoxidase/Peroxidase-Reagenz zugesetzt und nochmals geschüttelt. Nach erneuter Inkubation bei 38 °C über 30 min wurde die Extinktion bei 492 nm bestimmt. Die Stoffmenge an Phosphocholin wurde anhand einer mitgeführten Kalibriergerade zwischen 1 und 20 nmol Substanz gegen Leerwert bestimmt. Der lineare Bereich der Messung liegt zwischen 1 und 75 nmol (siehe 3.3.2), der Umsatz von Phosphocholin zu Cholin beträgt unter den angegebenen Bedingungen $84 \pm 2\%$ (siehe 3.3.2).

2.11.3. Phospholipid-Analytik

2.11.3.1. Phosphatbestimmung nach Bartlett [Bartlett, 1959]

Zur Bestimmung der Phospholipid-Stoffmenge wurde die Methode von Bartlett [Bartlett, 1959] eingesetzt, die eine Modifikation der Methode von Fiske und Subbarow [Fiske et al, 1925] darstellt. Dazu muß der Phospholipid-Phosphor zunächst in anorganisches Orthophos-

²² Zentrifuge UNIVAPO 150 H, Freeze Dryer Model 10-20, Uni Equip Laborgerätebau, Martinsried

²³ Hettich Mikroliter, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

²⁴ Zentrifuge UNIVAPO 150 H, Freeze Dryer Model 10-20, Uni Equip Laborgerätebau, Martinsried

phat überführt werden, indem die Proben mit Perchlorsäure und Wasserstoffperoxid in der Hitze (180-200 °C) inkubiert werden. In einem zweiten Reaktionsschritt bildet sich ein Phosphomolybdat-Komplex, der durch Ascorbinsäure reduziert wird und bei 800-830 nm photometrisch gemessen werden kann. Um den linearen Bereich beider Reaktionsschritte zu bestimmen, wurden Kalibriermessungen mit Phosphat-Standardlösung (siehe 2.4) (Linearität der Farbreaktion) und PC14:0/14:0-Standard (siehe 2.4) (Vollständigkeit der Oxidation auch bei großen Stoffmengen) durchgeführt. Sie zeigten, daß die Messung im Bereich von 10-1200 nmol Phosphat und 10-800 nmol Phospholipid linear verläuft. Wegen der Linearität der Kalibrierkurve mit Verlauf durch den Nullpunkt (siehe Abbildung 10) wurde während der Meßreihen nur eine Ein-Punkt-Kalibrierung durchgeführt.

Alle Proben (Lungengewebe, IZS, BALF, Plasma) wurden vor der Bestimmung der Phospholipid-Konzentration extrahiert. Es wurden 10-800 nmol Phospholipid in max. 50 µl wäßriger Suspension bzw. als Trockensubstanz (nach dem Verdampfen des organischen Lösungsmittels, da sonst die Gefahr der Phosgenbildung besteht!) eingesetzt. Nach Zugabe von 500 µl Perchlorsäure und 200 µl 30%iger Wasserstoffperoxidlösung (p.A., Merck, Darmstadt) wurde gemischt und bei 200 °C 35 min inkubiert. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wurden 2 ml aqua bidest., 500 µl Ammoniumheptamolybdat-Lösung (25 mM in 2,5 N H₂SO₄, siehe 2.4) und 200 µl 10%iger Ascorbinsäurelösung (siehe 2.4) zugegeben.

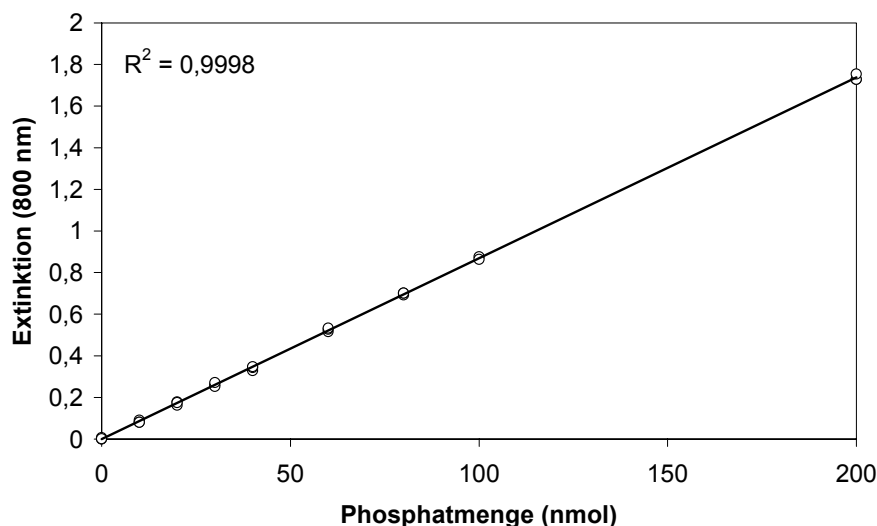


Abbildung 10: Kalibrierkurve der Phosphatbestimmung nach Bartlett

Dreifachbestimmung und Darstellung der Einzelwerte mit linearer Regression im Bereich 0-200 nmol.

Es wurde zügig gemischt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen im Wasserbad wurde die Extinktion bei 800 nm photometrisch gegen Reagenzienleerwert gemessen.

sen²⁵. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt; als Standard wurde 50 µl Phosphat-Standardlösung (siehe 2.4, 100 nmol Kaliumdihydrogenphosphat/50 µl) in Zweifachbestimmung mitgeführt. Proben, deren Extinktion jenseits des Meßbereichs des Photometers, aber innerhalb des o.a. linearen Bereichs ≤ 800 nmol Phospholipid lagen, wurden mit Leerwert verdünnt. Dies ist möglich, da der lineare Bereich der Farbreaktion über den Meßbereich des verwendeten Photometers hinausgeht und das Photometer innerhalb seines Bereichs linear mißt.

2.11.3.2. Separierung von Phosphatidylcholin mittels Festphasenextraktion

250-1300 nmol Phospholipid wurden in 1 ml Chloroform gelöst und auf eine Einmal-BondElut HF[®] NH₂-Säule 100 mg (varian, Harbor City, CA, USA) aufgetragen. Zur Entfernung der Neutrallipide wurde mit 2 ml Chloroform gespült. Phosphatidylcholin wurde mit 1,25 ml Chloroform / Methanol 7:3 (v/v) eluiert. Der Verlust an Phosphatidylcholin durch die Festphasenextraktion wurde mit PC14:0/14:0 untersucht; er beträgt je nach aufgetragener Phospholipid-Menge 6-14% (siehe 3.2.1).

2.11.3.3. Quantifizierung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin mittels RP-HPLC

Die Trennung und Quantifizierung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin erfolgte nach einer von Postle [Postle, 1987] entwickelten Methode. Die molekularen Spezies von Phosphatidylcholin werden auf einer RP18-Säule mit einer polaren mobilen Phase aus Methanol/H₂O unter Zusatz von Cholinchlorid zur Absättigung verbliebener ionischer Bindungsstellen [Patton et al, 1982] nach ihrer Hydrophobizität getrennt. Während der isokratischen Trennung bei 50 °C werden kurze ungesättigte Spezies schnell eluiert, lange und gesättigte Spezies werden länger retiniert [Postle, 1987]. Der Variationskoeffizient für die Retentionszeit der angegebenen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin liegt dabei unter 1% [Postle, 1987]. Da eine Quantifizierung über die UV-Absorption wegen der unterschiedlichen Anzahl an Doppelbindungen in den Molekülen nicht valide ist, weil die Sensitivitäten der einzelnen Phosphatidylcholin-Spezies im UV-Bereich um den Faktor 50 schwanken, wurde eine Nachsäulenderivatisierung durchgeführt.

²⁵ Nanocolor 100 D (Macherey&Nagel, Düren)

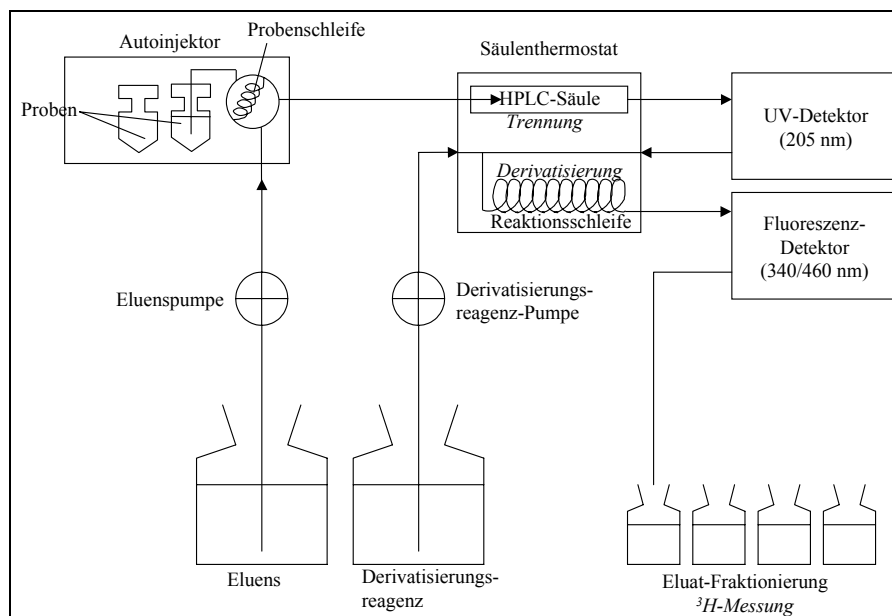


Abbildung 11: Flußdiagramm der Trennung und Detektion der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin mittels RP-HPLC

Injektionsvolumen:	10-100 μl ²⁶
Säule:	Sphere-Image-ODS 2-5 μm , 250 · 4,0 mm ID ²⁷
Flußrate: mobile Phase:	1,0 ml/min ²⁸
	Nachsäulenderivatisierung: 3,5 ml/min nach Derivatisierung ²⁹
Eluens (siehe 2.4):	925 ml Methanol, 75 ml aqua bidest., 40 mM Cholinchlorid
Derivatisierungsreagenz (siehe 2.4):	2,5 l aqua bidest., 300 μl Brij 35 (25%), 125 μl DPH- Lösung
UV-Detektion:	205 nm ³⁰
Fluoreszenzexcitation:	340 nm ³¹
Fluoreszenzemission:	460 nm
Säulentemperatur:	50 °C
Derivatisierungstemperatur:	50 °C

Tabelle 10: Bedingungen für die Trennung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin mittels RP-HPLC

²⁶ AS-2000A Autosampler, Merck Hitachi, Darmstadt

²⁷ refill-Säulen, Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef

²⁸ L-6200A Intelligent Pump, Merck Hitachi, Darmstadt

²⁹ L-6000 Pump, Merck Hitachi, Darmstadt

³⁰ L-4000UV Detector, Merck Hitachi, Darmstadt

³¹ F-1050 Fluorescence Spectrophotometer, Merck Hitachi, Darmstadt

Durch die Zumischung von DPH im Derivatisierungsreagenz bilden sich Mizellen. Die Fluoreszenzemission bei gleicher Stoffmenge wurde von Postle für ausgewählte Spezies im Bereich von 1-10 nmol Substanz untersucht. Bezogen auf PC16:0/16:0 (100%) betrug die relative Fluoreszenzemission von PC12:0/12:0, PC14:0/14:0 und PC16:0/18:1 80%, 94% und 101% [Postle, 1987]. In Phosphatidylcholin aus Rattenleber und Rattenlunge wurde eine lineare Korrelation zwischen Stoffmenge und Fluoreszenzemission verschiedener molekularer Spezies von Phosphatidylcholin gefunden [Postle, 1987]. Der Aufbau der HPLC ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Tabelle 10 gibt die Bedingungen für die Trennung der molekularen Spezies von PC mittels RP-HPLC an.

Abbildung 12 zeigt das UV- und Fluoreszenz-Chromatogramm einer Trennung von Phosphatidylcholin-Spezies aus Rattenlungengewebe. Die unterschiedliche Signalintensität der beiden Detektionssysteme ist an dem disaturierten PC16:0/16:0 (Peak 7) und dem hochungesättigten PC16:0/20:4 (Peak 4) zu erkennen. Zur Identifizierung der Peaks wurde die Literatur [Postle, 1987; Bernhard et al, 1995] herangezogen. Allerdings hat jede Art von Probe (Lungengewebe, IZS, alveolärer Surfactant) einen „Fingerprint“, der das Zuordnen der einzelnen Spezies erleichtert. Bei dem verwendeten Trennverfahren schwankt die Retentionszeit schon bei geringfügigen Änderungen in der Zusammensetzung des Eluens [Postle, 1987] und mit dem Alter der Trennsäule. Aus diesem Grund konnten für die Retentionszeiten keine Absolutwerte angegeben werden. Die in Tabelle 11 angegebenen relativen Retentionszeiten beziehen sich auf PC16:0/16:0. Die relative Retentionszeit eines Peaks $T_{rt,rel}^{Peak}$ ergibt sich aus seiner absoluten Retentionszeit $T_{rt,abs}^{Peak}$ und der absoluten Retentionszeit von DPPC $T_{rt,abs}^{DPPC}$ nach

$$T_{rt,rel}^{Peak} = \frac{T_{rt,abs}^{Peak}}{T_{rt,abs}^{DPPC}} \cdot$$

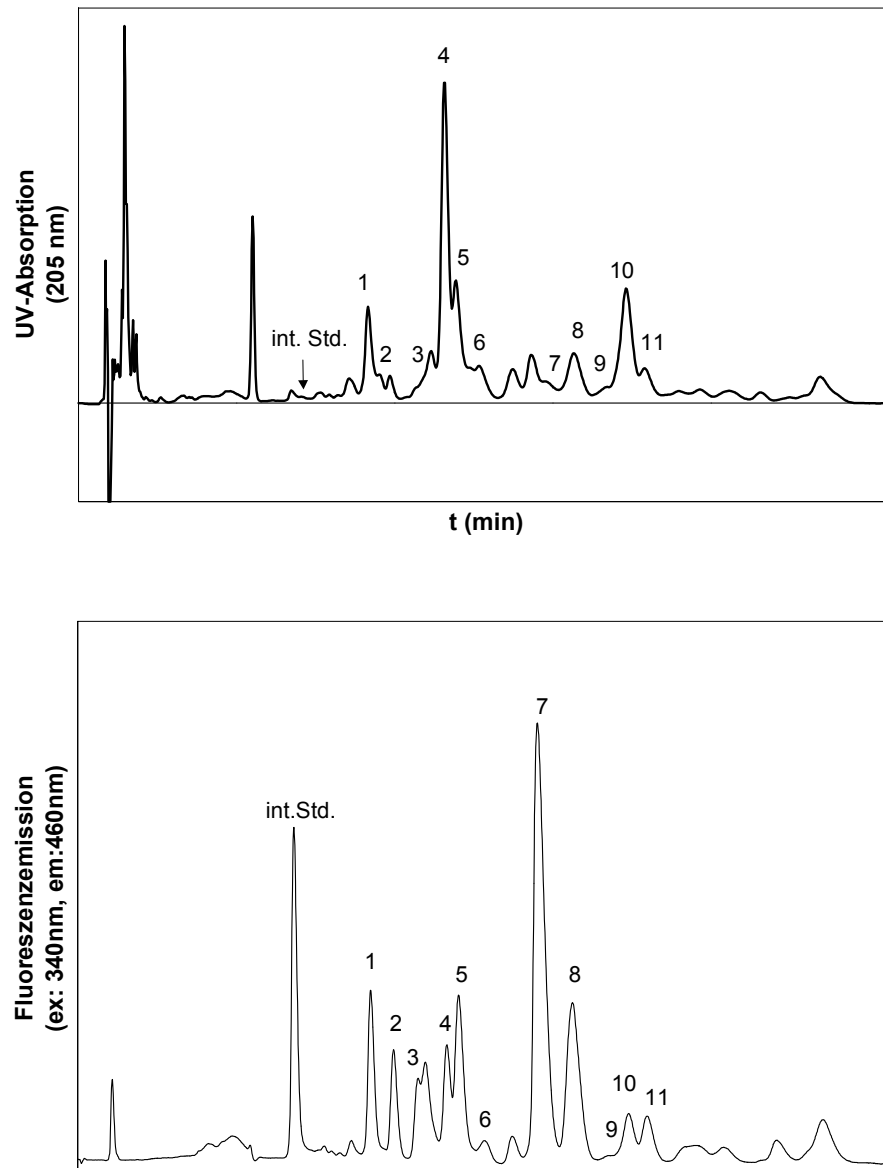


Abbildung 12: UV- und Fluoreszenz-Chromatogramm der Trennung der PC-Spezies aus Lungengewebe einer Ratte

Die Zuordnung der Peaks ergibt sich aus Tabelle 11.

Um nicht nur die relative Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin, sondern auch die absolute Stoffmenge jeder Spezies in den untersuchten Phospholipid-Proben bestimmen zu können, wurde den organischen Extrakten vor der Separierung von Phosphatidylcholin eine definierte Menge interner Standard an PC14:0/14:0 zugesetzt. Da die Fluoreszenzemission bei gleicher Stoffmenge kaum von der untersuchten Spezies abhängt [Postle, 1987], läßt sich aus dem Verhältnis der Peakflächen von Standard und individueller Spezies die Stoffmenge dieser Substanz bestimmen (siehe Anhang).

Nr.	Substanz	T _{rt, rel}	Relativer Fehler (%)
i. Std.	PC14:0/14:0	0,469 ± 0,004	0,8
1	SPH	0,630 ± 0,005	0,8
2	PC16:0/14:0	0,687 ± 0,004	0,5
3	PC16:0/16:1 ³²	0,75 ± 0,01	1,1
4	PC16:0/20:4	0,801 ± 0,002	0,2
5	PC16:0/18:2	0,828 ± 0,002	0,3
6	PC18:1/18:2	0,89 ± 0,01	1,6
7	PC16:0/16:0	1	
8	PC16:0/18:1	1,075 ± 0,002	0,2
9	PC18:1/18:1	1,15 ± 0,01	0,7
10	PC18:0/20:4	1,20 ± 0,01	0,4
11	PC18:0/18:2	1,24 ± 0,01	0,6

Tabelle 11: Relative Retentionszeiten der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin in der RP-HPLC

Die relativen Retentionszeiten wurden aus Chromatogrammen von zehn verschiedenen Analysentagen ermittelt. Angegeben sind MW ± SD und der relative Fehler SD/MW·100. n = 10

Die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurde aus folgenden Proben bestimmt:

- Lungengewebe
- Intrazellulärer Surfactantpool (IZS)
- Alveolärer Surfactantpool (BALF)
- Rohsurfactant
- Plasma
- Peritonealleukozyten

Die Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies von alveolärem und intrazellulärem Surfactantpool sollte mögliche Veränderungen in der Surfactanthomöostase und - in Verbin-

³² Nach PC16:0/16:1 werden in diesem Doppelpeak eine weitere unbekannte Substanz und geringe Mengen PC 16:0/22:6 eluiert.

derung mit den Markierungsstudien mit ^3H -Cholin - im intrazellulären Transport aufzeigen. Bei diesen Einbaustudien kann aus der Zusammensetzung und dem spezifischen Einbau in die Lungen-Phosphatidylcholin-Spezies eine Aussage über die Synthese getroffen werden. Plasma und Peritonealleukozyten wurden analysiert, um festzustellen, ob die gefundenen Veränderungen in der BALF und im Lungengewebe durch Plasmainflux oder Einwanderung von Entzündungszellen zu erklären sind. Rohsurfactant wurde im Rahmen der Etablierung einer Methode zur Reinigung von IZS untersucht, um Kontaminationen durch Gewebephospholipide festzustellen.

Aus BALF, IZS, Rohsurfactant und Lungengewebe wurde zur Präparation von Phosphatidylcholin ein organischer Extrakt eingesetzt wie unter 2.11.1 beschrieben. Blutproben wurden durch die Punktion der Vena cava inferior gewonnen. Da die Tiere mit der Narkose 1000 I.E. Liquemin injiziert bekommen hatten, wurde auf eine weitere Vorsorge zum Gerinnungsschutz verzichtet. Die Proben wurden zur Entfernung der Zellen zentrifugiert (1800 g, 10 min, Raumtemperatur³³, Zentrifugation des nahezu erythrozytenfreien Plasmas bei 10000 g, 1 min, Raumtemperatur³⁴) und bei -80 °C gelagert. Je Probe wurden 1000 I.E. Urokinase / ml (Urokinase HS medac, Hamburg) zugesetzt und bei 39 °C wurde 40 min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, um Fibrinfäden aufzulösen. Je 500 µl Plasma wurden nach Bligh und Dyer extrahiert und das enthaltene Phosphatidylcholin nach Zugabe von 100 nmol PC14:0/14:0 als interner Standard über NH_2 -Säulen von den restlichen Phospholipiden getrennt. Zur Gewinnung von polymorphkernigen Granulozyten aus dem Peritoneum von Ratten wurde eine von Barnard [Barnard et al, 1993] beschriebene Methode angewandt. Den Tieren wurde eine von 3 ml/100 g KGW einer 2%igen Casein-Lösung in PBS^- (Apotheke der MHH) intraperitoneal gespritzt. 16 h später wurde die Peritonealhöhle in 7,5 ml-Portionen mit PBS^- (Apotheke der MHH) lavagiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (500 g, 10 min, 4 °C³⁵) und das Zellpellet zur Erythrozytenlyse mit 1 ml 0,2% NaCl und 15 sec später mit dem gleichen Volumen 1,6 NaCl versetzt. Nach der Entfernung der lysierten roten Blutkörperchen (500 g, 10 min, 4 °C) wurden die Leukozyten mit 2 ml NaCl resuspendiert und die Zahl und Zusammensetzung der Zellen bestimmt (siehe 2.13.2 und 2.13.4). Es konnten $6,5 \cdot 10^7$ - $8,9 \cdot 10^7$ Zellen in einer Reinheit von $88 \pm 10\%$ ($n = 3$) gewonnen werden. Die Zellen wurden

³³ Labofuge Ae, Heraeus Sepatech

³⁴ Hettich Mikroliter, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

³⁵ Präparative Kühlzentrifuge Modell J-6, Beckman Instruments GmbH, München

extrahiert und für die RP-HPLC-Analytik der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin vorbereitet (siehe 2.11.3.2 und 2.11.3.3).

2.11.4. Bestimmung der ^3H -Markierung

Die Markierung mit ^3H -Cholin wurde in den molekularen Phosphatidylcholin-Spezies von Lungengewebe, IZS und BALF bestimmt. Die ^3H -Aktivität wurde in einem 2000 CA TriCarb Liquid Szintillation Analyzer (Packard, Groningen, Niederlande) unter Verwendung von LumaSafeTM Plus (Lumac*LSC, Groningen, Niederlande) als mit Wasser mischbarem Flüssigszintillator gemessen. Es wurden Szintillationsgefäße mit einem Füllvolumen von 5 bzw. 20 ml (Packard, Groningen, Niederlande) verwendet. Die spezifische Aktivität der einzelnen Phosphatidylcholin-Spezies wurde aus dem HPLC-Eluat bestimmt. Organischen Phospholipid-Extrakten und dem HPLC-Eluat der manuell fraktionierten Phosphatidylcholone wurde vor der Zugabe der Szintillationslösung im Szintillationsgefäß das Lösungsmittel entzogen. Perfusatproben und HPLC-Eluat, welches mit dem Fraktionssammler gesammelt wurde, wurden direkt mit Szintillator versetzt. Alle Proben wurden nach der Zugabe des Szintillators kräftig geschüttelt.

Probe	Szintillator- volumen	dpm	cpm	Wirkungs- grad
200 µl Perfusat	3 ml	12935	4600	0,36
Phospholipide (lösungsmittelfrei)	3 ml	12935	5300	0,41
1,66 ml HPLC-Eluat	3 ml	32173	8300	0,26
1-24 ml HPLC-Eluat (nach Entfernung des Lösungsmittels und Zusatz von 2,5 ml aqua bidest und 1 ml Methanol)	10 ml	29500	9600	0,33
10 µl Tris/HCl	3 ml	105400	8400	0,08

Tabelle 12: Quantenausbeute bei der Messung von ^3H -Aktivität in verschiedenen Proben

Die Quantenausbeute wurde für jede dieser Aufarbeitungsmethoden bestimmt. Nicht markierten Proben gleicher Zusammensetzung wurden mit einer definierten Aktivität an ^3H -Hexadecan versetzt und im 2000 CA TriCarb analysiert. Diese Analysen wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt und jeweils 10 min gezählt. Es wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Quantenausbeuten errechnet. Da die Analysen der Proben über einen Zeitraum von nahezu 2 Jahren erfolgten, nahm die Aktivität des eingesetzten Cholins bei einer Halbwertszeit

von 12,346 Jahren innerhalb dieses Zeitraums um fast 10% ab. Dies wurde bei allen Ergebnissen aus Szintillationsmessungen rechnerisch korrigiert.

2.11.5. Proteinbestimmung nach Lowry [Lowry et al, 1951]

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine Erweiterung der Biuret-Methode. Im ersten Schritt kommt es in alkalischer Lösung zur Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes. Diesen Komplex reduziert in einer zweiten Reaktion ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz), was zu einer tiefblauen Färbung führt.

Die Proteinbestimmung nach Lowry wurde mit dem D_C Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in Mikrotiter-Platten (Dynatech, Denkendorf) durchgeführt. Es wurde pro Mikrotiterplatte eine Kalibrierung in Dreifachbestimmung im Bereich von 0,025 bis 1,5 mg/ml mit BSA der Fraktion V (Sigma, Steinheim) durchgeführt (siehe Abbildung 13); die Analyse der Proben erfolgte in Zwei- bzw. Dreifachbestimmung. Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, daß die Kalibrierkurve bis zu einer BSA-Konzentration von 1,0 mg/ml linear ist. Da bei diesem Test nicht, wie bei der Phosphatbestimmung, das Photometer gegen den Reagenzienleerwert abgeglichen werden konnte, wurde die Extinktion des Reagenzienleerwertes bei der Konzentration 0,0 mg/ml in die Kurve eingetragen und die Konzentration der Proben aus der Geradengleichung der Regressionsgerade berechnet.

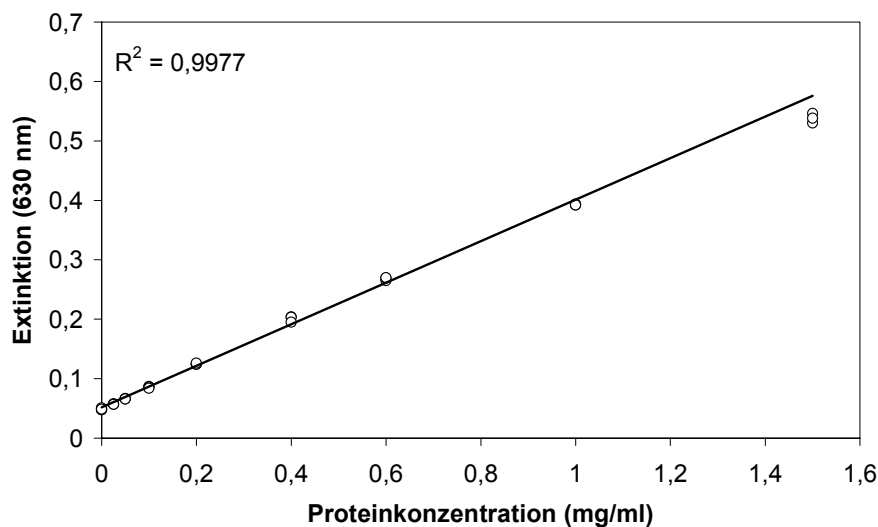


Abbildung 13: Kalibrierkurve der Proteinbestimmung nach Lowry

Es wurden Kalibrierlösungen mit einer BSA-Konzentration von 0,025 – 1,5 mg/ml verwendet. Einzelmessungen in Dreifachbestimmung. Dargestellt sind Einzelwerte und lineare Regression von 0-1 mg/ml.

Je well wurden 25 µl 1% SDS-Lösung vorgelegt. 25 µl Kalibrierlösung, 25 µl Proteinlösung bzw. 25 µl aqua bidest als Leerwert wurden dazugegeben. Nach kurzen Schütteln wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Lösung A* (5 ml Lösung A³⁶ / 100 µl Lösung S³⁷) hinzugegeben und vermischt. Es wurde nochmals 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Schütteln wurden 200 µl Lösung B³⁸ zugesetzt und nach Schütteln die Extinktion bei 620 nm im Elisa-Reader³⁹ gemessen. Eine Inkubationszeit von 45 min führte zu einer Verringerung der Extinktion um ca. 20%.

2.12. Funktionelle Surfactantanalytik

Die funktionelle Surfactantanalytik basiert auf der von Enhorning entwickelten Technik der pulsierenden Blase [Enhorning, 1977]. Sie wurde mit einem Pulsating Bubble Surfactometer (Electronetics Corporation, Tonawanda, New York, USA) durchgeführt. Der Aufbau der Meßapparatur ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt. Sie besteht aus einer im Wasserbad temperierbaren Küvette, die mit der Probenlösung befüllt wird, einer hydraulischen Pumpe und einem Druckabnehmer. In der Surfactantemulsion wird eine Luftblase erzeugt, deren Größe von der Pumpe zyklisch verändert wird. Bei einer Volumenänderung von 0,43 µl pro Zyklus ändert sich der Radius der Blase von 0,55 mm auf 0,4 mm und ihre Oberfläche von 3,6 mm² auf 1,8 mm². Der Druckabnehmer mißt den Druck während dieses Vorgangs und ein angeschlossener Computer errechnet nach dem Gesetz von LaPlace

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$$

aus dem Blasenradius r und dem Druck P die Oberflächenspannung γ der Probenlösung. Die Luftblase in der Küvette wird während der Messung durch ein Mikroskop beobachtet, in dem der minimale und maximale Blasendurchmesser eingezeichnet ist, und über eine Stell-schraube kann der Radius, falls nötig, korrigiert werden.

³⁶ Alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung

³⁷ Detergenz-Lösung

³⁸ Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz

³⁹ Easy Reader EAR 400 AT, SLT-Labinstruments, Grödig, Österreich

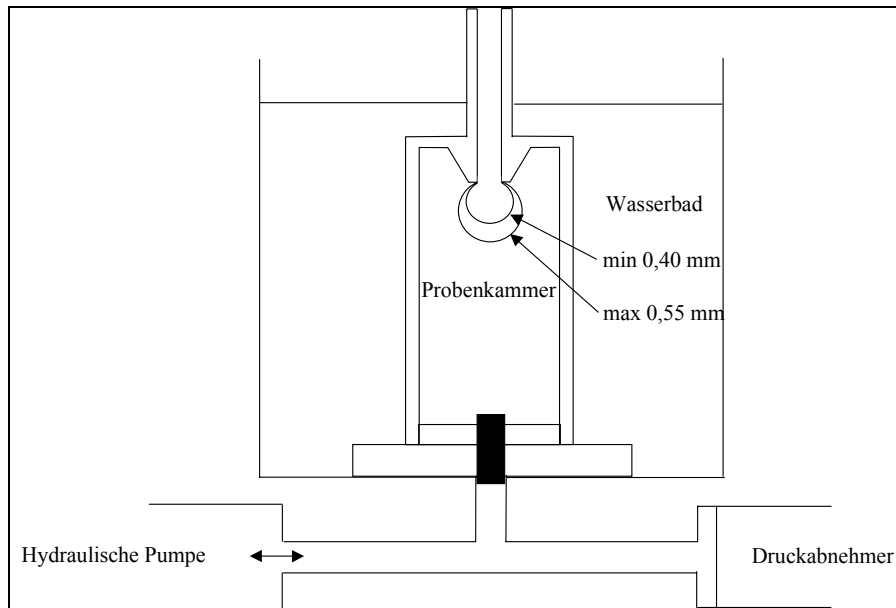


Abbildung 14: Aufbau des Pulsating Bubble Surfactometer zur Bestimmung der dynamischen Oberflächenaktivität von Surfactantpräparationen

2.12.1. Vorbereitung der Proben

Die funktionelle Surfactantanalytik wurde verwendet zur Charakterisierung von IZS aus Schweinelungengewebe im Vergleich mit Surfactant aus BALF vom Schwein. Hierfür wurden sowohl der BALF-Surfactant als auch der aus dem Lungengewebe gewonnene Surfactant mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation gereinigt (siehe 2.10.2).

Die Oberflächenaktivität wurde weiterhin bei BALF-Surfactant von hyperoxiegeschädigten und Kontrollratten bestimmt. Die Lavagen wurden zur Sedimentierung des Surfactant 1 h bei 80000 g zentrifugiert (siehe 2.9.2).

Zur Emulgierung des erhaltenen Surfactantpellets wurde 1,5 mM CaCl_2 / 154 mM NaCl (siehe 2.4) verwendet. Um die hohe Phospholipid-Konzentration zu erzielen, die für die funktionelle Surfactantanalytik notwendig ist, wurde das Zentrifugenglas mit mehreren Portionen von 10-50 μl dieser Lösung sorgfältig gespült, bis keine Bläschenbildung – als Anzeichen für oberflächenaktive Substanzen - mehr zu beobachten war. Es wurden 2 · 5 μl Emulsion für die Bestimmung der Phospholipid-Konzentration entnommen und der Surfactant bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

2.12.2. Durchführung der Messung

Zur Messung der Oberflächenspannung wurde die Surfactanemulsion mit 1,5 mM CaCl_2 / 154 mM NaCl (siehe 2.4) auf eine Phospholipid-Konzentration von 4 $\mu\text{mol/ml}$ und 1,33 $\mu\text{mol/ml}$ verdünnt. Zunächst wurde die Probe mit der höheren Phospholipid-Konzentration verarbeitet. Sie wurde gut durchmischt, im Wasserbad 5 min auf 37 °C vortemperiert und in die Küvette gegeben. Die befüllte Küvette wurde im Pulsating Bubble Surfactometer plaziert und nach dem Einstellen des minimalen Blasenradius weitere 5 min bei 37 °C Wasserbadtemperatur inkubiert. Mit dem Starten der Messung wurde vom Gerät automatisch die folgende Sequenz eingeleitet. Die Surfactanemulsion wurde durch Vermindern des Kammervolumens in den „Kamin“ der Küvette gedrückt, so daß die Luftblase verschwand. Nach 10 s wurde die Blase durch Vergrößern des Kammervolumens wiederhergestellt und die statische Adsorption des Surfactants über einen Zeitraum von 10 sec. gemessen. Anschließend pulsierte die Luftblase zwischen dem minimalen und maximalen Radius mit einer Frequenz von 20/min bis zum Stoppen der Messung nach 5 min. Der angeschlossene Computer berechnete aus den Meßwerten die minimale und maximale Oberflächenspannung für jeden Pulsationszyklus. Nach dieser ersten Messung wurde die Probe in der Küvette belassen, nochmals 5 min inkubiert und ein zweites Mal analysiert. Nach der zweiten Messung wurde die Probe aus der Küvette entfernt.

Da Phospholipide an das Material der Küvette binden können und sich die Phospholipid-Konzentration in der Probe dadurch vermindert, wurde immer zuerst die höher konzentrierte Probe einer Surfactanemulsion analysiert, weil die Phospholipid-Konzentration sich durch dieses Phänomen in verdünnteren Proben stärker ändert. Anschließend wurde dieselbe Surfactanemulsion mit niedrigerer Phospholipid-Konzentration in der gleichen Küvette analysiert, da unspezifische Bindungsstellen jetzt besetzt waren und die Konzentration sich deshalb nicht mehr änderte. Die Küvette wurde nach dem Entfernen der konzentrierteren Probe zweimal mit 1,5 mM CaCl_2 / 154 mM NaCl gespült und mit der weniger konzentrierten Probe gefüllt. Auch diese Probe wurde wie oben beschrieben zweimal gemessen. Für die nächste Surfactanemulsion wurde eine saubere Küvette verwendet.

2.13. Histologie

2.13.1. Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Lungenschnitte

Je Lungenpräparat wurden zwei Schnitt aus dem linken oberen Lungenlappen auf ED-1 und BrdU angefärbt. In jeweils einem dieser Schnitte wurde die Anzahl an positiven Zellen in 11 Abschnitten ($500 \mu\text{m} \cdot 500 \mu\text{m}$) ausgezählt. Da die Zahl der angefärbten Zellen in den verschiedenen Gewebekomponenten unterschiedlich war, wurde darauf geachtet, daß in den ausgezählten Abschnitten nur alveoläres Gewebe vorhanden war.

2.13.2. Bestimmung der Zellzahl in bronchoalveolärer bzw. peritonealer Lavageflüssigkeit

Das aus der Zentrifugation der BALF gewonnene Zellpellet (siehe 2.9.2) wurde in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Nach Auszählung der Zellen Z in einer Neubauer-Kammer ergab sich die Gesamtzellzahl Z_{Zellen} nach

$$Z_{Zellen} = \frac{Z}{0,1 \mu l} * 20000 \mu l$$

2.13.3. Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde durch Ausschluß von Trypan-Blau bestimmt. 50 μl Zellsuspension (siehe 2.13.2) wurden mit 50 μl Trypan-Blau-Lösung versetzt und nach Durchmischung in der Thoma-Kammer untersucht. An 100-400 Zellen wurde der Anteil an Zellen bestimmt, deren Zellkern nicht durch den Farbstoff angefärbt wurde.

2.13.4. Herstellung von Zytospots aus bronchoalveolären bzw. Peritoneal-Lavagen

Zur Herstellung von Zytospots wurden je nach Zellzahl 25-100 µl Zellsuspension (ca. 10^5 Zellen) auf einen Objektträger zentrifugiert (500 UpM, 5 min, Raumtemperatur⁴⁰). Die Präparate wurden luftgetrocknet und bis zur Färbung in Aluminiumfolie eingewickelt bei -20 °C gelagert.

2.13.5. Panoptische Zellfärbung nach Pappenheim

Die luftgetrockneten Zellpräparate (siehe 2.13.4) wurden 3 min mit Eosin-Methylenblau-Lösung nach May-Grünwald (Merck, Darmstadt) überschichtet. Die Gegenfärbung erfolgte mit 1:10 (v/v) verdünnter Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) [Burck, 1988].

2.13.6. Differenzierung der BALF-Zellen

Zur Differenzierung wurden nur Präparate mit hinreichend niedriger Zelldichte verwendet. Die Zellen wurden bei 400facher Vergrößerung aufgrund der Größe, Granularität, Form und Farbe von Cytoplasma und Nukleus charakterisiert [Costabel, 1994; Rick, 1990].

2.14. Statistische Auswertung der Daten

Die Größe der Versuchsgruppen war mit 5-8 Tieren gering. Aus diesem Grund konnte nicht festgestellt werden, ob die Meßwerte normalverteilt sind. Deshalb wurde die statistische Auswertung aller Daten mit Ausnahme der Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies mit dem nicht parametrischen Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Es wurden folgende Signifikanzniveaus angegeben:

⁴⁰ Cytospin 2, Shandon Southern Products Ltd, Astmoor, Cheshire, England

$p < 0,05$	*
$p < 0,01$	**
$p < 0,001$	***
$p < 0,0001$	****

Bei der Auswertung der Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin zeigte sich in einer Hauptfaktorenanalyse, daß die einzelnen Spezies nicht linear unabhängig voneinander sind. Dies galt sowohl für die prozentuale Zusammensetzung als auch für die Stoffmenge der einzelnen Substanzen. Aus diesem Grund wurde hierfür eine multivariate Analyse durchgeführt. Angegeben wurde jeweils Wilks' Lambda. Dieser kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Werte nahe 1 zeigen, daß der Unterschied zwischen den Gruppen gering ist; je mehr sich der Wert 0 nähert, desto größer ist der Unterschied zwischen den Gruppen.

Der Beitrag jeder einzelnen Phosphatidylcholin-Spezies zur Varianz zwischen den Gruppen wurde aus dem p-Wert der multivariaten Analyse ermittelt. Es entspricht

$p < 0,05$	†	geringer Anteil an der Varianz zwischen den Gruppen
$p < 0,01$	††	mittlerer Anteil an der Varianz zwischen den Gruppen
$p < 0,001$	†††	großer Anteil an der Varianz zwischen den Gruppen.

3. ERGEBNISSE

Teil A - Methodenetablierung

3.1. Isolierung von intrazellulär gespeichertem Surfactant

Um die Surfactanthomöostase und den Surfactantmetabolismus detailliert untersuchen zu können, sollten sowohl der sezernierte alveoläre Surfactantpool als auch der intrazellulär gespeicherte Surfactantpool (IZS) und das Lungengewebe analysiert werden. Während der alveoläre Surfactant in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) sehr rein vorliegt, muß der intrazelluläre, in Lamellarkörperchen gespeicherte Surfactant [van Golde et al, 1987] zunächst aus dem Lungengewebe freigesetzt werden und von Gewebekontaminanten befreit werden. Kriterien für die Auswahl einer Methode für diesen Reinigungsprozeß waren neben hoher Ausbeute und Reinheit auch die Präparationsdauer, da die Reinigung des Materials im Anschluß an die isolierte Lungenperfusion erfolgen sollte.

Die von Duck-Chong [Duck-Chong, 1978] beschriebene Methode der Präparation von Lamellarkörperchen aus Lungengewebe und Amnionflüssigkeit beruht auf der Separierung dieser Organellen aufgrund ihrer Dichte von $1,085 \text{ g/cm}^3$ [Shelley et al, 1977]. Nach dem Aufschluß des Gewebes und der Abtrennung fester Bestandteile mittels Filtration durch Gaze schichtete er über die Probe Sucroselösungen mit einer Konzentration von 0,8 M bis 0,2 M. Während einer dreistündigen Ultrazentrifugation bei 80000 g trieben die Lamellarkörperchen bis zu einer Dichte von 0,4-0,5 M Sucrose auf und können auf diese Weise von Zellbestandteilen höherer Dichte getrennt werden.

Von Shelley wurde eine Methode zur Reinigung von Surfactant aus BALF [Shelley et al, 1977] und humanem Lungengewebe [Shelley et al, 1982] mittels diskontinuierlicher NaBr-Dichtegradientenzentrifugation beschrieben, die auf demselben Prinzip basiert. Da bei dieser Methode jedoch ein Gradient aus nur drei Schichten statt wie bei Duck-Chong 7 Schichten [Duck-Chong, 1978] verwendet wird, ist die Durchführung wesentlich vereinfacht. Auch wurde die Zentrifugationszeit auf 2 h bei 116000 g beschränkt. Raymondos erweiterte dieses Verfahren um einen Zentrifugationsschritt im Anschluß an die Dichtegradientenzentrifugati-

on. Hierdurch werden die für die funktionelle Surfactantanalytik nötigen Phospholipidkonzentrationen von 4 $\mu\text{mol/ml}$ erreicht [Raymondos et al, 1996].

Der leichten und schnelleren Durchführbarkeit wegen wurde in dieser Arbeit die Methode von Shelley eingesetzt. Analog der Arbeit von Raymondos wurde der erhaltene Surfactant anschließend pelletiert und in einem kleinen Volumen reemulgiert, um die funktionelle Surfactantanalytik bei entsprechenden Phospholipidkonzentrationen durchführen zu können. Die Methode zur Gewinnung des IZS wurde an lavagiertem Lungengewebe vom Schwein optimiert, um sicherzustellen, daß es sich bei dem gesamten gewonnenen Material um die Speicherform handelt. Es wurde Schweinelungengewebe gewählt, weil es vom Schlachthof Hannover in großen Mengen kostenlos erhältlich war. Das Lungengewebe wurde mit physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Aus der BALF wurde nach Abtrennung der Zellen der Surfactant pelletiert und über eine Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Der Surfactant aus der BALF und das lavagierte Lungengewebe wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.1. Auswahl einer Methode zur Homogenisierung des Lungengewebes

Der erste Schritt bei der Gewinnung von IZS besteht aus einem Aufschluß der Zellen durch Homogenisierung des Gewebes, wodurch die Lamellarkörperchen freigesetzt werden. Während dieser Arbeitsschritt mit einem ULTRA-TURRAX[®] schnell und effektiv durchgeführt werden kann, wird beim Zerschneiden des Gewebes mit einer Schere mit erheblich größerem Zeitaufwand weniger Material freigesetzt (siehe 3.1.1.1).

Als Maßstab für die Ausbeute wurde die gewonnene Phospholipidmenge als Hauptbestandteil des Surfactant bestimmt. Die Reinheit wurde anhand

1. der Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies,
2. des Verhältnisses von Phosphatidylcholin zu Phospholipid (PC/PL-Verhältnis),
3. des Verhältnisses von Phospholipid zu Protein (PL/Protein-Verhältnis) und
4. des Verhältnisses von Phosphatidylcholin zu Sphingomyelin (PC/Sphingomyelin-Verhältnis)

bestimmt. Die Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies, das PC/PL-Verhältnis und das PL/Protein-Verhältnis werden in der Literatur zur Charakterisierung des gewonnenen Surfactants und seiner Reinheit herangezogen [Baritussio et al, 1981; Shelley et al, 1982; Nijssen et al, 1987; Schlame et al, 1988]. Das PC/Sphingomyelin-Verhältnis wurde als weiteres Kriterium zur Bewertung der Reinheit des IZS herangezogen, da Sphingomyelin in BALF nur in geringer Konzentration enthalten ist, in Lungengewebe jedoch in großen Mengen. Die ersten beiden Kriterien spielten für die Metabolismusstudien nach hyperoxischem Lungenschaden die größte Rolle, da der Einbau von ^3H -markiertem Cholin in die einzelnen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin im Surfactant bestimmt werden sollte und eine Verunreinigung mit Membranphospholipiden zu falschen Ergebnissen führen würde.

3.1.1.1. Phospholipidausbeute

Abbildung 15 zeigt die Ausbeute an Phospholipid während der Reinigung von IZS. Während der drei Zentrifugationsschritte zur Gewinnung des Rohsurfactants, der surfactanthaltigen Bande im Dichtegradienten und des gereinigten IZS werden 86% bzw. 90% der Phospholipide abgetrennt. Die Ausbeute an Surfactantphospholipid ist nach der Homogenisierung durch einen ULTRA-TURRAX[®] höher als nach Verwendung einer Schere.

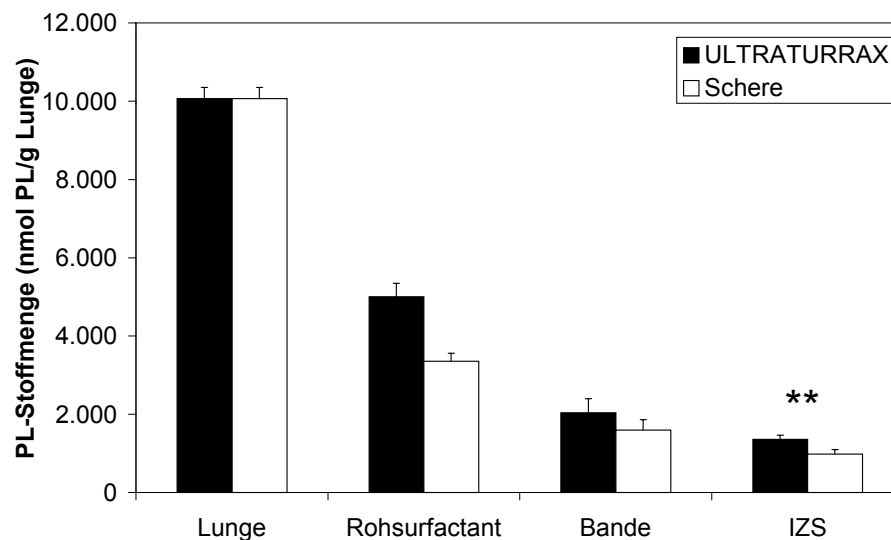


Abbildung 15: Phospholipidausbeute bei der Reinigung von IZS aus lavagiertem Lungengewebe

Aus dem organischen Extrakt von Lungengewebe, Rohsurfactant (siehe 2.10.1), surfactanthaltiger Bande (siehe 2.10.2) und IZS (siehe 2.10.2.1) wurde die Phospholipid(PL)-Konzentration nach Bartlett ermittelt. Daten sind Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD), n = 5/6. Signifikanz: ** p < 0,01.

3.1.1.2. Verminderung des Anteils nicht surfactanttypischer Zellbestandteile

Alveolärer Surfactant besitzt im Gegensatz zu Lungengewebe einen hohen Anteil von Phosphatidylcholin an den Phospholipiden, ein hohes PL/Protein-Verhältnis [Baritussio et al, 1981; Schlame et al, 1988] und ein hohes PC/Sphingomyelin-Verhältnis (siehe Tabelle 13). Diese Parameter sind demnach für eine Aussage über die Reinheit des gewonnenen Surfactant geeignet.

Fraktion	Anteil PC von PL (%)	PC/Sphingomyelin-Verhältnis (nmol/nmol)	PL/Protein-Verhältnis (µmol/mg)
BALF	85 ± 4	530 ± 150	11,3 ± 0,1
Lungengewebe	36 ± 3	8 ± 1	
Rohrsurfactant (ULTRA-TURRAX®)	34 ± 3	11 ± 1	0,087 ± 0,005
Rohrsurfactant (Schere)	35 ± 3	19 ± 3	0,066 ± 0,003
IZS (ULTRA-TURRAX®)	64 ± 4	72 ± 6	8,7 ± 1,1
IZS (Schere)	72 ± 6	140 ± 20	7,4 ± 1,0

Tabelle 13: Verminderung der Menge an Proteinen und nicht surfactanttypischen Phospholipiden bei der Präparation von IZS aus laviertem Lungengewebe

Aus Lungengewebe, Rohrsurfactant, IZS und BALF wurde die Proteinkonzentration nach Lowry und die Phospholipid-Stoffmenge im organischen Extrakt nach Bartlett bestimmt. Das PC/PL-Verhältnis wurde mittels Zugabe des internen Standards PC14:0/14:0 bei der RP-HPLC der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin rechnerisch ermittelt (siehe Formelanhang, Formel 12); das PC/Sphingomyelin-Verhältnis ergab sich aus dem Formelanhang nach Formel 14. Daten sind MW ± SD, n = 4-6.

Der Anteil von Phosphatidylcholin am Gesamtphospholipid ist in beiden Rohrsurfactants gleich und identisch mit dem des Lungengewebes (siehe Tabelle 13). Im aufgereinigten IZS ist der Anteil an Phosphatidylcholin dagegen wesentlich höher und dem der BALF angenähert. Auch im IZS besteht hinsichtlich dieses Parameters kein Unterschied zwischen den beiden Homogenisierungsmethoden. Das PC/Sphingomyelin-Verhältnis ist sowohl im Lungengewebe als auch im Rohrsurfactant niedrig (siehe Tabelle 13). Nach der Dichtegradientenzentrifugation hingegen zeigt das höhere PC/Sphingomyelin-Verhältnis die Anreicherung surfactanttypischer Bestandteile und die partielle Entfernung von Sphingomyelin im IZS an. Der durch Homogenisierung mit der Schere gewonnene IZS hat ein höheres PC/Sphingomyelin-Verhältnis als der mit dem ULTRA-TURRAX® präparierte. Wie aus dem vergleichbaren PC/PL-Verhältnis ersichtlich wird, ist dies jedoch im wesentlichen auf einen erhöhten Anteil des Membranbestandteils Sphingomyelin zurückzuführen.

Nach der Abtrennung der Zellen aus dem Lungenhomogenat ist das PL/Protein-Verhältnis niedrig. Die Abtrennung eines Großteils der Proteine in der Dichtegradientenzentrifugation führt zu einer Erhöhung dieses Parameters im IZS (siehe Tabelle 13) und damit zu einer Angleichung an den Surfactant aus der BALF.

3.1.1.3. Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin

Die Zusammensetzung der disaturierten und einfach ungesättigten Phosphatidylcholin-Spezies im Rohsurfactant und im IZS ist in Abbildung 16a im Vergleich zu BALF und Lungengewebe dargestellt. Abbildung 16b zeigt die Zusammensetzung der mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholin-Spezies in diesen Fraktionen. Charakteristisch für BALF ist ein sehr hoher Anteil an Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, PC16:0/16:0, siehe Tabelle 2); weitere Hauptbestandteile sind Palmitoylmyristoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/14:0), Palmitoylpalmitoleoyl-Phosphatidylcholin (PC16:0/16:1) und Palmitoyloleoyl-Phosphatidylcholin (POPC, PC16:0/18:1). Nahezu 80% des Phosphatidylcholins der Lavageflüssigkeit besteht aus diesen molekularen Spezies (siehe Abbildung 16a). Lungengewebe dagegen enthält sehr viel weniger PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1, aber einen vergleichbaren Anteil an PC16:0/18:1. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen BALF und Lungengewebe besteht im Anteil an Phosphatidylcholin-Spezies mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (siehe Abbildung 16b). Phosphatidylcholin aus BALF enthält einen viel geringeren Anteil an linolsäure(18:2)- und arachidonsäure(20:4)haltigen Spezies als Lungengewebe. Der mit dem ULTRA-TURRAX[®] gewonnene Rohsurfactant enthält sehr viel mehr dieser Gewebekontaminanten (PC16:0/20:4, PC18:0/20:4 und PC18:0/18:2) und weniger PC16:0/16:0 als der mit der Schere gewonnene (siehe Abbildung 16b). Nach der präparativen Aufreinigung des IZS ist sowohl der Anteil der surfactanttypischen Phosphatidylcholin-Spezies als auch der Anteil an linolsäure- und arachidonsäurehaltigen Spezies nach beiden Homogenisierungsverfahren nahezu identisch und mit demjenigen der BALF vergleichbar.

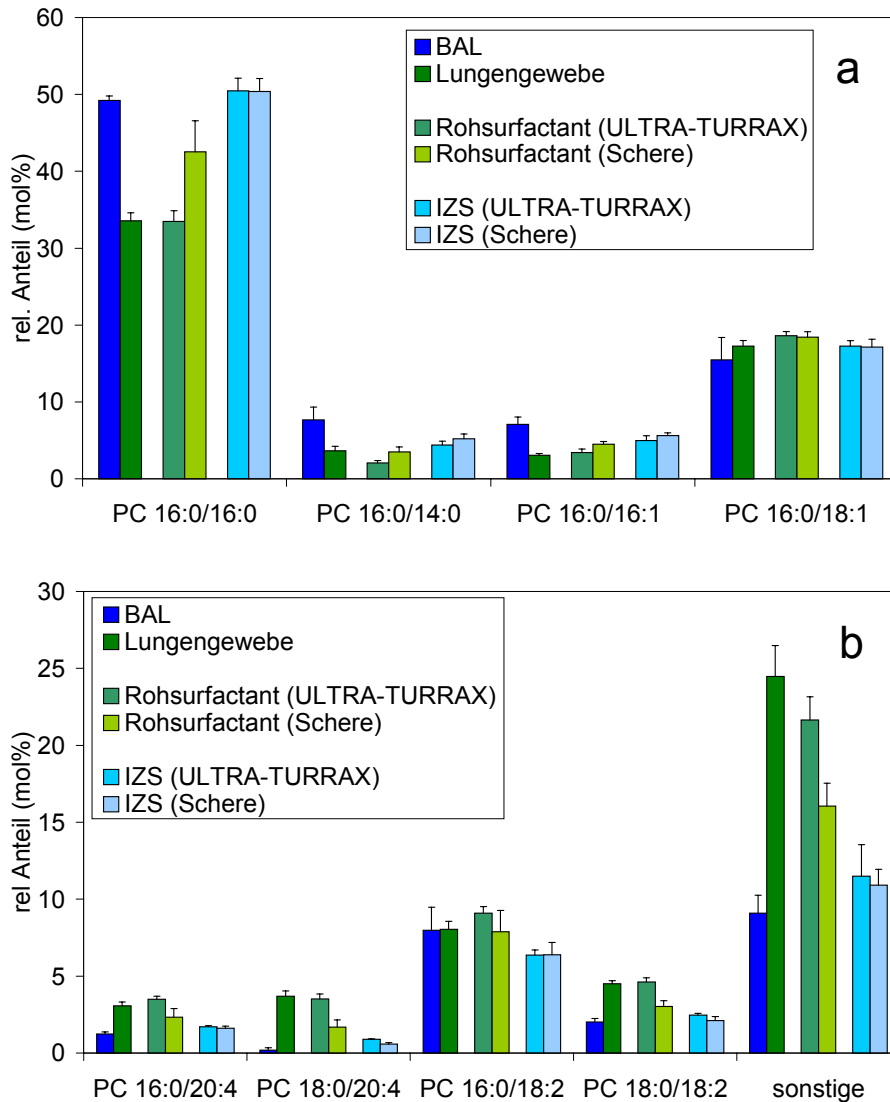


Abbildung 16: rel. Anteil der surfactanttypischen (a) und mehrfach ungesättigten (b) Phosphatidylcholin-Spezies im Rohsurfactant und IZS im Vergleich zu BALF und Lungengewebe

a: Anteil der surfactanttypischen Phosphatidylcholin-Spezies; **b:** Anteil der mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholin-Spezies, sonstige: PC18:1/18:1, PC18:1/18:2 und unbekannte Phosphatidylcholin-Spezies. Phosphatidylcholin wurde mittels Festphasenextraktion aus dem Phospholipidextrakt von Rohsurfactant, IZS, Lungengewebe und BALF präpariert und die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin in der RP-HPLC ermittelt. Daten sind $MW \pm SD$, $n = 5-6$.

Aufgrund der größeren Ausbeute an IZS-Phospholipid bei viel geringerem Zeitaufwand und gleicher Reinheit des gewonnenen Materials bzgl. Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies, PC/PL-Verhältnis und PL/Protein-Verhältnis wurde in allen folgenden Untersuchungen die Homogenisierung des Lungengewebes mit einem ULTRA-TURRAX® vorgenommen und anschließend der IZS mit Dichtegradientenzentrifugation nach Shelley [Shelley, 1977] aufgereinigt.

3.1.2. Versuch der weiteren Reinigung des IZS mittels einer zweiten Dichtegradientenzentrifugation

IZS, der durch Homogenisierung der Lunge freigesetzt wurde, kann, wie gezeigt wurde, durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation sehr effektiv von Gewebekontaminationen befreit werden. Dennoch ließ sich keine vollständige Übereinstimmung mit der Zusammensetzung von BALF erreichen. Deshalb sollte mit der Durchführung einer zusätzlichen zweiten Aufreinigung des IZS durch Dichtegradientenzentrifugation geklärt werden, ob dadurch ein höherer Reinheitsgrad ohne Verluste an Surfactantmaterial zu erreichen ist.

3.1.2.1. Ausbeute an Surfactantphospholipid

In Abbildung 17 ist die Menge an IZS-Phospholipid bei der Präparation aufgetragen. Nach zwei aufeinanderfolgenden Dichtegradientenzentrifugationen ist die Menge an Phospholipid gegenüber derjenigen nach nur einer Zentrifugation um 27% vermindert.

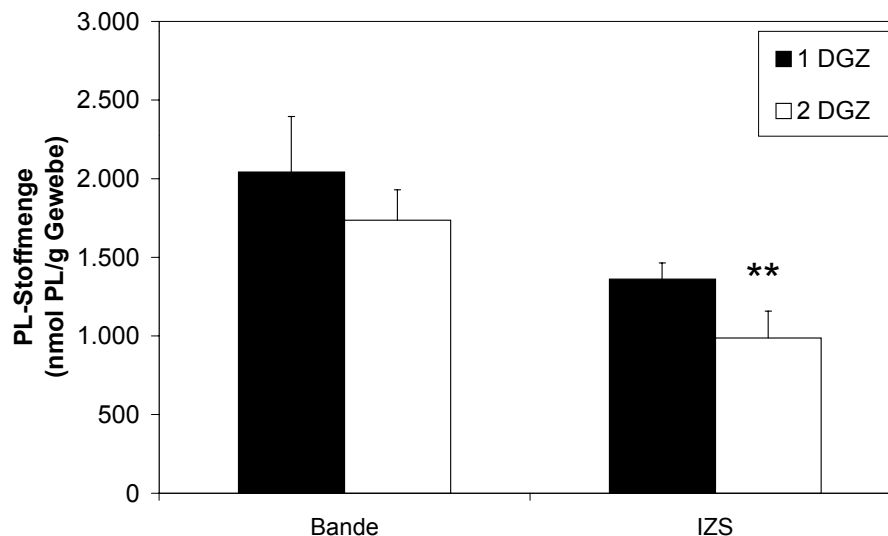


Abbildung 17: Verlust an Phospholipid-Ausbeute durch eine zweite Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) zur Reinigung von IZS

Aus dem organischen Extrakt von surfactanthaltiger Bande und IZS wurde die Phospholipid(PL)menge nach Bartlett ermittelt. Daten sind MW \pm SD, n = 5/6, Signifikanz: ** p < 0,01.

3.1.2.2. Verminderung der Menge nicht surfactanttypischer Bestandteile

Nach Durchführung von zwei aufeinanderfolgenden Dichtegradientenzentrifugationen ist der Anteil von Phosphatidylcholin an den Phospholipiden etwas erhöht gegenüber nur einer

Dichtegradientenzentrifugation (siehe Tabelle 14). Gleichzeitig ist jedoch sowohl das PC/Sphingomyelin-Verhältnis als auch das PL/Protein-Verhältnis vermindert. Berechnet man die Ausbeute auf der Grundlage des Phosphatidylcholin-Anteils, so beträgt der Verlust an Material während der zweiten Dichtegradientenzentrifugation nur 10% Phosphatidylcholin, allerdings ohne weiteren Reinigungserfolg (siehe 3.1.2.3). Dagegen wurden 37% der anderen Phospholipide abgetrennt.

	Anteil PC von PL (%)	PC/Sphingomyelin- Verhältnis (nmol/nmol)	PL/Protein- Verhältnis (μmol/mg)
Lungengewebe	36 \pm 3	8 \pm 1	
IZS (1 DGZ)	64 \pm 4	72 \pm 6	8,7 \pm 1,1
IZS (2 DGZ)	79 \pm 9 (*)	60 \pm 6 (**)	5,7 \pm 1,0 (**)

Tabelle 14: Anteil der nicht surfactanttypischen Lungengewebebestandteile im IZS

Aus Lungengewebe, Rohsurfactant und mittels Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) gereinigtem IZS wurde die Proteinkonzentration nach Lowry und die Phospholipid-Stoffmenge im organischen Extrakt nach Bartlett bestimmt. Der Anteil Phosphatidylcholin (PC) an den Phospholipiden (PL) wurde mittels Zugabe des internen Standards PC14:0/14:0 bei der RP-HPLC der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin rechnerisch ermittelt (siehe Formelanhang, Formel 12); das PC/Sphingomyelin-Verhältnis ergab sich aus der Peakfläche von Sphingomyelin und der Summe der Peakflächen der Phosphatidylcholin-Spezies (siehe Formelanhang 14). Daten sind MW \pm SD, n = 4-6. Signifikanz gegenüber 1 DGZ: * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.1.2.3. Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin

Wird IZS einer zweiten Dichtegradientenzentrifugation unterzogen, so ändert dies die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin nicht. Sowohl die surfactanttypischen als auch die gewebetypischen Spezies liegen in beiden Fällen zu gleichen Anteilen vor (siehe Abbildung 18).

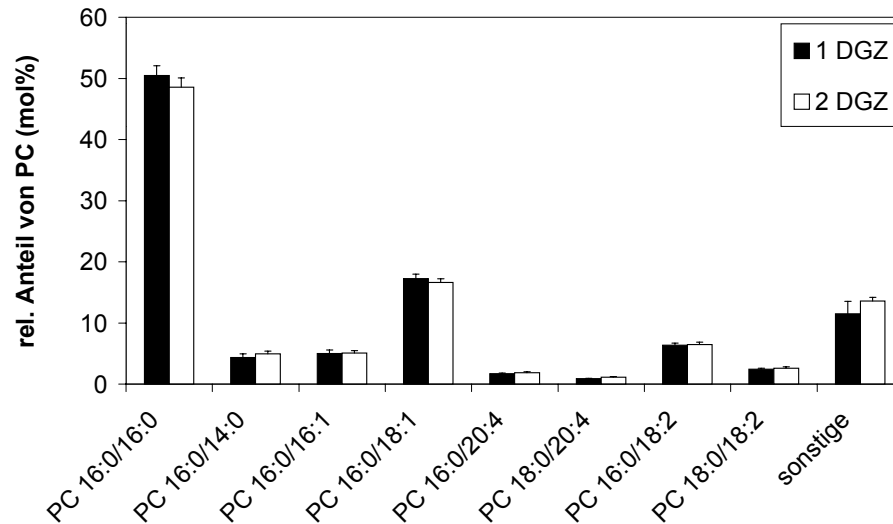


Abbildung 18: Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies im IZS

Phosphatidylcholin (PC) wurde mittels Festphasenextraktion aus dem Phospholipidextrakt des über Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) gereinigten IZS präpariert. Die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurde in der RP-HPLC ermittelt. Daten sind $MW \pm SD$, $n = 5/6$. Sonstige: PC18:1/18:2, PC18:1/18:1 und unbekannte Phosphatidylcholin-Spezies.

3.1.3. Funktionelle Charakterisierung des IZS

Eine wichtige Funktion des alveolären Surfactant ist die Reduktion der Oberflächenspannung in der Expiration zur Verhinderung eines endexpiratorischen Kollaps der Alveole. Zur Charakterisierung des IZS wurde als Maß für die Spezifität der Aufreinigungstechnik deshalb auch seine Oberflächenaktivität untersucht. Im Vordergrund standen hierbei zwei Fragestellungen. Wenn es sich bei dem gewonnenen Material um den im Gewebe gespeicherten Surfactant handelt, sollte es ähnliche oberflächenaktive Eigenschaften haben wie alveolärer Surfactant. Weiterhin stellt sich die Frage, ob der IZS in der Lage ist, die Oberflächenspannung so effektiv zu reduzieren wie Surfactant aus BALF.

Abbildung 19 zeigt die im Pulsating Bubble Surfactometer über 100 Pulsationszyklen gemessenen minimalen Oberflächenspannungen verschiedener Surfactantpräparationen. Die Oberflächenaktivität eines Surfactants hat verschiedene Aspekte, die an diesen Kurvenverläufen deutlich werden. Zunächst wird nach einer Periode von 10 sec, in der die Oberfläche der Luftblase in einer Surfactant-Suspension konstant gehalten wird, die statische Adsorption gemessen. Dieser Wert ist im Diagramm direkt auf der Y-Achse (0. Pulsationszyklus) aufgetragen (siehe auch Tabelle 15). Ein aktiver Surfactant aus BALF ist in der Lage, die Oberflächenspannung innerhalb dieses Intervalls auf Werte um 25 mN/m zu senken [Goerke et al, 1986]. Im Anschluß an diese Periode pulsiert die Luftblase mit 20 Zyklen pro min zwischen

einem Radius von 0,4 mm und 0,55 mm. Die Oberfläche verdoppelt sich in jedem Zyklus von $1,8 \text{ mm}^2$ auf $3,6 \text{ mm}^2$ (siehe 2.12). Aktiver Surfactant erreicht minimale Oberflächenspannungen von $< 10 \text{ mN/m}$ [Horowitz et al, 1991; Sugahara et al, 1994; Crouch et al, 1992]. Die Anzahl an Zyklen, die der Surfactant benötigt, um diese minimalen Oberflächenspannungen zu erreichen, ist umso geringer, je aktiver das Material ist.

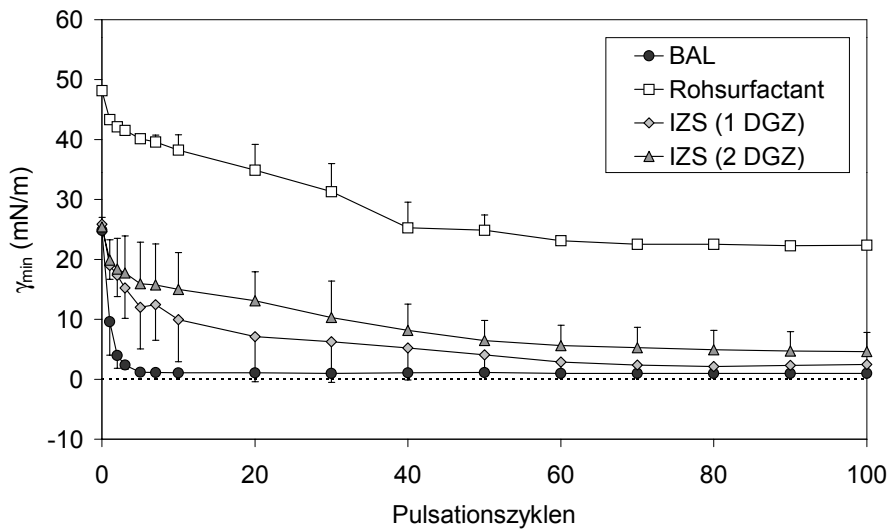


Abbildung 19: Dynamische minimale Oberflächenspannung verschiedener Surfactantpräparationen

Surfactant aus BALF, Rohsurfactant und IZS wurden mit $1,5 \text{ mM CaCl}_2$ -Lösung auf eine Phospholipidkonzentration von $4 \mu\text{mol/ml}$ verdünnt und im Pulsating Bubble Surfactometer bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Pulsationsfrequenz von $20/\text{min}$ untersucht. Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$, $n = 4-6$.

Surfactant aus BALF (siehe Abbildung 19, Tabelle 15) erfüllt bei beiden Konzentrationen alle für einen aktiven Surfactant angegebenen Kriterien. Die statische Adsorption liegt bei 25 mN/m und innerhalb von nur 3 Pulsationen werden in fast allen Proben Oberflächenspannungen von $< 5 \text{ mN/m}$ erreicht, was ein Zeichen für die hohe Oberflächenaktivität dieses Surfactants ist. Rohsurfactant (siehe Abbildung 19, Tabelle 15) hat bei beiden Konzentrationen eine höhere Adsorptionsoberflächenspannung, eine verzögerte dynamische Adsorption, was die gegenüber der BALF erhöhten Werte nach 3 und 10 Pulsationen zeigen, und eine erhöhte minimale Oberflächenspannung. IZS (siehe Abbildung 19, Tabelle 15) dagegen weist nach Reinigung durch eine Dichtegradientenzentrifugation die gleiche statische Adsorption wie Surfactant aus BALF auf. Auch erreichen fast alle Proben beider Phospholipid-Konzentrationen Oberflächenspannungen $< 5 \text{ mN/m}$. Einziger wesentlicher Unterschied zur BALF ist eine etwas verzögerte dynamische Adsorption bei der höheren Konzentration, erkennbar an den im Vergleich höheren Oberflächenspannungen des IZS bei 3 und 10 Pulsationszyklen. Die beiden IZS (siehe Abbildung 19, Tabelle 15) unterscheiden sich in ihrer Oberflächenaktivität in keiner Hinsicht voneinander.

	Surfactant aus BALF	Roh- surfactant	IZS (1 DGZ)	IZS (2 DGZ)
γ_{\min} (ads.) (mN/m)				
4 $\mu\text{mol/ml}$	25 (25-25)	48 (48-49) (**)	26(25-27) (n.s.)	25 (24-29) (n.s.)
1,33 $\mu\text{mol/ml}$	25 (24-35)	49 (46-50 (**))	26 (25-33 (n.s.))	25 (24-26) (n.s.)
γ_{\min} (3 Pulsationen) (mN/m)				
4 $\mu\text{mol/ml}$	2 (1-3)	42 (41-42) (**)	15 (8-22) (**)	20 (6-24) (**)
1,33 $\mu\text{mol/ml}$	4 (3-21)	42 (37-42) (**)	17 (11-25) (n.s.)	17 (12-22) (n.s.)
γ_{\min} (10 Pulsationen) (mN/m)				
4 $\mu\text{mol/ml}$	1 (1-2)	39 (33-40) (**)	8 (2-21) (**)	17 (4-21) (**)
1,33 $\mu\text{mol/ml}$	2 (2-19)	39 (31-39) (**)	11 (4-24) (n.s.)	13 (6-20) (n.s.)
γ_{\min} (100 Pulsationen) (mN/m)				
4 $\mu\text{mol/ml}$	1 (0,4-2)	22 (22-23) (**)	2 (1-5) (*)	4 (2-11) (*)
1,33 $\mu\text{mol/ml}$	1 (0,4-2)	24 (23-32) (**)	3 (1-21) (*)	4 (3-10) (**)

Tabelle 15: Oberflächenaktivität verschiedener Surfactantpräparationen

Surfactant aus BALF, Rohsurfactant und IZS nach 1 bzw. 2 Dichtegradientenzentrifugation(en) (DGZ) wurden mit 1,5 mM CaCl_2 -Lösung auf eine Phospholipidkonzentration von 4 $\mu\text{mol/ml}$ bzw. 1,33 $\mu\text{mol/ml}$ verdünnt und im Pulsating Bubble Surfactometer bei 37 °C und einer Pulsationsfrequenz von 20/min untersucht. Daten sind Median und Range, n = 4-6. Signifikanz gegenüber Surfactant aus BALF: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die große Varianz der Meßwerte im Bereich von 2-40 Pulsationen (siehe Abbildung 19, Tabelle 15) kommt durch ein Phänomen zustande, welches durch die Art der Auswertung verschleiert wird: Die Oberflächenspannung der Probe bleibt zu Beginn der Pulsationen zunächst konstant, um dann innerhalb weniger Zyklen stark abzusinken. Diese Plateauphase dauert bei den verschiedenen Proben unterschiedlich lange, was zu hohen Abweichungen der Meßwerte in dem Bereich zwischen dem Messen der statischer Adsorption (γ_{\min} (ads.)) und dem Erreichen der minimalen Oberflächenspannung führt. Trotzdem wurde in Abbildung 19 die Darstellung von Mittelwerten mit Standardabweichungen gewählt, da sie die Unterschiede zwischen den verschiedenen Surfactantpräparationen sehr anschaulich zeigt. Auch wurde die Auswertung der Meßergebnisse nicht auf die statische Adsorption und die minimale Oberflächenspannung beschränkt, weil die Dynamik der Oberflächenspannung nur über diesen mittleren Meßbereich zu erfassen ist. Dies ist besonders deutlich beim Vergleich von IZS (eine Dichtegradientenzentrifugation) und Surfactant aus BALF zu erkennen: Während bei einer Phospholipidkonzentration von 4 $\mu\text{mol/ml}$ alle Proben des BALF-Surfactant nach zehn Pulsationen eine Oberflächenspannung ≤ 2 mN/m erreicht haben und die Varianz der Werte sehr gering ist, zeigt der Bereich der Meßwerte beim IZS, daß einige Proben zu diesem Zeit-

punkt ihre minimale Oberflächenspannung schon erreicht haben, während andere noch fast die Oberflächenspannung nach statischer Adsorption haben. Dies macht deutlich, daß die dynamische Adsorption bei diesen Proben zum Teil langsamer verläuft als bei Surfactant aus BALF.

3.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse und Anwendung auf die Arbeit

Es wurde eine Methode zur zügigen Präparation von IZS aus lavagiertem Lungengewebe gesucht. Zwar ist eine vollständige Angleichung der biochemischen Parameter auch nach zweimaliger Reinigung über eine Dichtegradientenzentrifugation nicht möglich. Dennoch ist die Dichtegradientenzentrifugation eine Technik, aus der Surfactantkomponenten des Gewebes effektiv angereichert werden können. Die Zusammensetzung entspricht näherungsweise der BALF und ist mit den Literaturdaten zur Isolierung von Lamellarkörperchen vergleichbar. Die Technik bietet den Vorteil, daß sie bei eingefrorenem Material anwendbar ist (siehe 3.1, Seite 57).

Als Konsequenz für die Surfactantmetabolismus-Studien beim hyperoxischen Lungenschaden wurde die Homogenisierungstechnik mit dem ULTRA-TURRAX[®] wegen ihrer schnelleren Durchführbarkeit und höheren Ausbeute bei identischem Aufreinigungseffekt in Hinsicht auf die Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies vorgezogen. Aus den gleichen Gründen wurde auf eine zweite Dichtegradientenzentrifugation verzichtet.

3.2. Quantifizierung der Stoffmenge und ³H-Aktivität einzelner Phosphatidylcholin-Spezies

Zur Untersuchung des Surfactantmetabolismus sollten Markierungsstudien mit ³H-Cholin als Vorstufe von Phosphatidylcholin (siehe Einleitung) durchgeführt werden. Dieses Phospholipid wurde aufgrund seines großen Anteils am Surfactant-Phospholipid-Pool und wegen der Bedeutung verschiedener molekularer Spezies von Phosphatidylcholin für die Funktionalität des Surfactant (siehe Einleitung) ausgewählt. Ziel war sowohl eine detaillierte Analyse der Zusammensetzung der molekularen Spezies als auch die Detektion des neusynthetisierten Phosphatidylcholins in der Lunge und beiden Surfactantpools. Ein wesentlicher Bestandteil der Ergebnisse dieser Arbeit leitet sich daher aus der Separierung von Phosphatidylcholin und der sich daran anschließenden HPLC-Analytik der molekularen Spezies von Phosphati-

dylcholin ab. Die Zusammensetzung der Spezies, die Absolutmengen von Phosphatidylcholin sowie der Anteil von Phosphatidylcholin an den Phospholipiden werden aus dem HPLC-

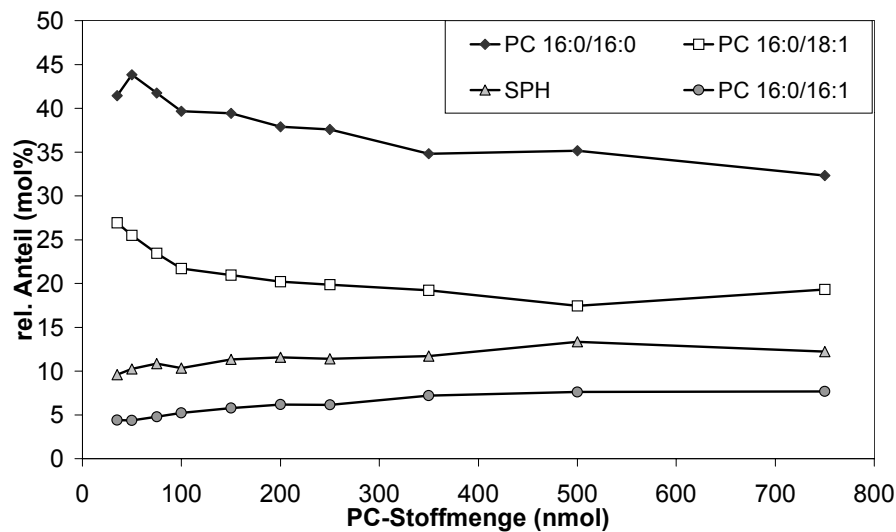


Abbildung 20: Abhängigkeit der rechnerisch ermittelten Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies und Sphingomyelin von der auf die HPLC aufgetragenen Stoffmenge

35-750 nmol Phosphatidylcholin aus Schweinelungenextrakt wurden in je 100 μ l TFE auf die HPLC aufgetragen. Die Berechnung der Zusammensetzung der molekularen Spezies und Sphingomyelins erfolgte auf der Basis der Integration der Peakflächen (siehe Formelanhang). Einzelmessungen.

Chromatogramm berechnet. Der aus der Integration der Peakfläche berechnete Anteil einer molekularen Spezies hängt aber wegen des Basislinienrauschens und der Peakverbreiterung unter anderem von der aufgetragenen Stoffmenge ab, wie Abbildung 20 exemplarisch zeigt. Dies gilt auch für die Absolutmenge an Substanz. Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde deshalb die Ausbeute bei der Festphasenextraktion sowie der Linearitätsbereich der HPLC-Analytik und das Verhältnis von Injektionsvolumen zu Peakfläche untersucht.

3.2.1. Ausbeute bei der Isolierung von Phosphatidylcholin über Festphasenextraktion

Aufgrund der unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Stoffmengen und PC/PL-Verhältnisse in den zu untersuchenden Fraktionen Lungengewebe, IZS und BALF wurde die Ausbeute bei der Festphasenextraktion im gesamten Arbeitsbereich der NH_2 -Säulen untersucht. Hierzu wurde exemplarisch PC14:0/14:0 verwendet, weil es in definierter Konzentration und Reinheit zur Verfügung stand.

aufgetragene Stoffmenge	250 nmol (100%)	500 nmol (100%)	1300 nmol (100%)
PC14:0/14:0-Rest im Gefäß (%)	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,0
PC14:0/14:0 in 3 ml Chloroform (%) (1 ml Probenauftrag + 2·1 ml Waschschrift zur Entfernung der Neutrallipide)	0,8 ± 0,5	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0
PC14:0/14:0 in der PC-Eluat-Fraktion (%) (Chloroform / Methanol 70:30)	86 ± 3	93 ± 4	94 ± 3
Verlust auf der Säule	13 ± 2	7 ± 4	6 ± 3

Tabelle 16: Ausbeute bei der Isolierung von Phosphatidylcholin (PC) mittels Festphasenextraktion

Verschiedene Stoffmengen an PC14:0/14:0 wurden auf NH₂-Säulen aufgetragen und nach Vorschrift eluiert. Die wiedergefundene Stoffmenge wurde per Phosphatbestimmung nach Bartlett ermittelt. Jeweils Dreifachbestimmung gegen Leerwert. Daten sind MW ± SD.

Nur verschwindend geringe Substanzmengen wurden im verwendeten Gefäß und im Chloroformeluat wiedergefunden (siehe Tabelle 16). 86-94% des aufgetragenen PC 14:0/14:0 eluierten in der PC-Eluat-Fraktion. Der Anteil wurde mit abnehmender Stoffmenge geringer. Als Konsequenz hieraus wurde für Vergleichsuntersuchungen zwischen Proben immer die gleiche Phospholipid-Stoffmenge auf die NH₂-Säule aufgetragen. Auch wurde eine möglichst große Stoffmenge verwendet. Es wurden je Lunge 1300 nmol und je BALF 250 bzw. 500 nmol Phospholipid verarbeitet sowie je 1000-1300 nmol Phospholipid aus IZS. An den Analysen aus BALF der Kontrollgruppe wurde errechnet, daß die verarbeitete Stoffmenge in diesem Bereich (250-500 nmol Phospholipid) keinen Einfluß auf die gemessene prozentuale Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin hat.

3.2.2. Verhältnis von HPLC-Injektionsvolumen und Peakfläche

Zur Kalibrierung der HPLC wurde während eines Laufes die Abhängigkeit der PC 14:0/14:0-Peakfläche vom Injektionsvolumen bei drei verschiedenen Substanzkonzentrationen gemessen. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der Untersuchung. Alle Kurven zeigen über den gesamten Bereich einen linearen Verlauf ($p < 0,0001$). Von allen drei Kurven wurde zunächst eine Einfachbestimmung durchgeführt. Im direkten Anschluß, d.h. jeweils 6:40 h später, wurden alle Proben in der gleichen Reihenfolge nochmals analysiert. Der jeweils untere der beiden Punkte resultierte aus dieser zweiten Meßreihe, was die sinkende Aktivität des Derivatisierungsreagenz dokumentiert. Der x-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden liegt bei 8,4 µl (2 nmol/µl), 10,8 µl (1 nmol/µl) bzw. 12,3 µl (0,5 nmol/µl).

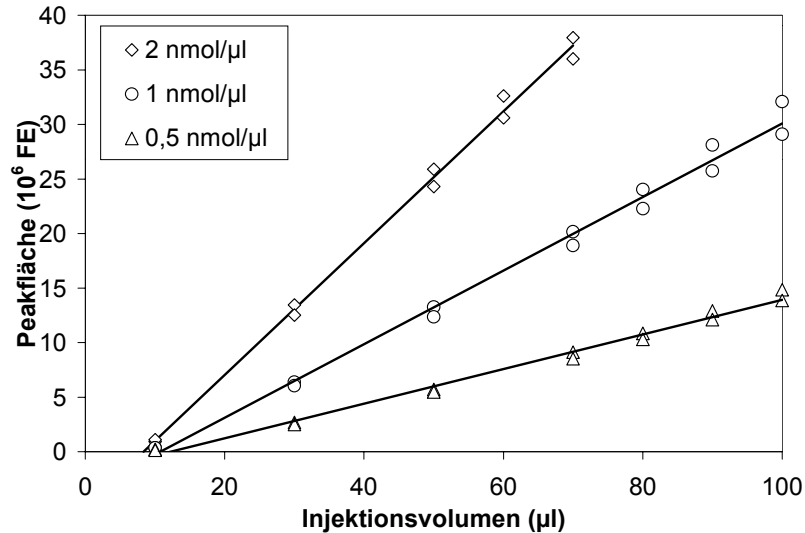


Abbildung 21: Verhältnis von Peakfläche zu Injektionsvolumen im HPLC-Plot

Während eines Laufs wurden verschiedene Volumina an PC14:0/14:0 in TFE (2 nmol/μl; 1 nmol/μl; 0,5 mol/μl) injiziert. Einzelmessungen und lineare Regressionen. FE: Flächeneinheiten.

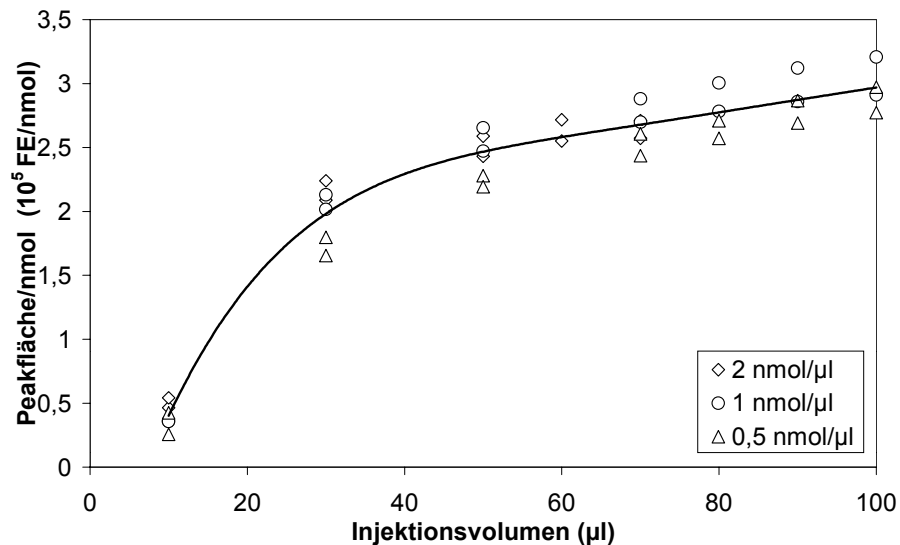


Abbildung 22: Abhängigkeit des Peakfläche/Stoffmenge-Verhältnisses vom Injektionsvolumen

Während einer Analysenserie wurden je Lauf 10-100 μl PC14:0/14:0 in TFE (2 nmol/μl; 1 nmol/μl; 0,5 nmol/μl) injiziert und die Fläche des erhaltenen Peaks pro Stoffmenge berechnet. Einzelmessungen.

Berechnet man die Peakfläche pro nmol PC14:0/14:0 und trägt sie über dem Injektionsvolumen auf, so liegen die Werte verschiedener Konzentration und gleicher Injektionsvolumina sehr dicht beieinander. Es ergibt sich aber nicht die idealerweise zu erwartende Parallele zur x-Achse, sondern eine Kurve, die sich zu größeren Volumina hin asymptotisch einem Maximalwert annähert (siehe Abbildung 22). Die gemessene stoffmengenbezogene Peakfläche ist also nur unwesentlich von der Konzentration der Lösung, aber wesentlich vom Injektionsvolumen abhängig. Die Tatsache, daß bei einer Auftragung der Peakfläche gegen das Injekti-

onsvolumen (siehe Abbildung 21) alle Kurven bei ca. 10 µl die x-Achse schneiden, deutet darauf hin, daß bei jeder Injektion ein Volumenverlust von ca. 10 µl Probenlösung entsteht.

Aus diesen Daten ergaben sich für die HPLC-Analytik der Phospholipidfraktionen aus den Perfusionsexperimenten folgende Konsequenzen:

- Das Injektionsvolumen wurde auf 90 µl standardisiert, um den in der Anlage entstehenden Substanzverlust zu minimieren und um vergleichbare stoffmengenbezogene Peakflächen zu erhalten.
- Zur Berechnung der auf die HPLC aufgetragenen Stoffmenge wurde vom aufgetragenen Volumen je 10 µl subtrahiert, um den Substanzverlust zu berücksichtigen.
- Das Verhältnis von Peakfläche zu Stoffmenge ist mindestens im Bereich bis 120 nmol je Peak linear.

Für die Analysen der Phosphatidylcholin-Spezies aus Lungengewebe, BALF und IZS wurden 93-383 nmol Substanz aufgetragen. Dies garantiert die Validität der aus den Analysen errechneten prozentualen Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin.

3.2.3. Versuch der Bestimmung der Fluoreszenzausbeute der verschiedenen Phosphatidylcholine

Von Postle wurde gezeigt, daß die stoffmengenbezogene Fluoreszenzaktivität von der Länge der Fettsäureketten im Molekül abhängig ist. Weiterhin zeigte er, daß die maximale Fluoreszenzausbeute nur erreicht wird, wenn die Derivatisierung oberhalb der Phasenübergangstemperatur der jeweiligen Substanz stattfindet [Postle, 1987]. Allerdings wurden in dieser Untersuchung nur einzelne Phosphatidylcholin-Spezies (PC12:0/12:0, PC14:0/14:0, PC16:0/16:0, PC16:0/18:1) auf ihr Verhältnis von Fluoreszenz-Peakfläche zu Stoffmenge untersucht. Von den weiteren hier untersuchten Spezies PC16:0/14:0, PC16:0/16:1, PC16:0/20:4, PC18:0/20:4, PC16:0/18:2 und PC18:0/18:2 ist nicht bekannt, ob sie eine vergleichbare stoffmengenbezogene Fluoreszenzaktivität aufweisen. Unterschiede in diesem Parameter hätten eine etwas veränderte prozentuale Zusammensetzung und Stoffmenge der molekularen Spezies zur Folge, aber keinen Einfluß auf die Veränderungen, die sich durch die hyperoxische Begasung ergeben. Dennoch erschien es sinnvoll, für die untersuchten Spezies das Fluoreszenz/Stoffmenge-Verhältnis zu kalibrieren, da die Meßmethode eine sehr geringe Streuung

der prozentualen Zusammensetzung z.B. des Lungengewebes liefert und durch das Einrechnen dieser Kalibrierungsergebnisse sehr exakte Daten zu erhalten wären.

In der Praxis erwies sich die genaue Bestimmung des Verhältnisses von Stoffmenge zu Fluoreszenzemission jedoch als schwierig. Nicht alle untersuchten Substanzen sind auf dem Markt erhältlich. Eine Präparation dieser Substanzen über die HPLC ist nicht sinnvoll, da nur geringe Stoffmengen aufgetragen werden können, und die Peaks teilweise nicht vollständig voneinander getrennt werden (siehe Abbildung 12). Weiterhin ist nicht bei allen Peaks bekannt, welche Substanz sich darunter verbirgt. Selbst wenn für alle bekannten Phosphatidylcholine ein Kalibrierfaktor ermittelt werden könnte, der das möglicherweise unterschiedliche Fluoreszenz/Stoffmenge-Verhältnis ausgleicht, so wäre eine exakte Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung trotzdem wegen diesen unbekanntem Substanzen nicht möglich.

Beide Probleme, d.h. nicht verfügbare bzw. unbekannte Substanzen, könnten umgangen werden, wenn es möglich wäre, aus dem HPLC-Eluat die unter einem Peak befindliche Stoffmenge exakt zu bestimmen. Hierfür fehlt jedoch eine hinreichend sensible Analytik, da die auf die HPLC auftragbare Stoffmenge eines Phosphatidylcholin-Gemisches mit 100-400 nmol sehr gering ist (siehe 3.2.2).

Als weitere Möglichkeit blieb, mittels einiger Phosphatidylcholine den Effekt der Kettenlänge und der Zahl der Doppelbindungen auf das Fluoreszenz/Stoffmenge-Verhältnis zu bestimmen und auf die nicht erhältlichen Spezies zu übertragen. Auch hier bleibt allerdings das Problem der Behandlung der unbekanntem Phosphatidylcholin-Spezies bestehen. Weiterhin zeigte sich, daß der von der Firma mittels ICP-Atom-Emission ermittelte Gehalt an Phosphor um einige Prozent vom stöchiometrisch zu erwartenden Gehalt abwich. Wird die auf die HPLC aufgetragene Stoffmenge über eine Bestimmung des nach thermischer Zersetzung enthaltenen Phosphats ermittelt, so ist davon auszugehen, daß auch das erhaltene Fluoreszenz/Stoffmenge-Verhältnis vom tatsächlichen Wert abweicht.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten erschien es fragwürdig, ob eine Umrechnung der Peakflächen mit den erhaltenen Kalibrierfaktoren zu valideren Daten führen würde. Aus diesem Grund wurde lediglich die Peakfläche (und damit die Stoffmenge) an PC14:0/14:0 nach den von Postle ermittelten Daten (siehe 2.11.3.3) um 6% nach oben korrigiert, was eine Verminderung der Stoffmengen aller Phosphatidylcholine um 6% und eine leichte Verringerung des PC/PL-Verhältnisses zur Folge hat. Bei allen anderen Phosphatidylcholinen wurde bei allen

Berechnungen davon ausgegangen, daß das Fluoreszenz/Stoffmenge-Verhältnis mit demjenigen von PC16:0/16:0 übereinstimmt

Obwohl die Zusammensetzung der untersuchten Phosphatidylcholone möglicherweise aufgrund etwas unterschiedlicher Fluoreszenz/Stoffmenge-Verhältnisse von der verwendeten Analytik nicht völlig korrekt abgebildet wird, so ist bei der Bewertung der Daten doch zu beachten, daß sich dies, wie oben erwähnt, nicht auf Unterschiede zwischen verschiedenen Untersuchungsgruppen auswirkt, da diese unter gleichen Bedingungen analysiert wurden. Auch ist zu bedenken, daß diese Analytik im Vergleich mit anderen verwendeten Methoden (wie z.B. Dünnschichtchromatographie oder GC-Analyse der gebundenen Fettsäuren) die detailliertesten Ergebnisse liefert, wenn man von der vor kurzem aufgekommenen Massenspektrometrischen Analytik der molekularen Spezies der verschiedenen Phospholipide [Postle, 1999] einmal absieht.

3.2.4. Ausbeute bei der Isolierung von ^3H -markiertem Phosphatidylcholin mittels Festphasenextraktion

Die Berechnung des ^3H -Cholin-Einbaus in die individuellen molekularen Phosphatidylcholin-Spezies in Lungengewebe, IZS und BALF erfolgte aus dem Absoluteinbau in die jeweilige Fraktion und dem Anteil an Radioaktivität, der im HPLC-Eluat dieser Spezies gefunden wurde (siehe Formelanhang).

	Kontrolle	2d 85% O ₂	7d 85% O ₂
^3H -Aktivität in 3 ml Chloroform (%) (1 ml Auftragsvolumen + 2·1 ml Waschschrift zur Entfernung der Neutrallipide)	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,0
^3H -Aktivität in der PC-Eluat-Fraktion (%) (1 ml Chloroform / Methanol 70:30)	93 ± 5	90 ± 6	94 ± 3
^3H -Aktivität im MeOH-Eluat (1 ml) (%)	1,8 ± 0,5	1,1 ± 0,4	1,4 ± 0,6

Tabelle 17: ^3H -Ausbeute bei der Präparation von ^3H -markiertem Phosphatidylcholin aus Lungengewebe

1300 nmol Phospholipid aus ^3H -Cholin-markiertem Lungenextrakt wurden einer Festphasenextraktion an NH₂-Säulen unterzogen. Die absolute ^3H -Aktivität wurde im Extrakt (100%), im Chloroformeluat und im Phosphatidylcholin(PC)-Eluat per Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Daten sind MW ± SD, n = 20/8/6

Dies setzt voraus, daß ^3H -Cholin in kein anderes Phospholipid außer Phosphatidylcholin und Sphingomyelin eingebaut wird, da ansonsten zu hohe Aktivitäten errechnet werden. Um diese Berechnung des ^3H -Cholin-Einbaus zu validieren, wurde untersucht, welcher Anteil der ^3H -

Cholin-Aktivität des Lungen-Phospholipids mit der PC-Eluat-Fraktion eluiert. Aus dem Vergleich dieses Prozentsatzes mit dem Anteil an PC14:0/14:0 in der PC-Eluat-Fraktion ergibt sich ein Hinweis darauf, ob sich die Radioaktivität zum größten Teil im Phosphatidylcholin befindet. Wie in Tabelle 17 zu sehen ist, eluiert mit dem Chloroform nur ein Bruchteil der ^3H -Aktivität. Der in der Phosphatidylcholin-Eluat-Fraktion eluierende Anteil der aufgetragenen ^3H -Aktivität beträgt in allen Versuchsgruppen mindestens 90% und unterscheidet sich nicht von dem eluierenden Anteil an PC14:0/14:0 (siehe Tabelle 16). Das ist ein Hinweis darauf, daß die im Phospholipid wiedergefundene ^3H -Aktivität nur in Phosphatidylcholin und Sphingomyelin eingebaut wurde.

3.2.5. Verteilung der ^3H -Aktivität im HPLC-Eluat

Die ^3H -Markierung der einzelnen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurde aus dem HPLC-Eluat bestimmt. Abbildung 23 zeigt die Fluoreszenzemission und die ^3H -Aktivität der einzelnen Phosphatidylcholin-Spezies einer HPLC-Analyse (Phosphatidylcholin-Fraktion einer Rattenlunge der Kontrollgruppe). Die ^3H -Aktivität ist den einzelnen Peaks eindeutig zuzuordnen. Schon im Vorlauf erscheint ein Anteil an Radioaktivität. Da die ^3H -Aktivität insgesamt relativ gering ist, wurde in den Experimenten bei der Eluatfraktionierung das Eluat jeder molekularen Spezies komplett gesammelt, um die Anzahl der Fraktionen zu senken und um durch Erhöhung der ^3H -Aktivität pro Fraktion die absolute Zählzeit zu erniedrigen.

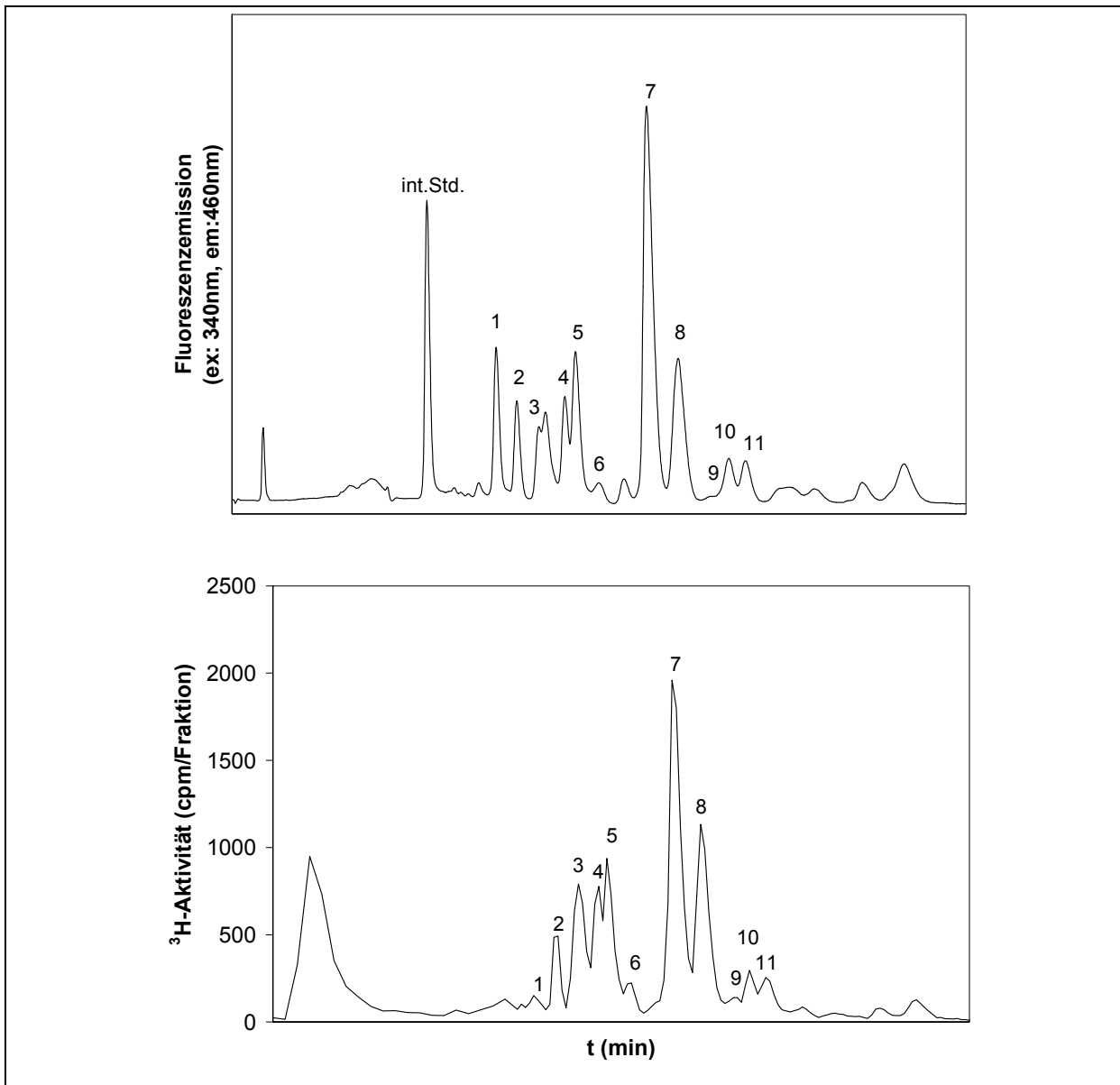


Abbildung 23: Fluoreszenzemission und ^3H -Aktivität des HPLC-Eluats

Während der HPLC-Trennung der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies wurde das Eluat im Minutentakt (0-20 min) bzw. alle 20 sec. (20-60 min) gesammelt. Die ^3H -Aktivität wurde mittels Flüssigszintillationszählung in allen Fraktionen bestimmt. 1: SPH, 2: PC16:0/14:0, 3: PC16:0/16:1, 4: PC 16:0/20:4, 5: PC16:0/18:2, 6: PC 18:1/18:2, 7: PC16:0/16:0, 8: PC16:0/18:1, 9: PC 18:1/18:1, 10: PC 18:0/20:4, 11: PC 18:0/18:2, i. Std.: interner Standard.

3.3. Bestimmung der spezifischen ^3H -Aktivität von Phosphocholin

Um aus dem Einbau von ^3H -Cholin in das Lungen-Phospholipid auf die Neusynthese von Phosphatidylcholin schließen zu können, ist es wichtig, die spezifische Aktivität von Phosphocholin im Gewebe zu kennen (siehe 3.11.2). Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung der spezifischen ^3H -Aktivität von Phosphocholin im Lungengewebe eine Methode zur Isolierung und Quantifizierung der Substanz etabliert. Diese Methode wurde von Burdge für

fetales Lungengewebe vom Meerschweinchen beschrieben [Burdge et al, 1993]. Phosphocholin und dessen Vorstufe Cholin, die sich bei der organischen Extraktion des Lungengewebes in der wässrig-methanolischen Oberphase sammeln, werden aufgrund ihres unterschiedlichen Bindungsverhaltens an NH_2 -Säulen mittels Festphasenextraktion getrennt. Die Quantifizierung von Phosphocholin findet mit Hilfe eines enzymatischen Assays statt.

Da als Vorstufe von Phosphatidylcholin bei den Surfactant-Metabolismusstudien ^3H -Cholin eingesetzt wurde, welches nach der dreistündigen isolierten Lungenperfusion in der Lunge nur in geringen Mengen, aber mit hoher ^3H -Aktivität vorhanden ist, sollte neben der Etablierung des Enzymassays auch die Effektivität der Trennung beider Substanzen in der Festphasenextraktion ermittelt werden.

3.3.1. Festphasenextraktion zur Trennung von Phosphocholin und Cholin

Zur Untersuchung des Elutionsprofils von Cholin und Phosphocholin bei der Festphasenextraktion auf NH_2 -Säulen wurden beide Substanzen im Phosphocholin-Auftragsmittel (siehe 2.4) in einer Konzentration von $1 \mu\text{mol/ml}$ und einer spezifischen ^3H -Aktivität von $0,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ eingesetzt. Da beide Substanzen aus Kostengründen mit dem gleichen Isotop markiert waren, wurde das Elutionsverhalten getrennt voneinander untersucht. Abbildung 24 zeigt das Elutionsprofil von Cholin und Phosphocholin bei der Festphasenextraktion auf NH_2 -Säulen.

Cholin bindet im Auftragsmittel nur zu einem geringen Prozentsatz an die feste Phase. Nach dem Auftragen von 1 ml Probe (1000 nmol) und Waschen mit 1 ml Auftragsmittel sind $90,2\%$ der Substanz eluiert. Das Waschen mit einem weiteren ml Lösemittel erhöht den eluierten Anteil nur geringfügig. Mit dem Phosphocholin-Elutionsmittel (siehe 2.4) werden nochmals $4,2\%$ des Cholins von der Säule gespült, $5,1\%$ der Substanz bleiben auf der Säule gebunden. Phosphocholin wird beim Auftragen von 1000 nmol in 1 ml Auftragsmittel zu $97,7\%$ auf der NH_2 -Säule retiniert. Das Waschen mit 2 ml Auftragsmittel führt zu einem Verlust von $1,9\%$ der Substanz. Beim Spülen mit 2 ml Elutionsmittel werden $94,8\%$ des aufgetragenen Phosphocholins wiedergewonnen. Nochmaliges Spülen mit 1 ml Elutionsmittel erhöht die Ausbeute nur um $0,2\%$. Nur ein Bruchteil der Substanz verbleibt auf der festen Phase. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Spülvorgang mit Auftragsmittel auf 1 ml reduziert und die Elution nach der Aufgabe von $1,5 \text{ ml}$ Elutionsmittel beendet. Tabelle 18 zeigt die Reproduzierbarkeit des Elutionsverhaltens von Cholin und Phosphocholin unter diesen Bedingungen.

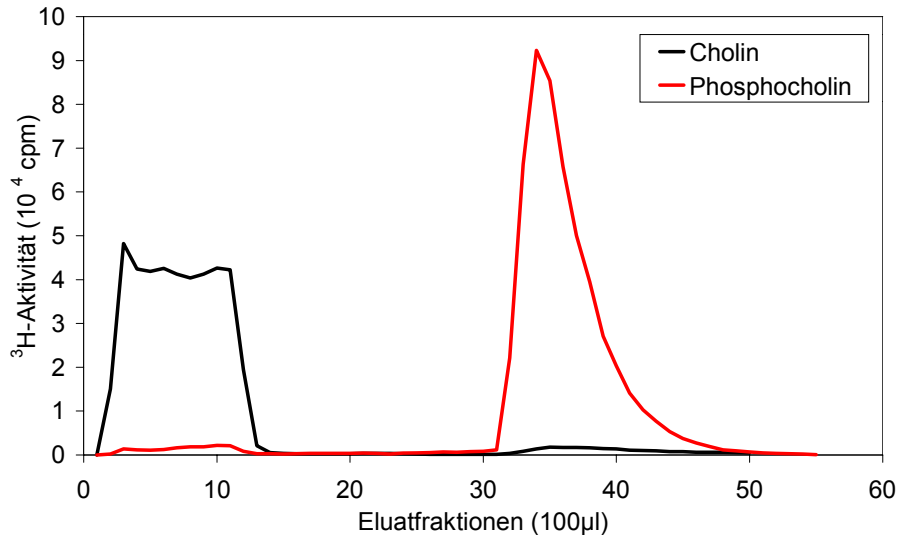


Abbildung 24: Elutionsverhalten von Cholin und Phosphocholin bei der Festphasenextraktion auf NH₂-Säulen

Je 1000 nmol ³H-Cholin bzw. ³H-Phosphocholin wurden in 1 ml Phosphocholin-Auftragsmittel auf NH₂-Säulen aufgetragen. Nach dem Waschen mit 2 ml Phosphocholin-Auftragsmittel wurde mit 3 ml Phosphocholin-Elutionsmittel eluiert. Fraktionen von 100 µl wurden gesammelt und mittels Flüssigszintillationsmessung auf ihre ³H-Aktivität untersucht. Aufgetragen wurde der Mittelwert einer Doppelbestimmung.

	Anteil Cholin (% ³H-Aktivität)	Anteil Phosphocholin (% ³H-Aktivität)
Phosphocholin-Auftragsmittel (1ml Probenauftrag + 1 ml Waschen)	93,7 ± 0,3	3,7 ± 0,1
Phosphocholin-Elutionsmittel (1,5 ml)	5,7 ± 0,0	93,9 ± 1,3
Verlust auf der Säule	0,7 ± 0,2	2,4 ± 1,4

Tabelle 18: Elutionsverhalten von Cholin und Phosphocholin bei der Festphasenextraktion mit NH₂-Säulen

1000 nmol ³H-Cholin bzw. ³H-Phosphocholin wurden auf NH₂-Säulen aufgetragen. Nach dem Waschen wurde mit 1,5 ml Phosphocholin-Elutionsmittel eluiert. Mittels Flüssigszintillationszählung im Eluat wurde die Auswaschung beider Substanzen verfolgt. Daten sind MW ± SD. n = 4.

Ein Störfaktor in der Quantifizierung von Phosphocholin ist die Menge an ³H-Cholin im Perfusat, die nach der isolierten Lungenperfusion in der Lunge verbleibt. Die Menge dieses Perfusat-Cholins kann einfach abgeschätzt werden. Bleiben maximal 500 µl Perfusat in der Lunge zurück und liegt die Konzentration an ³H-Cholin nach der Perfusion noch bei 15 µmol/l, so bleiben 7,5 nmol ³H-Cholin in der Lunge zurück. Bei einer Elution von 6% dieses Cholins mit dem Phosphocholin werden unter diesen Voraussetzungen maximal 0,5 nmol Perfusat-³H-Cholin pro Lunge in der Phosphocholinfraktion wiedergefunden.

3.3.2. Enzymatischer Assay zur Quantifizierung von Phosphocholin

Der enzymatische Assay zur Quantifizierung von Phosphocholin basiert auf einer Dephosphorylierung des Substrats durch alkalische Phosphatase zu Cholin und einer Oxidase/Peroxidase katalysierten Farbreaktion. Der Farbstoff Aminoantipyren ermöglicht im Anschluß an die Dephosphorylierungsreaktion eine photometrische Messung der entstandenen Menge an Cholin. Zur Etablierung dieses Enzymassays wurde zunächst mit Cholin der lineare Meßbereich der Farbreaktion ermittelt. Dieser endete bei 75 nmol Substanz (siehe Abbildung 25). Am oberen Ende des Linearitätsbereichs wurde dann die Färbeintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Es zeigte sich, daß die Reaktion nach 20 min abgeschlossen ist (siehe Abbildung 25). Die Reaktionszeit der Farbreaktion wurde deshalb auf 30 min festgesetzt.

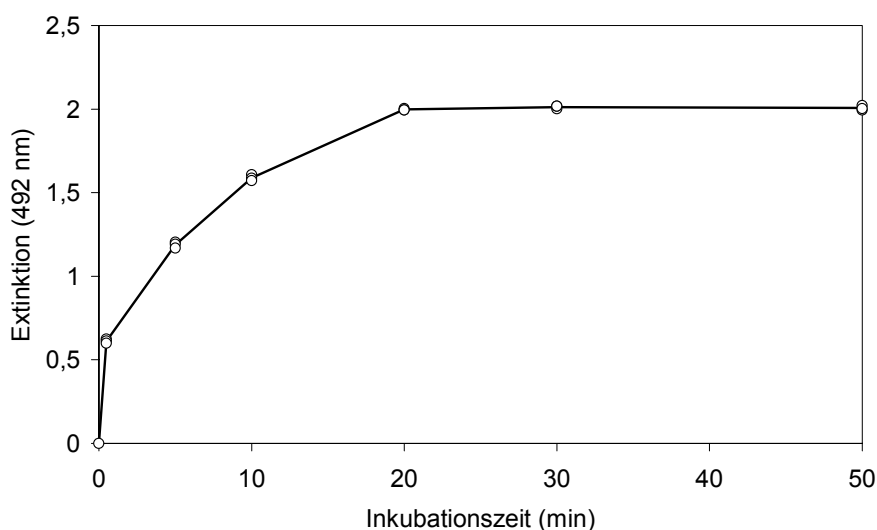


Abbildung 25: Abhängigkeit der Färbung von der Inkubationszeit der Oxidase/Peroxidase-Reaktion

75 nmol Cholin wurden mit Oxidase/Peroxidase-Reagenz versetzt und die Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten photometrisch bestimmt. Dreifachbestimmung gegen Leerwert. Aufgetragen sind die Einzelwerte.

Es zeigte sich, daß ein großer Teil der Umsetzung von Phosphocholin zu Cholin in Gegenwart der alkalischen Phosphatase auch dann eintritt, wenn man beide Reaktionen gleichzeitig für 30 min ablaufen läßt.

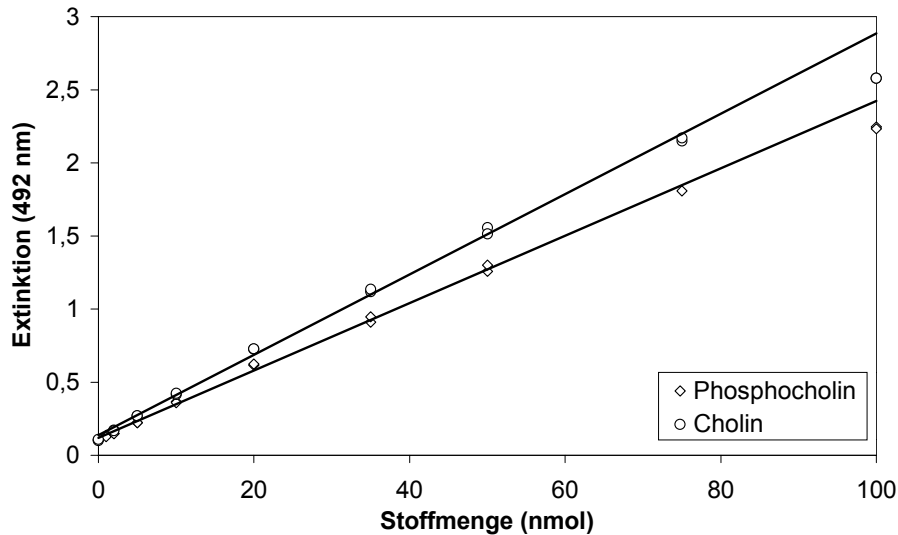


Abbildung 26: Kalibriergeraden des Enzymassays zur photometrischen Bestimmung von Phosphocholin
1-100 nmol Cholin und Phosphocholin wurden im Phosphocholinassay eingesetzt. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 492 nm. Dargestellt sind Einzelwerte (jeweils $n = 2$) und lineare Regression.

Trotzdem wurde die Inkubationsdauer der Dephosphorylierungsreaktion zusätzlich zur 30minütigen Oxidase/Peroxidase-Reaktion auf 50 min festgesetzt, da hierdurch eine hohe Empfindlichkeit bei niedrigen Schwankungen innerhalb einer Mehrfachbestimmung erreicht wurde. Insgesamt konnte keine vollständige Umsetzung von Phosphocholin zu Cholin erreicht werden, wie Abbildung 26 zeigt, sondern nur eine Umsetzung zu $84 \pm 2\%$ ($n = 9$). Beide Eichgeraden sind aber im Bereich von 1-75 nmol linear ($p < 0,0001$).

3.4. Validierung des Modells der isolierten perfundierten Rattenlunge

3.4.1. Validitätskriterien

Alle Tiere befanden sich während der Präparation der isolierten perfundierten Lunge in Totalanästhesie. Sie zeigten Spontanatmung, regelmäßigen Herzschlag und keine periphere Zyanose. Makroskopisch konnten an den Lungen im Verlauf der Perfusion weder Atelektasen noch Ödeme festgestellt werden. Das Entweichen des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin aus der Lunge zeigte die korrekte Lage des Perfusionskatheters im Truncus pulmonalis und die vollständige Perfusion des Gefäßsystems an. Die Lungen zeigten einen quasilinearen Einbau von ^3H -Cholin über einen Zeitraum von 3 h (siehe 3.4.2).

3.4.2. Kinetik des Einbaus von ^3H -Cholin

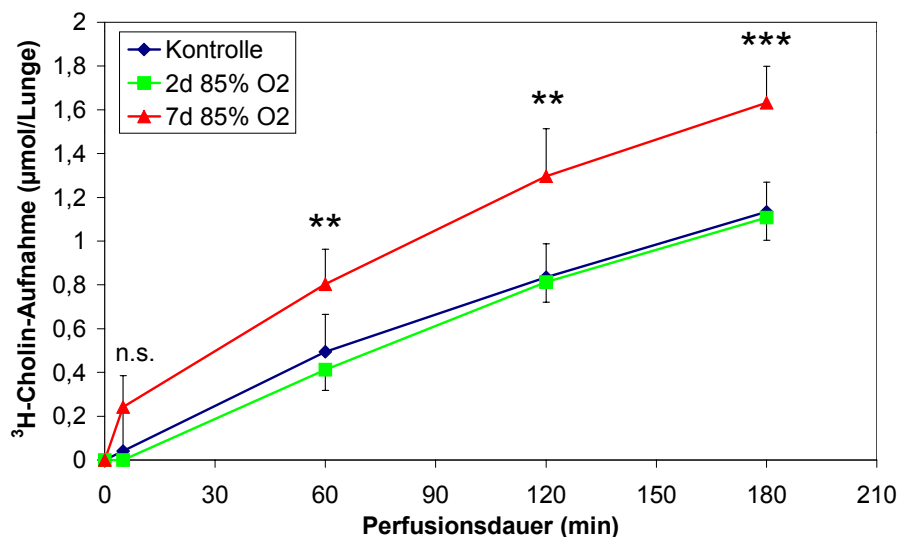


Abbildung 27: ^3H -Cholin-Aufnahme der Lunge während der dreistündigen isolierten Perfusion

Während der isolierten Perfusion der Lunge wurde die ^3H -Aktivität im Perfusat bestimmt und aus der Abnahme der Aktivität die ^3H -Cholinaufnahme der Lunge berechnet (siehe Formelanhang, Formel 17 und 18). Daten sind MW \pm SD, n = 21/8/6. Signifikanz gegenüber Kontrolle: n.s. p > 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Während der Perfusion wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben des Perfusats entnommen, um über die ^3H -Aktivität im Perfusat Aufschluß über die Cholinaufnahme durch die Lunge zu erhalten. Den Verlauf der Cholinaufnahme stellt Abbildung 27 dar. Die Lungen aller Versuchsgruppen nahmen während der gesamten dreistündigen Perfusion ^3H -Cholin auf; diese Aufnahme ist nahezu linear. Initial (0-5 min nach Zugabe des ^3H -Cholins) nahmen die Lungen nach 7 d 85% O₂ verhältnismäßig viel Radioaktivität auf (siehe Abbildung 27).

3.4.3. Veränderung des Volumens der BALF während der Perfusion

Im Anschluß an die Perfusion wurde die Lunge mit insgesamt 32 ml physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Das wiedergewonnene Volumen der BALF ist in Tabelle 19 angegeben. Aufgeführt ist außerdem das zurückerhaltene Lavage-Volumen von Tieren, deren Lungen nicht isoliert perfundiert wurden. Vor Perfusion betrug die Rückgewinnung der injizierten physiologischen Kochsalzlösung 84-92%. Nach der Perfusion ist das rückgewonnene Volumen in der Kontrollgruppe und nach zweitägiger Hyperoxie tendenziell etwas niedriger als vorher. Nach siebentägiger Hyperoxie ist dieser Unterschied größer. Alle Berechnungen von Poolgrößen und absolutem ^3H -Cholin-Einbau in Phospholipid der BALF wurden auf das wiedergefundene Volumen der BALF bezogen.

	Kontrolle (n = 8/21)	2d 85% O₂ (n = 6/8)	7d 85% O₂ (n = 6/6)
Volumen vor Perfusion (ml)	30 ± 2	28 ± 2	27 ± 2
Volumen nach Perfusion (ml)	28 ± 2	27 ± 3	22 ± 2

Tabelle 19: Wiedergewonnenes Volumen der BALF vor und nach isolierter Lungenperfusion

Die Ratten wurden mit 4 · 8 ml physiologischer Kochsalzlösung bronchoalveolär lavagiert. Angegeben ist das wiedergewonnene Volumen. Daten sind MW ± SD.

Teil B – Der hyperoxische Lungenschaden

3.5. Einfluß der Hyperoxie auf das Körper- und Lungengewicht

Der akute hyperoxische Lungenschaden mit einer adaptativen Sauerstoffdosis (2 d 85% O₂) führte bei den Tieren nicht zu einer sichtbaren Veränderung des Verhaltens im Sinne eines Krankheitsgefühls. Verweigern des Fressens, Apathie o.ä. wurden nicht beobachtet. Das Wachstum war, wie an der normalen Gewichtsentwicklung (siehe Abbildung 28) erkennbar ist, bis zu diesem Zeitpunkt nicht verzögert. Nach siebentägiger Begasung mit 85% O₂ waren die Tiere in ihrem Wohlbefinden jedoch erheblich beeinträchtigt. Sie nahmen weniger Futter und Wasser auf, verloren gegenüber der Kontrolle erheblich an Gewicht, sträubten das Fell und rollten sich zusammen. Die Veränderung des Körpergewichts während der Begasung mit 21% O₂ bzw. 85% O₂ ist in Abbildung 28 dargestellt.

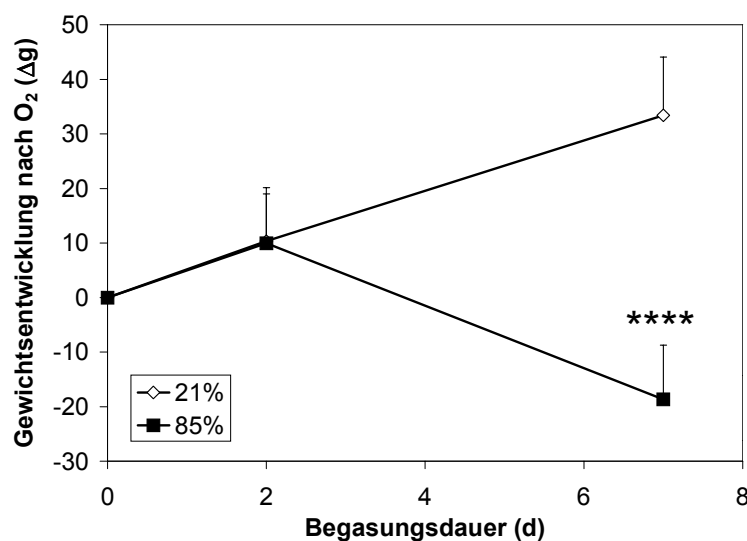


Abbildung 28: Veränderung des Körpergewichtes während der Begasung mit 21% bzw. 85% O₂

Die Tiere wurden vor der Begasung und im Anschluß daran gewogen. Dargestellt ist die Gewichtsänderung zum Ausgangswert in g Körpergewicht. Daten sind MW ± SD. n = 13-22. Signifikanz gegenüber Kontrolle: **** p < 0,0001

Tabelle 20 zeigt das mittlere Körpergewicht der Versuchsgruppen vor und nach der hyperoxischen Begasung. Der Variationskoeffizient liegt in allen Gruppen unter 10%, und das mittlere Körpergewicht unterscheidet sich zwischen den drei Versuchsgruppen nur geringfügig.

	Kontrolle	2d 85% O₂	7d 85% O₂
Körpergewicht vor Begasung (g)	219 ± 17	223 ± 21	238 ± 11 (*)
Körpergewicht nach Begasung (g)	235 ± 17	239 ± 15	228 ± 12

Tabelle 20: Körpergewicht vor und nach Begasung

Die Tiere wurden vor der Begasung und im Anschluß daran gewogen. Daten sind MW ± SD. n = 13-22. Signifikanz gegenüber Kontrolle: * p < 0,05

Die Lungen machten sowohl nach zwei Tagen als auch nach sieben Tagen Hyperoxie einen gegenüber der Kontrolle veränderten Eindruck. Nach zwei Tagen wirkten die hyperoxiegeschädigten Lungen bei der isolierten Perfusion dilatiert, nach sieben Tagen steif und vergrößert. Um den letzteren Effekt deuten zu können, wurde bei einigen Tieren das Lungentrockengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht bestimmt (siehe Tabelle 21). Die Tiere wiesen nach zweitägiger hyperoxischer Begasung bei vergleichbarem Körpergewicht auch ein mit der Kontrolle vergleichbares Lungentrockengewicht auf. Nach siebentägiger Hyperoxie dagegen lag das Lungentrockengewicht bei Tieren der gleichen Gewichtsklasse etwa 50-65% über demjenigen der Kontrollgruppe, woraus ein erhöhtes Lungentrockengewicht/Körpergewicht-Verhältnis resultiert.

Kontrolle			2d 85% O₂			7d 85% O₂		
KG	<i>LTG</i>	LTG/KG	KG	<i>LTG</i>	LTG/KG	KG	<i>LTG</i>	LTG/KG
(g)	(mg)	(mg/kg)	(g)	(mg)	(mg/kg)	(g)	(mg)	(mg/kg)
214	169	792	204	187	917	227	281	1239
214	169	792	246	185	753	226	259	1147
236	177	751						
203	168	827						

Tabelle 21: Verhältnis von Lungentrockengewicht (LTG) zu Körpergewicht (KG)

Die Lungen wurden vor der Entnahme mit Perfusionsmedium perfundiert. Das Lungentrockengewicht wurde nach Erreichen der Gewichtskonstanz bei 80 °C (72 h) ermittelt.

3.6. Histologische Veränderungen durch Hyperoxie

In der Literatur wurden charakteristische Veränderungen der Lungenmorphologie durch Sauerstoffintoxikation beschrieben (siehe Einleitung). Während in der Akutphase des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens (85% O₂) außer einer Aufweitung des Kapillarlumens keine Veränderungen zu beobachten sind [Crapo, 1980], kommt es in der adaptativen Phase zu einer Zellproliferation und zum Einstrom von Leukozyten. Im Zuge dieser Prozesse findet man eine

zelluläre und nichtzelluläre Verdickung des Interstitiums und des Alveolarepithels. Auch das Kapillarendothel weist einen größeren Durchmesser auf, was aber nicht auf eine Zellvermehrung zurückzuführen ist, sondern auf eine Hypertrophie derjenigen Endothelzellen, die den erhöhten Sauerstoffpartialdruck überlebt haben [Crapo, 1980]. Bei adulten Ratten wurden nach 2-8 Tagen bei 85% O₂ peribronchioläre und perivaskuläre Ödeme gefunden [Kimball et al, 1976].

Zur Validierung und Charakterisierung des Modells des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens wurden in allen drei Versuchsgruppen sowohl histologische Schnitte der Lunge angefertigt als auch die Zellen der BALF differenziert. Weiterhin wurde die Zellproliferation durch immunhistochemische Detektion von eingebautem BrdU untersucht und das Vorkommen von mononukleären Phagozyten in der Lunge mittels immunhistochemischer Färbung gegen ED1 dargestellt.

3.6.1. Veränderungen in der Lungenmorphologie durch 85% O₂

Nach der Begasung mit Druckluft über sieben Tage fand sich auf den mit Hämatoxylin/Eosin gefärbten Lungenschnitten eine normale Lungenstruktur (siehe Abbildung 29a). Die Lunge stellt sich als Organ von schwammartigem Aussehen dar. Bei den wabenartigen Strukturen handelt es sich um polygonale Alveolen mit den dazwischenliegenden dünnwandigen Alveolarsepten; größere Hohlräume stellen Sacculi alveolares dar. Angeschnittene Septen erscheinen als polygonale, unregelmäßig rot-violett angefärbte Flächen. Bei diesen Strukturen – Alveolen und Sacculi alveolares – handelt es sich um die wesentlichen gasaustauschenden Elemente der Lunge. Die stark vergrößerte Oberfläche und der enge Kontakt zwischen den in den Septen befindlichen Kapillaren und dem Atemgas sind wichtige Voraussetzungen für die Erfüllung der Atemfunktion. Nach zweitägiger hyperoxischer Begasung (85% O₂) ist die Lunge histologisch wenig verändert (siehe Abbildung 29b). Die wabenartige Struktur ist im wesentlichen erhalten, allerdings scheint die Anzahl der Septen etwas vermindert zu sein. Es fanden sich diskrete Hinweise auf interstitielle Ödeme, jedoch nicht auf alveoläre Ödeme. Auch peribronchioläre und perivaskuläre Ödeme fehlen. Nach siebentägiger Begasung mit 85% Sauerstoff bietet die Lunge ein völlig anderes Bild (siehe Abbildung 29c). Die Struktur ist immer noch schwammartig, allerdings ist die regelmäßige, wabenartige Anordnung der Alveolen in weiten Bereichen verschwunden. Die interalveolären Septen sind stark verdickt. Hierbei ist zu bemerken, daß aus der Färbung kein Hinweis auf interstitielle Ödembildung zu erkennen ist. Vielmehr scheint die Verdickung auf eine Vermehrung der Zellzahl oder -größe zurückzuführen

ren zu sein. Es wurden polymorphkernige Granulozyten, aber keine hyalinen Membranen gefunden.

3.6.2. Einbau von BrdU als Zellproliferationsmarker

BrdU wird in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut und kann in Gewebeschnitten mittels eines Antikörpers nachgewiesen werden. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurden die BrdU-positiven Zellen in Lungenschnitten aller drei Untersuchungsgruppen ausgezählt. Wie Tabelle 22 zeigt, wird BrdU in einer gesunden Lunge nur von sehr wenigen Zellen eingebaut (siehe auch Abbildung 30a). Nach zweitägiger Begasung mit 85% O₂ entspricht der Einbau von BrdU demjenigen der Kontrolle (siehe auch Abbildung 30b). Nach siebentägiger Begasung mit 85% O₂ jedoch ist der Einbau von BrdU erhöht (siehe auch Abbildung 30c). Dies läßt auf eine verstärkte Zellproliferation schließen.

Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂
2 (0-4)	1 (0-4)	5 (1-13)
0 (0-2)	1 (0-2)	11 (7-38)
2 (0-4)		10 (4-19)
1 (0-1)		

Tabelle 22: Veränderung der Anzahl an BrdU-positiven Zellen durch hyperoxische Begasung

An je einem Schnitt von 4/2/3 (Kontrolle/2 d 85% O₂/7 d 85% O₂) Lungen, die für die Immunhistochemie präpariert wurden, wurde in 11 Abschnitten von je 500µm · 500µm die Anzahl an BrdU-positiven Zellen bestimmt. Angegeben ist Median und Range für jeden einzelnen Schnitt.

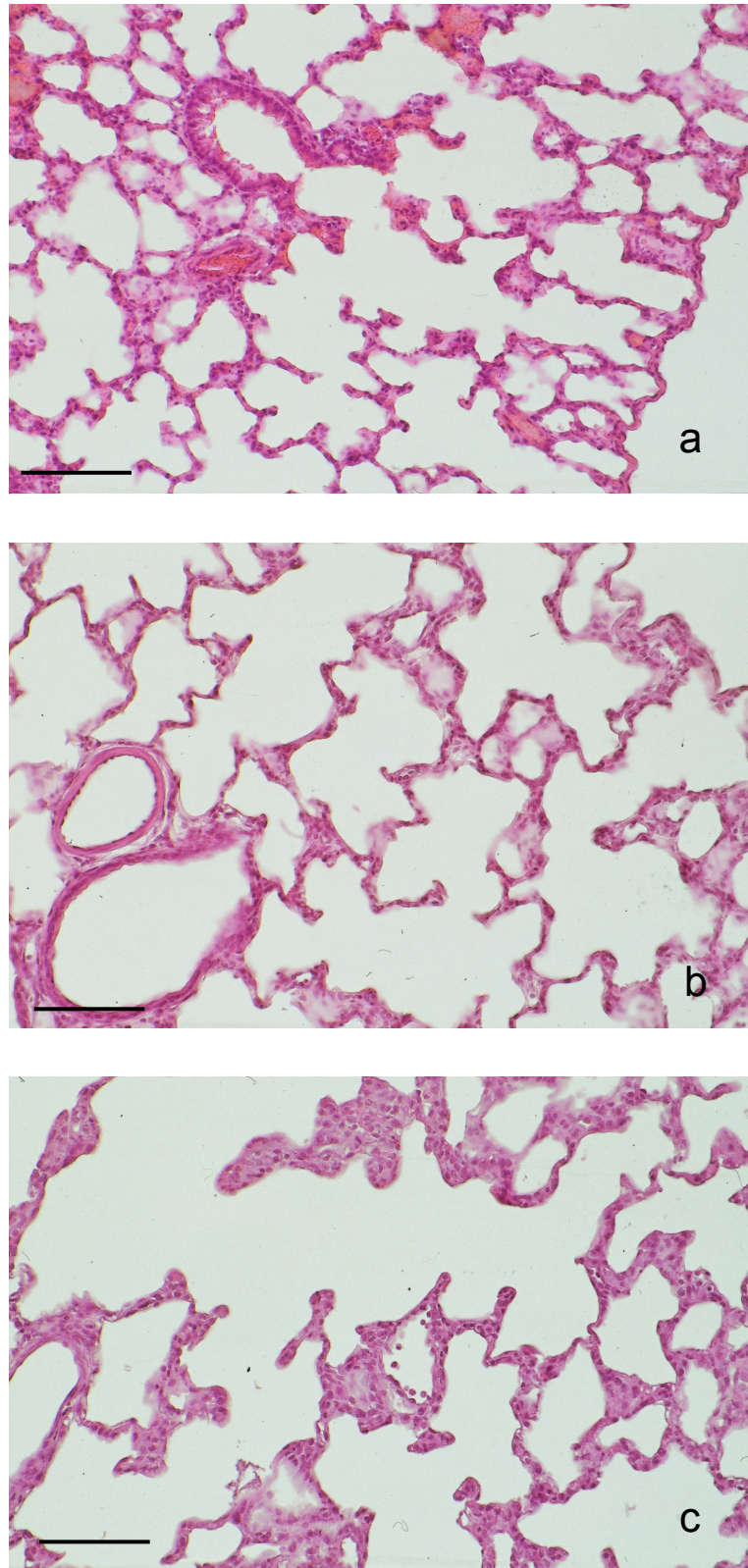


Abbildung 29: histologische Lungenschnitte nach der in vivo-Begasung mit 21% bzw. 85% O₂

a) Kontrolle (7 d 21% O₂), **b)** 2 d 85% O₂, **c)** 7 d 85% O₂. Im Anschluß an die Begasung der Ratte wurde die Lunge in situ unter Ventilation mit Vorperfusionlösung perfundiert und anschließend bei einem PEEP von 3 cm H₂O (300 Pa) mit Fixierungslösung perfusionsfixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden Schnitte angefertigt und mit Hämatoxilin/Eosin gefärbt. — = 100 µm.

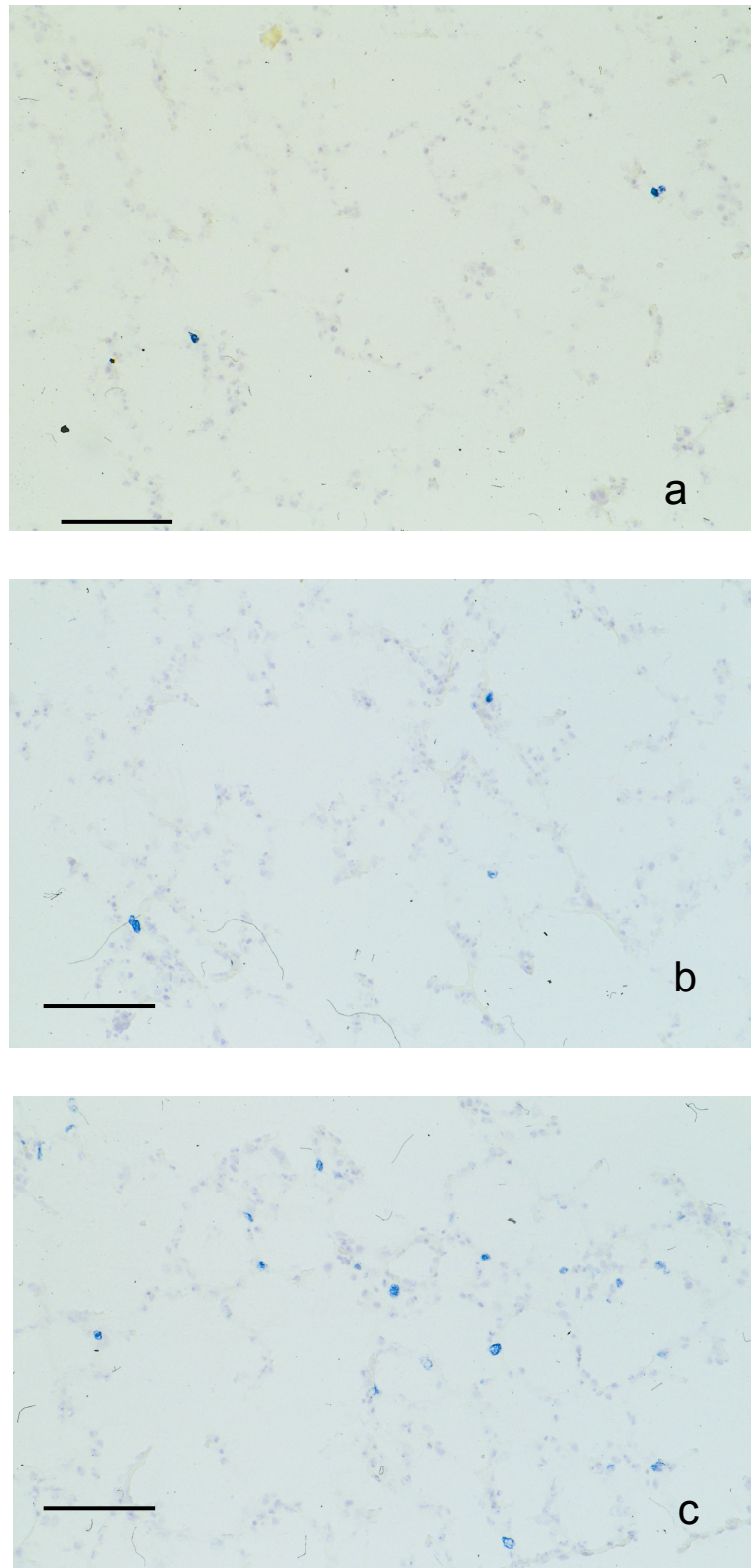


Abbildung 30a: Einbau von BrdU nach Begasung mit 21% bzw. 85% O₂

a) Kontrolle (2 d 21% O₂), **b)** 2 d 85% O₂, **c)** 7 d 85% O₂. Die Lungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Anschließend wurde OCT/PBS intratracheal mit einem Druck von 10 cm Flüssigkeitssäule (980 Pa) instilliert. Die Lungen wurden in kleine Blöcke geschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff konserviert. Nach dem Schneiden erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit anti-BrdU-Antikörper.

— = 100µm

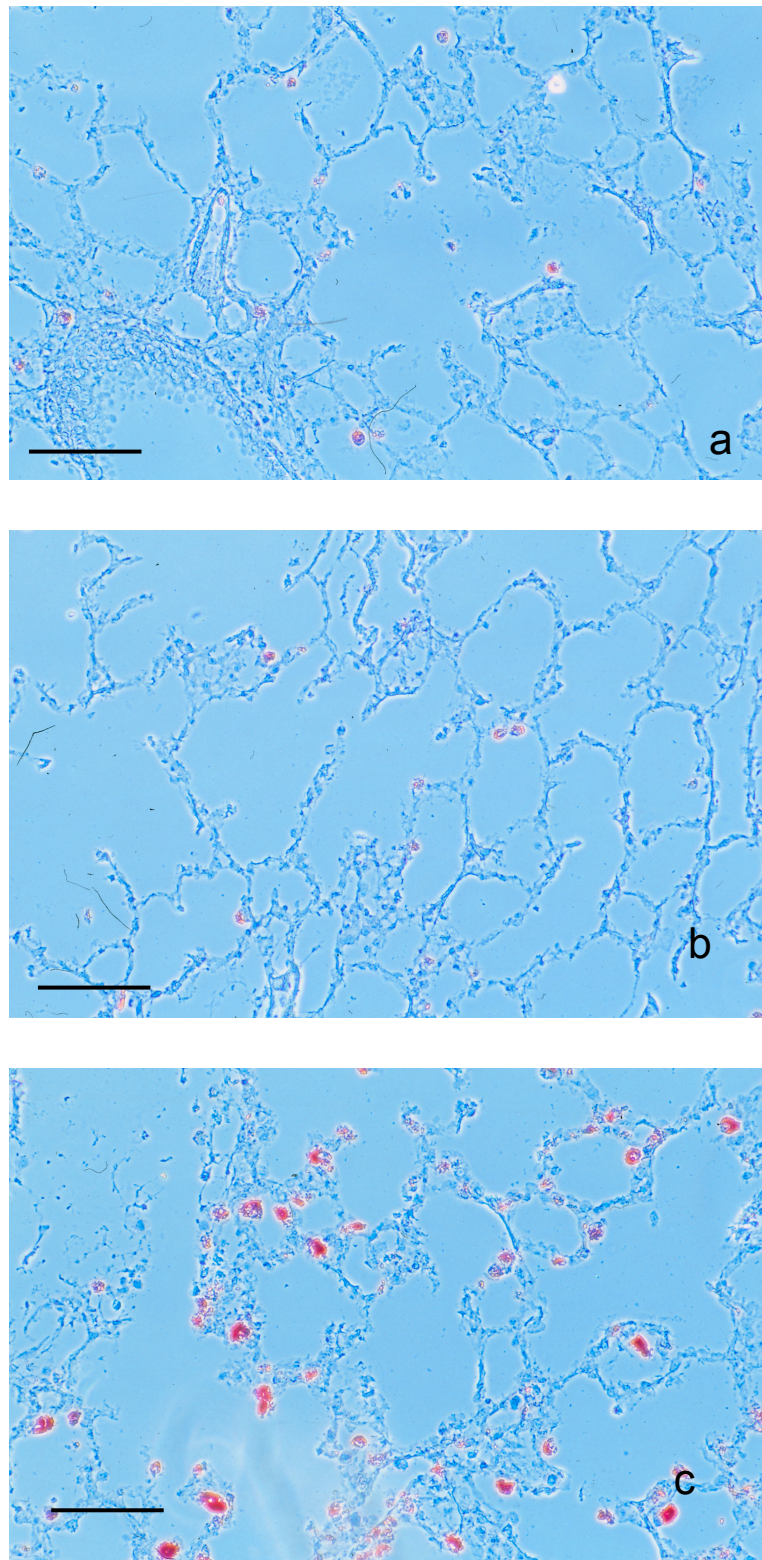


Abbildung 31: Nachweis von Monozyten und Makrophagen nach Begasung mit 21% bzw. 85% O₂

a) Kontrolle (2 d 21% O₂), **b)** 2 d 85% O₂, **c)** 7 d 85% O₂. Die Lungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Anschließend wurde OCT/PBS intratracheal mit einem Druck von 10 cm Flüssigkeitssäule (980 Pa) instilliert. Die Lungen wurden in kleine Blöcke geschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff konserviert. Nach dem Schneiden erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit anti-ED1-Antikörper. — = 100 µm

Immunhistochemischer Nachweis von mononukleären Phagozyten

Zum Nachweis von Monozyteneinwanderung und Makrophagenproliferation wurden Lungenschnitte mit einem Antikörper gegen das cytoplasmatische Protein ED1 gefärbt. Abbildung 31a zeigt einen Lungenschnitt nach zweitägiger Begasung mit 21% O₂. Es finden sich vereinzelt Makrophagen in den Alveolen und Septen. Ihre Zahl ist sehr gering (siehe Tabelle 23). Nach zweitägiger Begasung mit 85% O₂ finden sich ebensowenige ED1-positive Zellen im Lungenparenchym (siehe Abbildung 31b und Tabelle 23). Nach siebentägiger hyperoxischer Begasung (85% O₂) findet sich dagegen eine erhöhte Anzahl an Makrophagen im Lungengewebe (siehe Abbildung 31c und Tabelle 23).

Kontrolle	2d 85% O ₂	7d 85% O ₂
13 (3-42)	4 (1-10)	34 (11-65)
3 (1-11)	14 (5-20)	102 (43-175)
3 (0-12)		88 (70-121)
5 (1-13)		

Tabelle 23: Veränderung der Anzahl an ED1-positiven Zellen durch hyperoxische Begasung

An je einem Schnitt von 4/2/4 (Kontrolle/2 d 85% O₂/7 d 85% O₂) Lungen, die für die Immunhistochemie präpariert wurden, wurde in 11 Abschnitten von je 500µm · 500µm die Anzahl an ED1-positiven Zellen bestimmt. Angegeben ist Median und Range für jeden einzelnen Schnitt.

3.6.3. Veränderung der Menge und Zusammensetzung der Zellen in der BALF

Die durch bronchoalveoläre Lavage gewinnbaren Zellen wurden durch Zentrifugation von der BALF abgetrennt und in PBS resuspendiert. Sie wurden gezählt, auf ihre Vitalität hin untersucht und differenziert.

3.6.3.1. Zellvitalität

Die Vitalität der Zellen in der BALF wurde durch Ausschluß von Trypan-Blau innerhalb von 2 h nach Gewinnung der BALF bestimmt. In allen drei Versuchsgruppen ist die Vitalität der lavagierten Zellen größer als 90% (siehe Tabelle 24) und entspricht damit dem Literaturwert [Weissbach et al, 1994].

Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂
94 ± 2	93 ± 2	94 ± 4

Tabelle 24: Vitalität der Zellen in der BALF

Die Zellen aus der BALF wurden abzentrifugiert und in PBS resuspendiert. Die Zellvitalität wurde durch Ausschluß von Trypan-Blau getestet. Daten sind MW ± SD. n = 10/7/7

3.6.3.2. Zellzahl und –zusammensetzung in der BALF

Die Anzahl der Zellen in der BALF lag nach der Begasung mit 21% O₂ über zwei bzw. sieben Tage zwischen 0,5 und 1,8 · 10⁶ pro Ratte. Nach zwei Tagen Hyperoxie (85% O₂) war diese Zellzahl unverändert. Nach sieben Tagen war die Zahl der lavagierbaren Zellen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (siehe Abbildung 32).

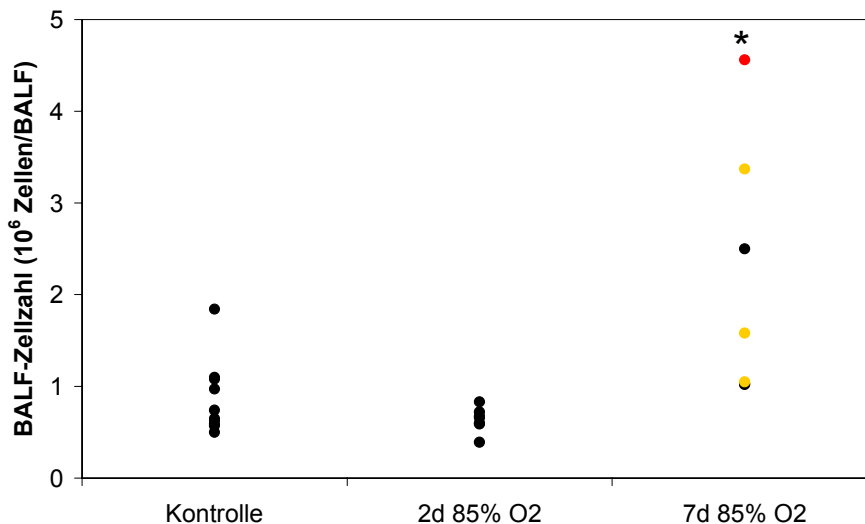


Abbildung 32: Veränderung der Zellzahl in der BALF durch Hyperoxie

Die Lungen wurden mit 4 · 8 ml physiologischer Kochsalzlösung lavagiert und die Zellen bei 200 g pelletiert und in PBS resuspendiert. Einzelwerte. Bei der 7 d 85% O₂-Gruppe sind farbig gekennzeichnet: Tiere mit normaler Zellverteilung (schwarz), Tiere mit Eosinophilie (gelb) und Tiere mit Neutrophilie (rot). Erläuterung im Text. * p < 0,05.

Die Zellen der BALF von Kontrollratten bestanden fast ausschließlich aus Makrophagen. Sie zeigten sich als große, runde, hellblaue Zellen mit großem, rundem, dunkelblau-violettem Kern. Das Plasma war teils durchgehend bläulich, teils mit hellen Vakuolen durchsetzt (siehe Abbildung 33a). Vereinzelt fanden sich segmentkernige neutrophile Granulozyten mit hellem Plasma und violettem Kern, eosinophile Granulozyten mit roten Granula im Plasma und violettem Kern sowie Lymphozyten mit dunkelviolettem Kern und dünnem, dunklem Plasma-saum.

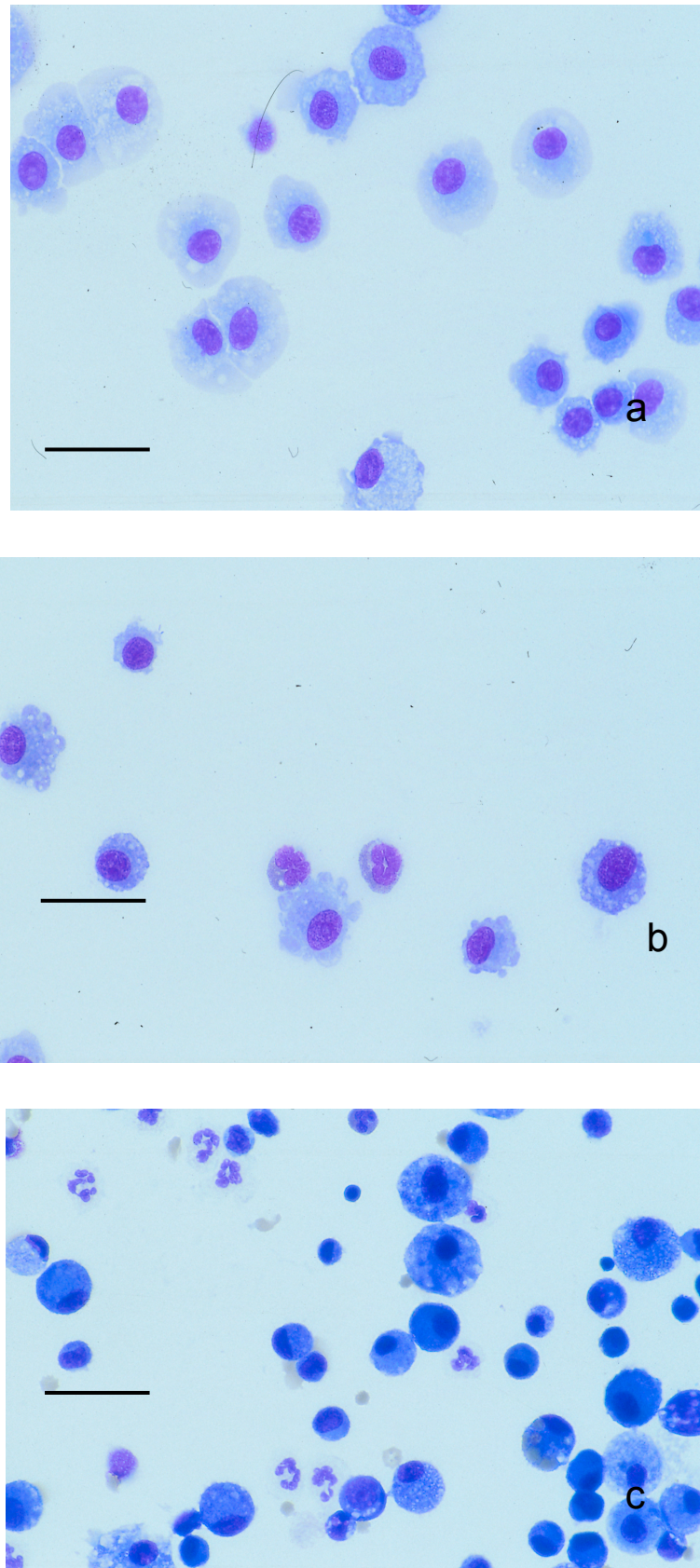


Abbildung 33: Zellen aus der BALF nach Begasung mit 21% bzw. 85% O₂

a) Kontrolle (2 d 21% O₂), b) 2 d 85% O₂, c) 7 d 85% O₂. Die Lungen wurden mit 4 · 8 ml physiologischer Kochsalzlösung lavagiert und die Zellen bei 200 g pelletiert und in PBS resuspendiert. Es wurden Zytospins hergestellt und nach Pappenheim gefärbt. — = 50 µm

Sowohl der hohe Anteil an Makrophagen als auch die Darstellung der Zellen entsprach der Literatur [Weissbach et al, 1994; Costabel, 1994]. Die Zusammensetzung der Zellen in der BALF unterschied sich sowohl nach zweitägiger als auch nach siebentägiger Begasung mit 85% O₂ von derjenigen der Kontrollen. In der Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens war eine leichte Eosinophilie festzustellen, die mit einer Verminderung des Anteils an Makrophagen einherging. Weder Lymphozyten noch neutrophile Granulozyten traten in dieser Phase vermehrt auf. Das Erscheinungsbild der Zellen entsprach zu diesem Zeitpunkt demjenigen der Zellen aus Kontrolllungen (siehe Abbildung 33b). Nach sieben Tagen hyperoxischer Begasung fand sich allgemein eine morphologisch sehr inhomogene Makrophagenpopulation. Ein Teil dieser Zellen war deutlich kleiner und hatte einen unregelmäßig geformten, ovalen oder nierenförmigen Kern. Die Zellen waren zum Teil wesentlich dunkler mit unregelmäßig gefärbtem Plasma. Alle anderen Zelltypen wiesen morphologisch keine Unterschiede zu den entsprechenden Zellen aus Kontrolltieren auf (siehe Abbildung 33c).

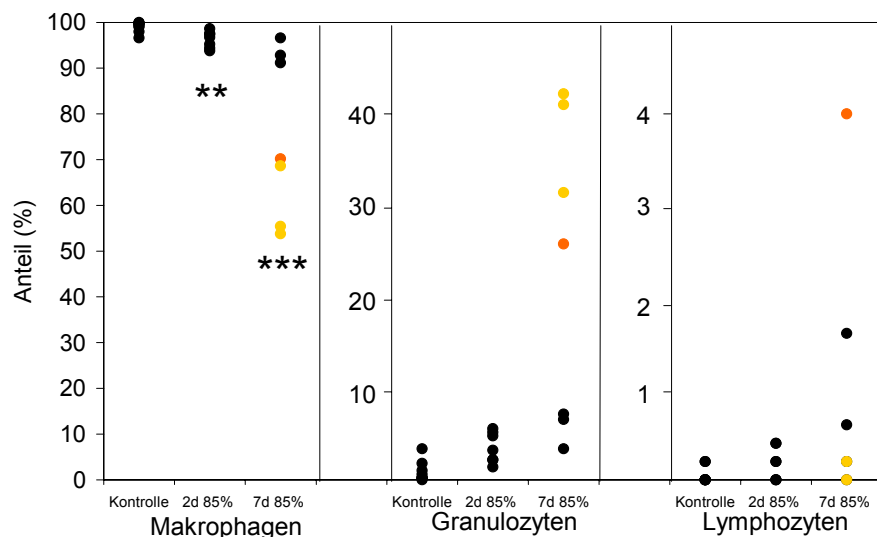


Abbildung 34: Zusammensetzung der durch bronchoalveoläre Lavage gewinnbaren Zellen

Die Lungen wurden mit 4 · 8 ml physiologischer Kochsalzlösung lavagiert und die Zellen bei 200 g pelletiert und in PBS resuspendiert. Es wurden Zytospins hergestellt und nach Pappenheim gefärbt. Je Präparat wurden 500 Zellen ausgezählt.

Die Zusammensetzung der lavagierbaren Zellen war in dieser Gruppe sehr heterogen. Bei einer Gruppengröße von sieben Tieren fanden sich drei unterschiedliche Muster in der Verteilung der Zellen in der BALF.

Drei BALFs (in Abbildung 32 und Abbildung 34 gelb dargestellt) wiesen eine ausgeprägte Eosinophilie auf. Der Anteil an Neutrophilen lag bei 0,6-8,8%; Lymphozyten waren kaum

vorhanden. Die lavagierbare Zellzahl lag in diesen BALFs nicht über dem Bereich der Kontrollen.

Bei drei weitere Proben (in Abbildung 32 und Abbildung 34 schwarz dargestellt) wurde eine normale Zellzahl und ein Makrophagenanteil von 91,2-96,6% festgestellt. Der Anteil der Lymphozyten lag bei 0-1,6%, derjenige der neutrophilen Granulozyten bei 2,8-6,6%.

Die BALF mit der höchsten Zellzahl (in Abbildung 32 und Abbildung 34 rot dargestellt) hatte mit 25,8% den höchsten Anteil an neutrophilen Granulozyten und mit 4% auch den größten Anteil an Lymphozyten. Eosinophile Granulozyten wurden in dieser BALF nicht gefunden.

3.7. Veränderung der Surfactantfunktion durch Hyperoxie

Eine Veränderung der Surfactantfunktion durch Sauerstoffintoxikation wurde von verschiedenen Gruppen sowohl in quasistatischen als auch in dynamischen Meßsystemen beschrieben [Arkovitz et al, 1997; Noguee, 1988; Matalon, 1988]. Dies wurde mit einer Zunahme der Proteinmenge in der BALF in Zusammenhang gebracht [Holm et al, 1985; Said et al, 1964]. Da über die Oberflächenaktivität von Surfactant in der adaptativen bzw. proliferativen Phase des hyperoxischen Lungenschadens noch keine Daten existieren, wurde zur Charakterisierung der Surfactantfunktion nach Begasung mit 85% O₂ über zwei und sieben Tage die Oberflächenaktivität des Surfactant aus BALF im Pulsating Bubble Surfactometer bestimmt. In Tabelle 25 sind die statische Adsorption und die minimale Oberflächenspannung nach 9 und 100 Pulsationszyklen bei einer Phospholipid-Konzentration von 1,33 µmol/ml und 4 µmol/ml aufgeführt.

In der Kontrollgruppe lag der Median der statischen Adsorption bei einer Phospholipidkonzentration von 4 µmol/ml bei dem für aktiven Surfactant zu erwartenden Wert von 25 mN/m [Goerke et al, 1986]. Bei allen Proben verminderte sich im Verlauf der 100 Pulsationen die minimale Oberflächenspannung. Jedoch erreichten bei beiden Phospholipidkonzentrationen nicht alle Proben minimale Oberflächenspannungen < 5 mN/m. Die maximale Oberflächenspannung stieg von der 9. bis zur 100. Pulsation auf 46 bzw. 39 mN/m an.

Nach zweitägiger Begasung mit 85% O₂ unterschied sich Median der statischen Adsorption nicht vom Kontrollwert. Auch in dieser Gruppe verminderte sich die minimale Oberflächenspannung der Proben während der Pulsation der Blase. Bis zum 7. bzw. 50. Pulsationszyklus unterschieden sich die Kurve der Oberflächenspannung dieser Gruppe und der Kontrollgruppe nicht voneinander. Erst im weiteren Verlauf der Messung, d.h. ab dem 9. bzw. 100 Zyklus,

lag die Oberflächenspannung der 2 d 85% O₂-Gruppe über derjenigen der Kontrollgruppe. Die maximale Oberflächenspannung war bei einer Phospholipid-Konzentration von 1,33 µmol/ml mit derjenigen der Kontrolle vergleichbar. Bei 4 µmol/ml lag der Median der maximalen Oberflächenspannung im 100. Pulsationszyklus über demjenigen der Kontrolle. Sowohl die Fähigkeit des Surfactant, sehr kleine Blasen zu stabilisieren, als auch sein Vermögen, bei Vergrößerung der Blase schnell an die Oberfläche zu adsorbieren, sind also zu diesem Zeitpunkt gegenüber der Kontrolle vermindert.

	Kontrolle (n = 12)	2d 85% O₂ (n = 5)	7d 85% O₂ (n = 6)
γ_{ads} (mN/m)			
(1,33 µmol/ml)	31 (23-44)	31 (29-37)	25 (23-30)
(4 µmol/ml)	26 (22-32)	30 (24-32)	25 (23-28)
(9. Pulsation) (mN/m)			
γ_{min} (1,33 µmol/ml)	19 (5-27)	20 (19-23)	21 (10-23)
γ_{max} (1,33 µmol/ml)	40 (32 – 48)	39 (36-45)	32 (28-35) (*)
γ_{min} (4 µmol/ml)	16 (2-20)	20 (19-21) (*)	17 (1-21)
γ_{max} (4 µmol/ml)	36 (30-44)	38 (32-44)	30 (27-33) (**)
γ_{min} (100. Pulsation) (mN/m)			
γ_{min} (1,33 µmol/ml)	8 (2-20)	18 (16-19) (*)	8 (0-17)
γ_{max} (1,33 µmol/ml)	46 (34-54)	45 (41-49)	40 (30-46) (*)
γ_{min} (4 µmol/ml)	6 (1-19)	17 (12-18) (*)	3 (1-17)
γ_{max} (4 µmol/ml)	39 (30-48)	45 (41-48) (*)	36 (30-44)

Tabelle 25: Oberflächenspannung des aus der BALF gewonnenen Surfactants

Surfactant aus BALF wurde bei 80000 g aus der zellfreien Lavageflüssigkeit abzentrifugiert und mit 1,5 mM CaCl₂ in 154 mM NaCl auf eine Konzentration von 1,33 µmol/ml und 4 µmol/ml verdünnt. Er wurde im Pulsating Bubble Surfactometer über 100 Pulsationszyklen analysiert. Daten sind Median und Range. (Signifikanz gegenüber Kontrolle: * p < 0,05; **p < 0,01).

Nach siebentägiger hyperoxischer Begasung lag der Median der statischen Adsorption im Bereich des Kontrollwertes. Auch im weiteren Kurvenverlauf unterschied sich die minimale Oberflächenspannung bei beiden Phospholipid-Konzentrationen nicht von derjenigen der Kontrollgruppe. Die maximale Oberflächenspannung lag im 9. Pulsationszyklus bei beiden Konzentrationen unter derjenigen der Kontrollgruppe, nach 100 Zyklen wurde nur noch für die geringere Phospholipid-Konzentration eine niedrigere maximale Oberflächenspannung gefunden. Der alveoläre Surfactant hat also zu diesem Zeitpunkt eine Oberflächenaktivität,

die wieder auf Kontrollniveau liegt. Die schnelle Adsorption an die Oberfläche ist sogar etwas verbessert.

3.8. Störung der Barriere zwischen Kapillare und Alveole

In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise auf eine Störung der Barriere zwischen Kapillare und Alveole durch Hyperoxie [Ghio et al, 1994; Royston et al, 1990;]. Dies führt zu Ödembildung und Plasmainflux in die Alveole [Stenzel et al, 1993; Ghio et al, 1994; Clerch, 1993; Royston et al, 1990; Gross et al, 1981] und ist wegen der inhibierenden Wirkung verschiedener Plasmaproteine wie Albumin, Hämoglobin oder Fibrinogen auf die Oberflächenaktivität des Surfactant [Holm et al, 1987; Holm et al, 1999; Holm et al, 1988; Enhorning et al, 1993] von großer Bedeutung für die Funktionalität der Lunge. Parameter, an denen sich eine Störung der Barriere zeigen kann, sind das Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht, die Proteinkonzentration und Zusammensetzung in der BALF und die Zusammensetzung der Phospholipide in Lunge und BALF (siehe 3.10.4).

3.8.1. Lungenfeucht- zu Lungentrockengewichtverhältnis

Ein Maß für Flüssigkeitsansammlungen im Interstitium und im Alveolarraum bildet das Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht. Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, liegt das Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht-Verhältnis bei Kontrolllungen etwas unter dem in der Literatur als Normalwert gefundenen Bereich von 5,2 - 5,9 [Clerch et al, 1993; Royston et al, 1990; Bernhard, 1988]. Sowohl in der Akutphase (2 d 85% O₂) als auch in der Adaptationsphase (7 d 85% O₂) des hyperoxischen Lungenschadens steigt dieses Verhältnis leicht über den Normalbereich an.

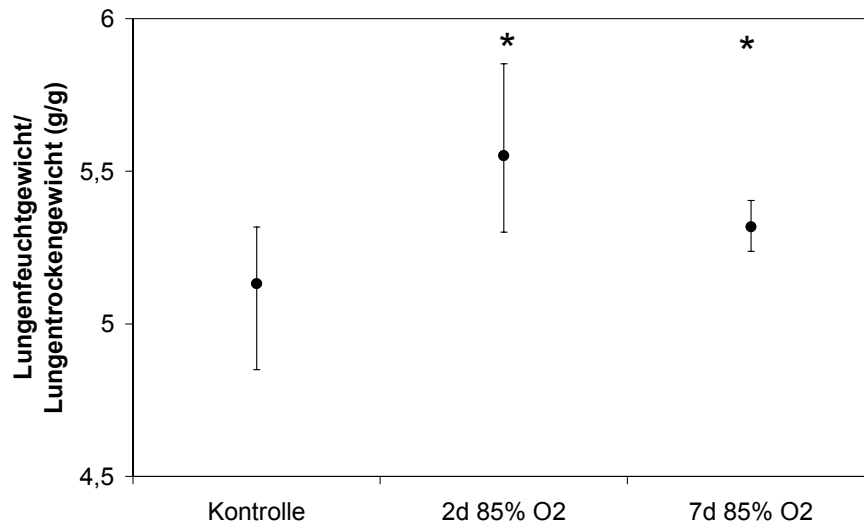


Abbildung 35: Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht

Die Entnahme der Lunge erfolgte nach Perfusion mit Perfusionsmedium. Die rechte und linke Lunge wurden freipräpariert, trocknetupft und sofort getrennt gewogen. Nach Erreichen der Gewichtskonstanz (72 h) wurde erneut gewogen. Daten sind Median \pm Range, n = 7/4/4.

3.8.2. Proteingehalt und -zusammensetzung der BALF

Ein weiteres Indiz für Plasmainflux in die BALF ist die Zunahme an Protein. Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, liegt die Proteinmenge in der BALF von Kontrolllungen in einem sehr engen Bereich. Nach zweitägiger hyperoxischer Begasung (85% O₂) hat sich die Proteinmenge erhöht, der Median des Proteingehalts (rot) der BALF ist auf das dreifache des Kontrollwertes angestiegen. Nach siebentägiger Begasung mit 85% O₂ ist der Median sogar auf das Vierfache des Kontrollwertes angestiegen. In dieser Gruppe fällt zudem eine starke Streuung der Meßwerte auf.

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, worauf die erhöhte Proteinkonzentration in der BALF nach hyperoxischer Begasung zurückzuführen ist, wurde die Proteinzusammensetzung der BALF an einzelnen Proben aller Gruppen untersucht. Ausgewählt wurden hierfür zwei Kontrollproben, die eine sehr gute Oberflächenaktivität (siehe 3.7) aufwiesen (Spur 4 und 5, siehe Abbildung 37), zwei BALFs nach zweitägiger Hyperoxie mit schlechter Oberflächenaktivität (Spur 6 und 7) sowie drei BALFs nach siebentägiger Hyperoxie mit sehr guter (Spur 8 und 9) bzw. mittelmäßiger Oberflächenaktivität (Spur 10).

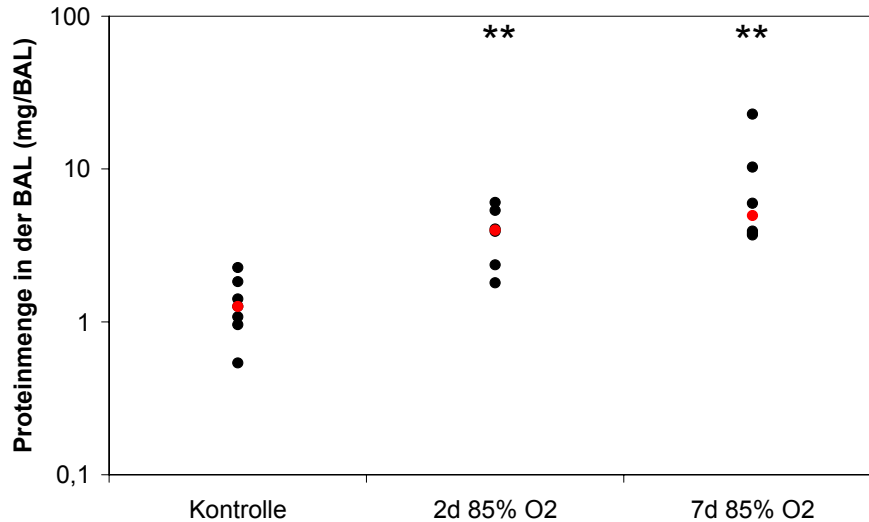


Abbildung 36: Proteinmenge in der BALF

Die Proteinmenge in der BALF wurde mit der Methode von Lowry bestimmt. Daten sind Einzelwerte und Median (rot), n = 7/6/6.

Abbildung 37 zeigt das Bandenmuster nach Auftrennung der Proteine in einem 12%igen Tricin-Gel. Beide Kontrollen weisen ein vergleichbares Muster auf. Eine Hauptbande befindet sich bei 69 kDa. Dabei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Albumin. Eine Doppelbande liegt oberhalb von 45 kDa. Zwei weitere Doppelbanden finden sich zwischen 29 und 36 kDa bzw. 20 und 24 kDa und eine Einzelbande bei 14 kDa. Nach zweitägiger Hyperoxie sind alle diese Banden weiterhin zu detektieren. Jedoch sind die Bande bei 14 kDa und ~22 kDa intensiver angefärbt. Weiterhin sind im Bereich zwischen 29 und 14 kDa zusätzliche Proteinbanden aufgetaucht. Eine Doppelbande oberhalb von 36 kDa, die in der Kontrolle nur schemenhaft zu erkennen ist, ist in diesen beiden Proben deutlich verstärkt. Nach siebentägiger Hyperoxie liegt die Hauptbande weiterhin bei 69 kDa. Die nach 2d 85% O₂ vorhandenen zusätzlichen Banden sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zu detektieren. Von den drei Doppelbanden in der Kontroll-BALF (oberhalb 45 kDa, 29-36 kDa, 20-24 kDa) ist jeweils nur eine Bande übriggeblieben, insbesondere die nach zweitägiger Hyperoxie verstärkte Bande bei ~22 kDa ist nicht mehr zu detektieren.

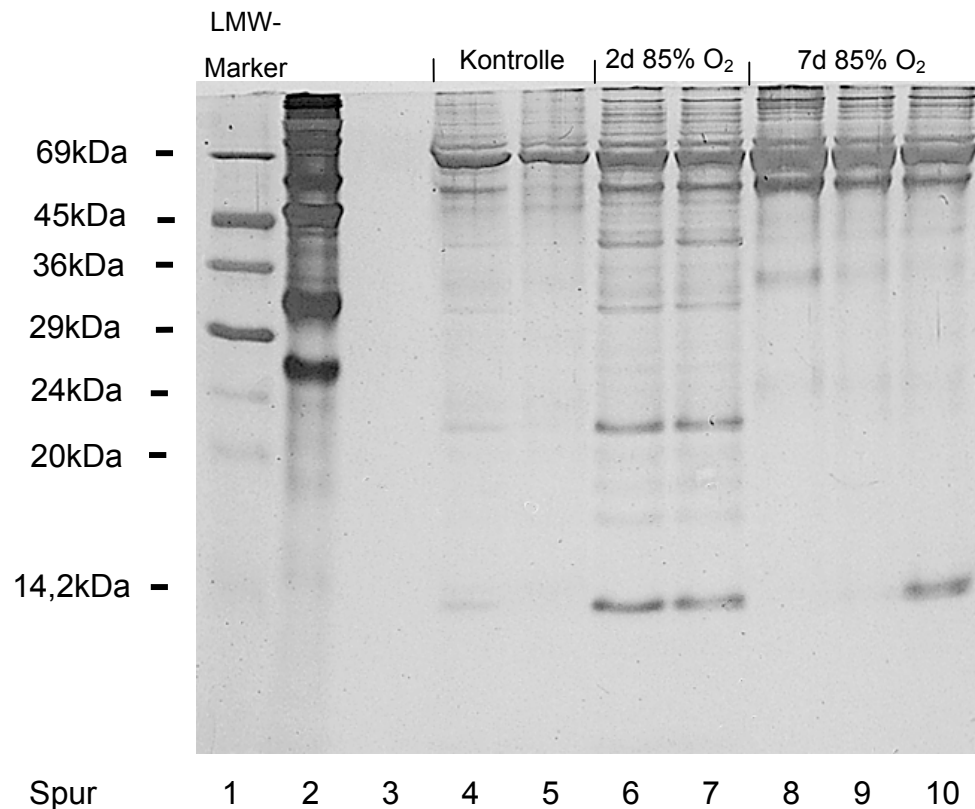


Abbildung 37: Veränderung der Proteinzusammensetzung der BALF durch hyperoxische Begasung

Je 5 µg Protein aus zellfreier BALF wurden lyophilisiert, mit Laemmli-Puffer denaturiert und auf ein 12%iges Tricin-Gel aufgetragen.

3.9. Abhängigkeit der Surfactantfunktion vom PL/Protein –Verhältnis

In der BALF von Ratten nach zweitägiger und siebentägiger Begasung mit 85% O₂ wurden sowohl ein erhöhtes Verhältnis von Lungenfeuchtgewicht zu Lungentrockengewicht als auch eine erhöhte Beladung mit Proteinen als Hinweis auf Plasmainflux gefunden. Da Plasmaproteine die Oberflächenaktivität des pulmonalen Surfactant inhibieren können [Holm et al, 1987; Holm et al, 1999; Holm et al, 1988; Enhorning et al, 1993], wurde der Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt der BALF und der Surfactantfunktion untersucht. Hierzu wurde die minimale Oberflächenspannung nach 100 Zyklen bei einer Phospholipidkonzentration von 1,33 µmol/ml gegen das PL/Protein-Verhältnis aufgetragen. Diese Größen wurden gewählt, weil

- a) ein inhibierender Einfluß sich bei gleicher stöchiometrischer Beladung mit Inhibitoren eher bei einer geringeren Surfactantkonzentration zeigt [Holm et al, 1988] und
- b) die Phospholipid-Konzentration in der BALF sich nach siebentägiger Hyperoxie signifikant von derjenigen der Kontrollgruppe unterscheidet. Die Proteinmenge in der BALF als solche kann deshalb nicht als Maßstab herangezogen werden.
- c) Unterschiede in der Oberflächenspannung des Surfactant lassen sich nicht zu Beginn der Messung, sondern erst im Verlauf nach 50 Zyklen (1,33 $\mu\text{mol/ml}$) bzw. 9 Zyklen (4 $\mu\text{mol/ml}$) feststellen. Dies dokumentiert den erst nach wiederholten Pulsationen meßbaren Unterschied in der Surfactantdynamik.

Bei einer Surfactantkonzentration von 1,33 $\mu\text{mol/ml}$ steigt in der Kontrollgruppe die nach 100 Zyklen gemessene Oberflächenspannung mit sinkendem PL/Protein-Verhältnis ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 38). Je höher also die Proteinbeladung pro Surfactant-Phospholipid-Menge ist, desto schlechter ist die Oberflächenaktivität des Materials. Sowohl die minimale Oberflächenspannung nach 100 Pulsationszyklen als auch die PL/Proteinbeladung überstreichen dabei einen sehr weiten Bereich von 2-18 mN/m bzw. 0,5-2,0 $\mu\text{mol/mg}$.

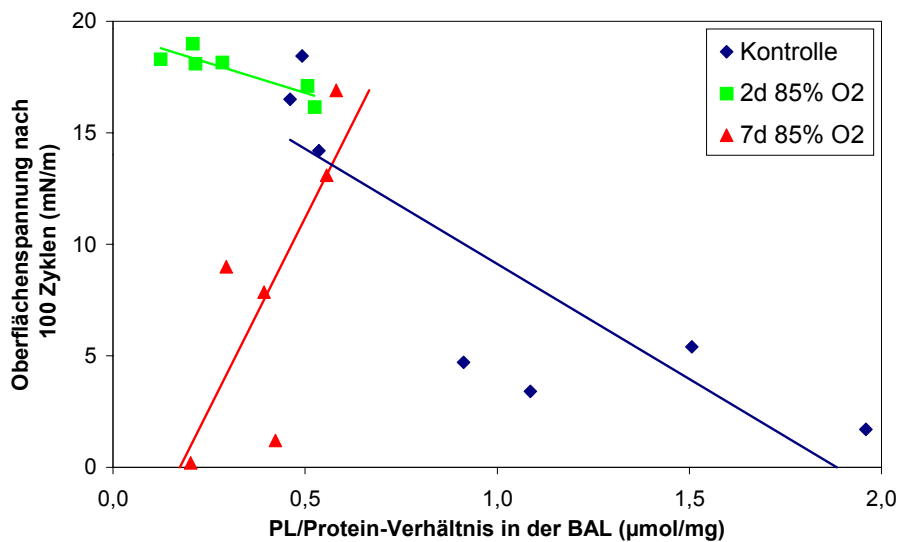


Abbildung 38: Abhängigkeit der Oberflächenaktivität des Surfactant aus BALF von deren PL/Protein-Verhältnis

Der Surfactant wurde aus der zellfreien BALF durch Zentrifugation bei 80000 g isoliert. Die Oberflächenspannung wurde bei einer Phospholipidkonzentration von 1,33 $\mu\text{mol/ml}$ im Pulsating Bubble Surfactometer gemessen. Die Berechnung des PL/Protein-Verhältnis ergibt sich aus dem Formelanhang (Formel 16). Dargestellt sind Einzelwerte und lineare Regressionen innerhalb der Versuchsgruppen.

Auch nach zweitägiger Begasung mit 85% O₂ findet man diese reziproke Proportionalität zwischen minimaler Oberflächenspannung nach 100 Pulsationszyklen und PL/Protein-Verhältnis ($p < 0,05$). Diese Proben haben allerdings im Gegensatz zur Kontrollgruppe alle eine hohe Oberflächenspannung und ein niedriges PL/Protein-Verhältnis. Nach siebentägiger Begasung mit 85% O₂ findet sich tendenziell eine direkte Proportionalität zwischen der Oberflächenspannung und dem PL/Protein-Verhältnis ($p = 0,07$). Bei gleicher Surfactant-Konzentration ist eine höhere Proteinbeladung demnach mit einer Verbesserung der Oberflächenaktivität assoziiert. In dieser Gruppe findet sich wie auch in der 2 d 85% O₂-Gruppe immer ein niedriges PL/Protein-Verhältnis, die Oberflächenspannung dagegen ist wie in der Kontrollgruppe sehr unterschiedlich

3.10. Veränderungen der Phospholipidpools in Lungengewebe, IZS und BALF

Hinweise auf metabolische Veränderungen durch Sauerstoffintoxikation können sich aus einer veränderten Homöostase des Surfactantsystems ergeben. Parameter der Surfactanthomöostase sind die Surfactantpoolgrößen in BALF und Gewebe und die molekulare Zusammensetzung der Surfactantkomponenten, aber auch Synthese, intrazellulärer gerichteter Transport vom rauhen endoplasmatischen Retikulum zu den Lamellarkörperchen (Surfactant-Speicherorganellen), Sekretion, und Recycling. Deshalb wurden zunächst die Phospholipidstoffmenge und -zusammensetzung im intrazellulären Surfactant und im alveolären, durch bronchoalveoläre Lavage gewinnbaren Surfactant im Vergleich mit dem Lungengewebe bestimmt.

Bei Mäusen sehr unterschiedlichen Körpergewichts wurde eine Korrelation zwischen der Phospholipidstoffmenge in der lavagierten Lunge bzw. der BALF und dem Körpergewicht gefunden [Bernhard et al, 1997]. Aus diesem Grund wurde bei der Kontrollgruppe eine Korrelation der Phospholipid-Pools in Lunge, IZS-Pool und BALF mit dem Körpergewicht überprüft. Es konnte hier, offenbar wegen der nur geringen Gewichtsunterschiede (siehe Tabelle 20, Seite 84), keine Korrelation der Phospholipid-Mengen mit dem Körpergewicht festgestellt werden. Auch der ³H-Cholin-Einbau in das Lungen-Phospholipid nach dreistündiger Perfusion korrelierte nicht mit dem Körpergewicht. Deshalb wurden alle Phospholipid-Poolgrößen und ³H-Cholin-Einbaudaten als Absolutgrößen angegeben, d.h. ohne Normierung auf das Körpergewicht.

3.10.1. Phospholipid-Stoffmenge in Lungengewebe, IZS und BALF

Die Phospholipid-Stoffmengen in Lunge, IZS und BALF sind in Abbildung 39 dargestellt. Die lavagierte Lunge einer Kontrollratte enthält im Durchschnitt 25 μmol Phospholipide. Davon befinden sich 3,7 μmol , d.h. ca. 15%, im IZS; hinzu kommen 1,6 μmol bzw. etwa 6% des Gesamtphospholipids der Lungen in der BALF. Nach zweitägiger Hyperoxie ist die Phospholipid-Stoffmenge in der Lunge um etwa 10% erhöht. Beide Surfactant-Phospholipid-Pools dagegen sind zu diesem Zeitpunkt unverändert. Nach siebentägiger hyperoxischer Begasung sind die Poolgrößen in lavagierter Lunge, IZS und BALF im Durchschnitt um 68%, 70% bzw. 78% erhöht (siehe Abbildung 39).

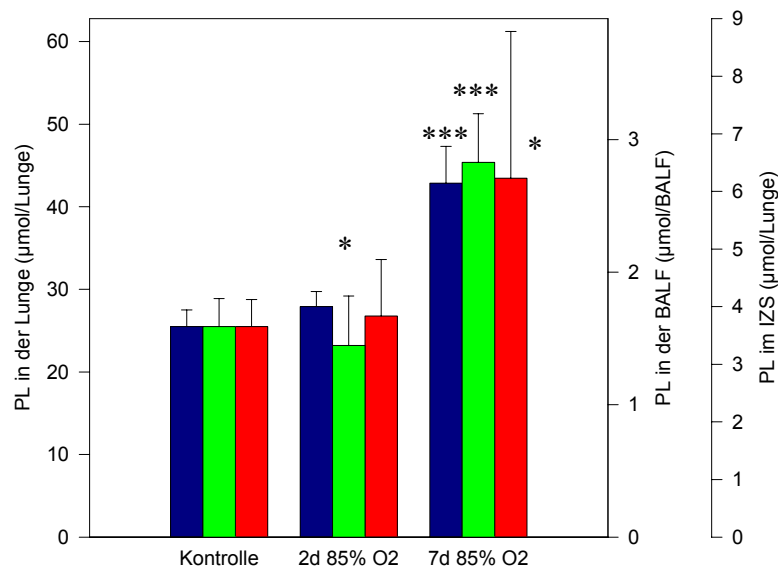


Abbildung 39: Veränderungen der Phospholipid-Stoffmengen in Lungengewebe, IZS und BALF

Lungengewebe und BALF wurden direkt extrahiert, IZS wurde vor der Extraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Berechnung nach Formelanhang (Formeln 1-3). Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$. $n = 6-20$. Signifikanzen gegenüber Kontrolle: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Um zu überprüfen, ob der veränderte Phospholipidpool in der BALF nach siebentägiger Begasung mit 85% O_2 auf die hyperoxische Begasung zurückzuführen ist oder aber durch die veränderten Bedingungen während der dreistündigen isolierten Lungenperfusion zustande kommt, wurde die Phospholipidmenge in der BALF direkt im Anschluß an die Begasung untersucht. Der Phospholipidgehalt der BALF vor und nach Perfusion ist in Tabelle 26 gezeigt. Vor Perfusion wurden durch die bronchoalveoläre Lavage einer Kontrolllunge 1,1 μmol Phospholipid gewonnen, nach Perfusion 1,6 μmol . Nach zweitägiger Begasung mit 85% O_2

wurden vor und nach Perfusion mit der Kontrollgruppe vergleichbare Phospholipidmengen in der BALF gefunden. Auch in dieser Gruppe lag der Phospholipidgehalt nach Perfusion höher. Nach siebentägiger Begasung wurde im Vergleich zur Kontrolle sowohl vor als auch nach der isolierten Lungenperfusion mehr Phospholipid in der bronchoalveolären Lavage gefunden. Dies zeigt, daß die Erhöhung der Phospholipidmenge in der BALF nach siebentägiger Begasung mit 85% Sauerstoff nicht ein Effekt ist, der durch die isolierte Lungenperfusion hervorgerufen wurde, sondern direkt auf die hyperoxische Begasung zurückzuführen ist.

	Kontrolle	2 d 85% O₂	7 d 85% O₂
Phospholipidgehalt vor Perfusion ($\mu\text{mol}/\text{BALF}$)	1,1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2 (n.s.)	2,7 \pm 1,2 (***)
Phospholipidgehalt nach Perfusion ($\mu\text{mol}/\text{BALF}$)	1,6 \pm 0,2	1,5 \pm 0,4 (n.s.)	2,8 \pm 0,4 (***)

Tabelle 26: Veränderung des Phospholipid-Gehaltes der BALF durch die Perfusion

Im Extrakt der BALF wurde die Phospholipid-Stoffmenge nach der Methode von Bartlett bestimmt. Daten sind MW \pm SD, n = 6-21. Signifikanz gegenüber Kontrolle: *** p < 0,001.

Für alle weiteren Untersuchung der Phospholipid-Pools des IZS und der BALF, d.h. sowohl für die Untersuchung der Zusammensetzung als auch des Einbaus von ³H-Cholin in diese Surfactant-Pools, ist es wichtig, eine Kontamination des einen Pools mit Material des anderen zu vermeiden, da dies zu falschen Ergebnissen führen würde. Da der alveoläre Surfactant in der BALF direkt aus dem IZS hervorgeht und beide deshalb eine nahezu identische Zusammensetzung haben, gibt es aber keine direkt messbaren Indizien auf eine solche Kontamination. Allerdings wurde bei der bronchoalveolären Lavage in allen drei Gruppen mit 31 \pm 4% (Kontrolle), 30 \pm 6% (2 d 85% O₂) bzw. 33 \pm 6% (7 d 85% O₂) ein vergleichbarer Anteil des gesamten Surfactant-Pools gewonnen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß durch die bronchoalveoläre Lavage immer ein vergleichbares, alveoläres Surfactant-Material gewonnen wurde und deshalb die Zusammensetzung der Phospholipide zwischen den Gruppen vergleichbar ist und der Einbau von ³H-Cholin in Phosphatidylcholin der beiden Surfactant-Fractionen in allen drei Gruppen die gleichen metabolischen Prozesse widerspiegelt.

3.10.2. Anteil von Phosphatidylcholin an Phospholipid

In lavagierten Kontrolllungen ist fast die Hälfte des Gesamtphospholipids Phosphatidylcholin. Im IZS und in der BALF ist dieser Anteil noch deutlich höher (siehe Tabelle 27). Das PC/PL-Verhältnis im Lungengewebe ist nach zweitägiger Hyperoxie (85% O₂) vermindert. In beiden

Surfactantpools ändert sich der Anteil von Phosphatidylcholin an Phospholipid zu diesem Zeitpunkt nicht. Nach sieben Tagen ist der Anteil an Phosphatidylcholin im Lungengewebe und im IZS nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert. Es findet sich jedoch ein erhöhter prozentualer Anteil von Phosphatidylcholin in der BALF.

	Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂
Lungengewebe	44 ± 6	35 ± 4 (**)	52 ± 8
IZS	62 ± 6	59 ± 12	67 ± 16
BAL	68 ± 6	69 ± 4	73 ± 2 (*)

Tabelle 27: prozentualer Anteil von Phosphatidylcholin an Phospholipid in Lungengewebe, BALF und IZS

Phosphatidylcholin aus Lungengewebe, IZS und BALF wurde mittels RP-HPLC in seine molekularen Spezies aufgetrennt. Das PC/PL-Verhältnis wurde über den internen Standard ermittelt (siehe Formelanhang, Formel 12). Daten sind MW ± SD. n = 5-20. Signifikanz gegenüber Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.10.3. Stoffmengen und Zusammensetzung der Phosphatidylcholone in Lungengewebe, IZS und BALF

Die molekularen Spezies PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1 und PC16:0/18:1 sind die Hauptbestandteile des Phosphatidylcholins in der BALF von Säugetieren [Bernhard et al, 1997; Schlame et al, 1988; eigene Daten]. Diese vier molekularen Spezies bilden in der BALF 86% und im IZS 80% des Phosphatidylcholins (siehe Tabelle 30 und Tabelle 29) und werden mit der Oberflächenaktivität des Surfactant in Verbindung gebracht (siehe Einleitung). Die mehrfach ungesättigten, arachidonsäure(20:4)- und linoleoyleure(18:2)-haltigen Phosphatidylcholone sind, abgesehen von PC16:0/18:2, in beiden Surfactantfraktionen sowohl bei der Ratte als auch beim Schwein kaum vorhanden (siehe Abbildung 16, Tabelle 29 und Tabelle 30). Im Lungengewebe dagegen sind prozentual weniger der disaturierten und monodesaturierten Spezies und ein höherer Prozentsatz an mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholinen vorhanden (siehe Abbildung 16 und Tabelle 28).

Eine veränderte Zusammensetzung und Stoffmenge der surfactanttypischen Phosphatidylcholin-Spezies speziell in den beiden Surfactantfraktionen kann Hinweis auf einen veränderten Phospholipidmetabolismus sein. Sie ist weiterhin wegen der möglichen Verbindung dieser Substanzen mit der Oberflächenaktivität des Surfactant im Zusammenhang mit der Surfactantdysfunktion in der Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens von Bedeutung. Arachidonsäure als Synthesestufe von Leukotrienen, Prostaglandinen, Thromboxanen und Prostazyklinen spielt eine Rolle in der Entzündungsreaktion. Da der hyperoxische Lungen-

schaden mit einer Entzündungsreaktion einhergeht [Crapo et al, 1980; Minoos et al, 1992, eigene Daten], ist daher eine Veränderung des Arachidonsäurehaushalts der Lunge möglich. Aus diesen Gründen wurde die Zusammensetzung und Stoffmenge sowohl der surfactanttypischen disaturierten und monodesaturierten als auch der mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholine im Lungengewebe, IZS und in der BALF untersucht.

Tabelle 28 zeigt die prozentuale Zusammensetzung und Stoffmengen der Phosphatidylcholine im Lungengewebe. Die Zusammensetzung der molekularen Spezies ist in den einzelnen Gruppen unterschiedlich (Wilks' Lambda < 0,0001). An der Varianz zwischen den drei Versuchsgruppen sind zu einem großen Anteil PC16:0/16:1, PC16:0/20:4 und PC18:0/18:2 und zu einem geringen Teil auch PC16:0/18:2 beteiligt. Drei der vier „surfactanttypischen“ Phosphatidylcholin-Spezies, PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/18:1, liegen demnach nach zwei und sieben Tagen Hyperoxie in einem unveränderten Anteil vor, während der Prozentsatz an drei von vier der mehrfach ungesättigten Spezies durch Hyperoxie verändert ist. Weiterhin zeigt sich, daß alle vier Phosphatidylcholin-Spezies, die zu dem Unterschied zwischen den Versuchsgruppen beitragen, nach zweitägiger Hyperoxie unverändert sind. Ihr Anteil am Phosphatidylcholin ist erst nach siebentägiger Hyperoxie verändert (siehe Tabelle 28). Der Anteil der linoleoylsäurehaltigen Spezies PC16:0/18:2 und PC18:0/18:2 ist zu diesem Zeitpunkt vermindert, wohingegen der Anteil an PC16:0/16:1 und PC16:0/20:4 erhöht ist.

Auch die Stoffmengen der Phosphatidylcholin-Spezies im Lungengewebe unterscheiden sich zwischen den Versuchsgruppen (Wilks' Lambda < 0,001). Zu dieser Varianz tragen alle molekularen Spezies bis auf PC18:0/18:2 mit einem sehr hohen Anteil bei (siehe Tabelle 28). PC18:0/18:2 hat an dieser Veränderung durch Hyperoxie nur einen mittleren Anteil. Auch bei den Stoffmengen der Phosphatidylcholine im Lungengewebe finden sich deutliche Veränderungen nicht nach zweitägiger Hyperoxie, sondern erst nach siebentägiger hyperoxischer Begasung. Alle molekularen Spezies sind zu diesem Zeitpunkt gegenüber der Kontrolle erhöht.

Auch die Zusammensetzung des IZS ändert sich durch hyperoxische Begasung (Wilks' Lambda < 0,001). Alle untersuchten Phosphatidylcholin-Spezies tragen in diesem Fall zu diesen Veränderungen bei, wenn auch in unterschiedlichem Maße (siehe Tabelle 29). Der Anteil an PC16:0/16:0 ist durch hyperoxische Begasung auf Kosten aller anderen molekularen Spezies erhöht. Wenn auch die Gruppengrößen und die großen Schwankungen der Meßwerte nach hyperoxischer Begasung eine detailliertere Auswertung der Daten erschweren, so scheint dieser Effekt insgesamt nach sieben Tagen ausgeprägter zu sein als nach zwei Tagen. Erwäh-

nenswert sind hier die Spezies PC16:0/18:1, PC16:0/18:2 und PC18:0/18:2, deren Anteil durch siebentägige Begasung auf etwa die Hälfte des Kontrollwertes abnimmt.

Molekulare Spezies von PC	rel. Anteil (%PC)			Stoffmenge ($\mu\text{mol/Lunge}$)				
	Kontrolle	2 d 85%	7 d 85%	Kontrolle	2 d 85%	7 d 85%		
		O ₂	O ₂		O ₂	O ₂		
PC16:0/16:0	35 ± 3	35 ± 3	38 ± 3	3,8 ± 0,5	3,4 ± 0,7	8 ± 1	†††	
PC16:0/14:0	4,5 ± 0,6	4,2 ± 0,6	4,0 ± 0,6	0,49 ± 0,07	0,40 ± 0,06	0,9 ± 0,1	†††	
PC16:0/16:1	9 ± 1	8,5 ± 0,7	11 ± 1	†††	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,4 ± 0,4	†††
PC16:0/18:1	15 ± 1	15 ± 1	13,9 ± 0,9	1,7 ± 0,3	1,4 ± 0,3	3,1 ± 0,5	†††	
PC16:0/20:4	4,9 ± 0,4	5,0 ± 0,2	7,0 ± 0,3	†††	0,54 ± 0,08	0,48 ± 0,06	1,5 ± 0,1	†††
PC18:0/20:4	3,2 ± 0,7	3,2 ± 0,7	3,2 ± 0,7	0,35 ± 0,09	0,29 ± 0,04	0,7 ± 0,1	†††	
PC16:0/18:2	10,4 ± 0,4	10,4 ± 0,6	9,6 ± 0,8	†	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,1 ± 0,4	†††
PC18:0/18:2	4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,4	2,7 ± 0,3	†††	0,45 ± 0,09	0,40 ± 0,07	0,6 ± 0,1	††
andere ⁴¹	15 ± 3	15 ± 3	11 ± 2	1,6 ± 0,3	1,4 ± 0,2	2,4 ± 0,6		

Tabelle 28: prozentuale Zusammensetzung und Stoffmenge der Phosphatidylcholin-Spezies im Lungengewebe

Aus dem Phospholipidextrakt des Lungengewebes wurde Phosphatidylcholin mittels Festphasenextraktion präpariert. Die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurde per RP-HPLC analysiert (Berechnung nach Formelanhang, Formel 11). Die Stoffmengen der Phosphatidylcholone wurden über den internen Standard berechnet (siehe Formelanhang, Formel 8). Daten sind MW ± SD. n = 6-20.

Die Stoffmengen der Phosphatidylcholone des IZS verändern sich durch hyperoxische Begasung (Wilks'Lambda < 0,0001). Einen wesentlichen Beitrag zu der Differenz zwischen den Gruppen leistet dabei allerdings nur PC16:0/16:0 (siehe Tabelle 29). Die Stoffmenge aller anderen PC-Spezies ändert sich sowohl nach zwei- als auch nach siebentägiger Hyperoxie nicht (siehe Tabelle 29). Die Stoffmenge von PC16:0/16:0 dagegen ist nach zweitägiger Begasung mit 85% O₂ geringfügig und nach siebentägiger Begasung deutlich erhöht. Dies kommt durch den höheren prozentualen Anteil dieser Substanz an Phosphatidylcholin in Verbindung mit der insgesamt erhöhten Stoffmenge an Phosphatidylcholin zustande.

⁴¹ Summe der Spezies PC18:1/18:1, PC18:1/18:2 sowie der nicht identifizierten molekularen Spezies von Phosphatidylcholin im HPLC-Chromatogramm

Molekulare Spezies von PC	rel. Anteil (%PC)				Stoffmenge (nmol/Lunge)			
	Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂		Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂	
PC16:0/16:0	53 ± 4	65 ± 8	70 ± 10	†††	1100 ± 200	1500 ± 200	2400 ± 900	†††
PC16:0/14:0	9 ± 1	8 ± 1	7,0 ± 0,7	†	180 ± 30	170 ± 30	240 ± 100	
PC16:0/16:1	11 ± 2	7 ± 3	8 ± 5	†	230 ± 50	150 ± 80	240 ± 200	
PC16:0/18:1	7,5 ± 0,8	5 ± 2	4 ± 3	††	160 ± 40	100 ± 50	100 ± 100	
PC16:0/20:4	1,9 ± 0,6	1,6 ± 0,8	2 ± 2	†	60 ± 20	40 ± 20	50 ± 60	
PC18:0/20:4	2,8 ± 0,5	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,3	†	24 ± 9	20 ± 10	20 ± 10	
PC16:0/18:2	8 ± 1	5 ± 2	4 ± 2	†††	170 ± 40	120 ± 60	130 ± 90	
PC18:0/18:2	1,7 ± 0,4	1,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1	†††	40 ± 10	31 ± 7	30 ± 10	
andere ⁴²	7 ± 1	5,6 ± 0,9	6 ± 3		150 ± 40	130 ± 40	160 ± 20	

Tabelle 29: prozentuale Zusammensetzung und Stoffmenge der Phosphatidylcholin-Spezies im IZS

Aus dem Phospholipidextrakt des IZS wurde Phosphatidylcholin mittels Festphasenextraktion präpariert. Die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurde per RP-HPLC analysiert und nach Formelanhang berechnet (Formel 11). Die Stoffmengen der Phosphatidylcholone wurden über den internen Standard berechnet (siehe Formelanhang, Formel 10). Daten sind MW ± SD. n = 5-14.

Hyperoxische Begasung hat auch einen Einfluß auf die Zusammensetzung und Stoffmenge der Phosphatidylcholone in der BALF (Wilks'Lambda < 0,0001). Zu der Veränderung in der Zusammensetzung der BALF tragen drei der vier surfactanttypischen Phosphatidylcholin-Spezies (PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1) sowie PC16:0/20:4 und PC18:0/18:2 bei (siehe Tabelle 30). Bis auf PC16:0/16:0 zeigen sich hier wesentliche Effekte noch nicht nach zweitägiger Hyperoxie, sondern erst nach sieben Tagen 85% O₂. Im Gegensatz zum IZS ist in der BALF der Anteil an PC16:0/16:0 durch Hyperoxie vermindert. Dieser Effekt ist nach 7 d 85% O₂ ausgeprägter als nach 2 d 85% O₂. Auch der Anteil an PC16:0/14:0 ist nach sieben Tagen Hyperoxie vermindert, der Anteil an PC16:0/16:1 und PC16:0/20:4 ist zu diesem Zeitpunkt dagegen erhöht.

Alle Phosphatidylcholin-Spezies mit Ausnahme von PC18:0/18:2 haben einen großen Anteil an der Varianz der Stoffmengen in der BALF bei. Wie auch im IZS und im Lungengewebe sind die Stoffmengen aller molekularer Spezies nach 2 d 85% O₂ unverändert und erst nach siebentägiger Hyperoxie erhöht.

⁴² Summe der Spezies PC18:1/18:1, PC18:1/18:2 sowie der nicht identifizierten molekularen Spezies von Phosphatidylcholin im HPLC-Chromatogramm

Molekulare Spezies von PC	rel. Anteil (%PC)				Stoffmenge (nmol/BALF)			
	Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂		Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂	
PC16:0/16:0	59 ± 5	55 ± 1	53 ± 2	†	620 ± 90	600 ± 40	1020 ± 90	†††
PC16:0/14:0	9,2 ± 0,9	9,3 ± 0,3	7,5 ± 0,5	†††	100 ± 20	100 ± 10	140 ± 10	†††
PC16:0/16:1	13 ± 3	14,8 ± 0,6	20 ± 1	†††	140 ± 40	160 ± 20	380 ± 60	†††
PC16:0/18:1	4 ± 1	4,4 ± 0,3	5,0 ± 0,3		50 ± 10	48 ± 6	100 ± 10	†††
PC16:0/20:4	1,9 ± 0,6	2,3 ± 0,3	3,4 ± 0,5	†††	21 ± 8	25 ± 5	70 ± 10	†††
PC18:0/20:4	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1		4 ± 2	5 ± 2	9 ± 1	†††
PC16:0/18:2	8 ± 2	9,3 ± 0,6	8,2 ± 0,6		80 ± 30	100 ± 10	160 ± 20	†††
PC18:0/18:2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,2	††	7 ± 2	9 ± 1	9 ± 3	
andere ⁴³	3,7 0,6	3,2 ± 0,2	2,5 ± 0,1		39 ± 8	35 ± 4	49 ± 3	

Tabelle 30: prozentuale Zusammensetzung und Stoffmenge der Phosphatidylcholin-Spezies in der BALF

Aus dem Phospholipidextrakt der BALF wurde Phosphatidylcholin mittels Festphasenextraktion präpariert. Die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurde per RP-HPLC analysiert (siehe Formelanhang, Formel 11). Die Stoffmengen der Phosphatidylcholone wurden über den internen Standard berechnet (siehe Formelanhang, Formel 9). Daten sind MW ± SD. n = 5/7/20.

3.10.4. Einfluß von Plasma-Phosphatidylcholin auf die Phosphatidylcholone in BALF und Lungengewebe

Die Veränderung des Verhältnisses von Lungenfeuchtgewicht zu Lungentrockengewicht durch Hyperoxie ist ein Hinweis auf einen Influx von Blutplasma in das Lungengewebe, d.h. auf die Bildung eines interstitiellen Ödems. Da Plasma eine hohe Konzentration an Phosphatidylcholin enthält [Hunt et al, 1996], könnte sich ein Einstrom von Blutplasma auch in der Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin des Lungengewebes bemerkbar machen. Um zu untersuchen, ob die gefundenen Veränderungen in den Stoffmengen der Phosphatidylcholin-Spezies im Lungengewebe und in der BALF auf Plasmainflux zurückzuführen sein könnten, wurde in allen drei Untersuchungsgruppen die Stoffmenge der verschiedenen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin im Plasma untersucht.

⁴³ Summe der Spezies PC18:1/18:1, PC18:1/18:2 sowie der nicht identifizierten molekularen Spezies von Phosphatidylcholin im HPLC-Chromatogramm

Das Plasma einer gesunden Ratte enthält im Durchschnitt 2,0 $\mu\text{mol/ml}$ Phospholipide. Der Anteil an Phosphatidylcholin liegt bei 41%. 73% der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin sind arachidonsäure- bzw. linolsäurehaltig (siehe Tabelle 31). Disaturierte und monodesaturierte Spezies, die im Lungengewebe und im Surfactant einen hohen Anteil der Phosphatidylcholine ausmachen (siehe Tabelle 28 - Tabelle 30), sind dagegen nur zu insgesamt 13,5% enthalten. Wie Tabelle 31 zeigt, ändert sich die Konzentration der linolsäure- und arachidonsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies im Plasma unter dem Einfluß von Hyperoxie nicht.

	Kontrolle (n = 7)	2 d 85% O ₂ (n = 4)	7 d 85% O ₂ (n = 4)
PL ($\mu\text{mol/ml}$)	2,0 \pm 0,3	1,8 \pm 0,3	1,6 \pm 0,1
PC ($\mu\text{mol/ml}$)	0,7 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2	0,62 \pm 0,04
PC-Spezies			
16:0/16:0	2,4 \pm 0,7	2,3 \pm 0,3	2,0 \pm 0,8
16:0/14:0	1,7 \pm 0,4	1,7 \pm 0,4	1,9 \pm 0,3
16:0/16:1	4,5 \pm 0,4	3,6 \pm 0,3	3,1 \pm 0,7
16:0/18:1	4,9 \pm 0,9	3,9 \pm 0,6	4,6 \pm 1,0
16:0/20:4	11 \pm 1	9,2 \pm 0,6	10 \pm 1
18:0/20:4	16 \pm 3	16,3 \pm 0,5	17 \pm 1
16:0/18:2	26 \pm 1	27 \pm 1	27 \pm 1
18:0/18:2	20 \pm 2	25 \pm 1	23 \pm 1
andere ⁴⁴	10 \pm 2	7,8 \pm 0,9	9 \pm 2

Tabelle 31: Phospholipid- und Phosphatidylcholinmenge im Blutplasma und prozentuale Zusammensetzung der molekularen Phosphatidylcholin-Spezies

Aus Blutplasma wurde mittels Extraktion und Festphasenextraktion Phosphatidylcholin präpariert und über RP-HPLC analysiert. Die Stoffmenge an Phospholipid und Phosphatidylcholin sowie die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin wurden nach Formelanhang (Formel 11) berechnet. Daten sind MW \pm SD. n = 7/4/4.

Der hohe Anteil an Phosphatidylcholin in Verbindung mit der sehr charakteristischen Zusammensetzung, die sich von derjenigen des Lungengewebes und der BALF grundsätzlich unterscheidet, läßt vermuten, daß interstitielle bzw. alveoläre Ödeme mit einer Veränderung der Stoffmenge gerade der arachidonsäure- und linolsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies im Lungengewebe bzw. der BALF einhergehen. Die Stoffmenge der surfactanttypischen Spe-

⁴⁴ PC18:1/18:2, PC18:1/18:1 und unbekannte Phosphatidylcholin-Spezies

zies sollte dagegen erst durch massiven Plasmainflux verändert werden, da diese nur in geringen Mengen im Blutplasma vorkommen (siehe Tabelle 31).

Aus den mittleren Konzentrationen der mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholin-Spezies im Blutplasma läßt sich errechnen, welches Plasmavolumen nötig ist, um die nach sieben Tagen 85% O₂ gefundene Erhöhung der Stoffmenge dieser Spezies im Lungengewebe und der BALF zu bewirken (siehe Tabelle 32). Um beispielsweise die Stoffmenge von PC18:0/18:2 im Lungengewebe von 0,5 µmol (Kontrollwert, siehe Tabelle 28) um 0,1 µmol auf 0,6 µmol (7 d 85% O₂, siehe Tabelle 28) anzuheben, wäre ein Influx von 0,7 ml Plasma in das Gewebe nötig. Um die im Lungengewebe gefundene Erhöhung der Stoffmenge von PC16:0/20:4, PC18:0/20:4 und PC16:0/18:2 zu bewirken, ist sogar ein noch größeres Plasmavolumen nötig (siehe Tabelle 32). Diese Zahlen machen deutlich, daß ein interstitielles Ödem zwar an der Veränderung der Stoffmengen der Phosphatidylcholin-Spezies beteiligt sein kann, aber nicht die alleinige Ursache hierfür sein kann. In der BALF ist nach siebentägiger Hyperoxie (85% O₂) zwar die Stoffmenge an PC16:0/20:4, PC18:0/20:4 und PC16:0/18:2 erhöht, nicht aber die Menge an PC18:0/18:2 (siehe Tabelle 30). Da PC18:0/18:2 im Plasma aber in großen Mengen vorliegt, ist ein Einfluß von Plasma-Phospholipid auf die Zusammensetzung und Stoffmenge der BALF auszuschließen. Die erhöhte Stoffmenge der anderen linol- und arachidonsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies des Plasmas in der BALF nach siebentägiger hyperoxischer Begasung muß daher eine andere Ursache haben.

	PC16:0/20:4	PC18:0/20:4	PC16:0/18:2	PC18:0/18:2
Konzentration im Plasma (µmol/ml)	0,061 ± 0,007	0,102 ± 0,009	0,17 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Δ n/Lunge (µmol)	1,0	0,3	1,1	0,1
Plasmaäquivalent (ml)	16	3	6	0,7
Δ n/BALF (µmol)	0,05	0,005	0,08	0
Plasmaäquivalent (ml)	0,8	0,05	0,05	

Tabelle 32: Poolgrößenäquivalente der linolsäure- und arachidonsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies von Blutplasma

Aus der mittleren Konzentration der Haupt-Phosphatidylcholin-Spezies im Blutplasma und der Änderung der Stoffmenge Δn dieser Spezies im Lungengewebe und der BALF nach siebentägiger Begasung mit 85% O₂ wurde das Plasmavolumen errechnet, welches dieser Stoffmengenerhöhung äquivalent ist.

3.10.5. Einfluß von neutrophilen Granulozyten auf die Phosphatidylcholine des Lungengewebes

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die veränderte Zusammensetzung und erhöhte Stoffmenge der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin im Lungengewebe zu erklären, ist das Einwandern von Entzündungszellen mit ihrer sehr spezifischen Phospholipidzusammensetzung. Die Einwanderung von polymorphkernigen Granulozyten und Monozyten in die Lunge wurde unter Begasung mit einer adaptativen Sauerstoffdosis beschrieben [Crapo et al, 1980]. Auch die Änderungen in der Zahl der Leukozyten in der BALF und der Entzündungszellen im Lungengewebe in den hier beschriebenen Versuchen (siehe 3.6, Seite 84) gibt einen Hinweis darauf, daß unter einer Schädigung des Organismus durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck Entzündungszellen in die Lunge einwandern. Aus diesem Grund wurden neutrophile Granulozyten aus dem Peritoneum von Ratten gewonnen und auf ihre Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies hin untersucht.

	Prozentuale Zusammensetzung	Stoffmenge pro 10⁷ Zellen (nmol)
PC		26 ± 4
PC-Spezies		
16:0/16:0	14,2 ± 0,6	3,6 ± 0,4
16:0/14:0	1,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1
16:0/16:1	1,7 ± 0,3	0,4 ± 0,0
16:0/18:1	14 ± 1	3,6 ± 0,5
16:0/20:4	5,8 ± 0,3	1,5 ± 0,2
18:0/20:4	10,5 ± 0,9	2,7 ± 0,5
16:0/18:2	15 ± 1	3,8 ± 0,9
18:0/18:2	8,4 ± 0,6	2,2 ± 0,5
andere	29 ± 1	7,3 ± 0,8

Tabelle 33: Phospholipid- und Phosphatidylcholinmenge und Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus dem Peritoneum von Ratten gewonnen. Phosphatidylcholin wurde präpariert und mittels RP-HPLC auf die Zusammensetzung seiner molekularen Spezies untersucht. Daten sind MW ± SD. n = 3.

Die Haupt-Phosphatidylcholin-Spezies der neutrophilen Granulozyten sind in Tabelle 33 dargestellt. Mehr als 50% des gesamten Phosphatidylcholins in den gewonnenen neutrophilen

Granulozyten besteht aus den vier Subspezies PC16:0/16:0, PC16:0/18:1, PC16:0/18:2 und PC18:0/20:4. Die Stoffmenge aller dieser molekularen Spezies sind nach 2 d 85% O₂ in der Lunge unverändert. Nach sieben Tagen hyperoxischer Begasung jedoch sind alle vier Spezies in der Lunge um 5 µmol (PC16:0/16:0), 1,5 µmol (PC16:0/18:1), 1,1 µmol (PC16:0/18:2) bzw. 0,33 µmol (PC18:0/20:4) erhöht (siehe Tabelle 28). Es ist also möglich, daß zu der Erhöhung der Stoffmenge dieser Phosphatidylcholin-Spezies ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten beiträgt. Man muß allerdings bedenken, daß die Stoffmenge dieser Phosphatidylcholins in den neutrophilen Granulozyten mit 2,7-3,8 nmol pro 10⁷ Zellen sehr gering ist. Allein um die Erhöhung der Stoffmenge an PC18:0/20:4 zu erklären, wären 1,3 · 10⁹ neutrophile Granulozyten nötig. Auch ist z.B. PC16:0/16:1 nach siebentägiger Hyperoxie um 1600 nmol erhöht, was der Stoffmenge aus 4 · 10¹¹ neutrophilen Granulozyten entspricht. Unter vergleichbaren Bedingungen wurden jedoch nur 9,2 · 10⁷ polymorphkernige Granulozyten pro Lunge gefunden [Crapo, 1980]. Es können demnach nicht alle gefundenen Veränderungen auf den Einstrom dieser Zellen zurückgeführt werden.

3.11. Surfactant-Phospholipidmetabolismus in der isolierten perfundierten Rattenlunge

Zur Untersuchung des Surfactant-Phospholipidmetabolismus wurde das Modell der isolierten perfundierten ventilierten Rattenlunge gewählt, weil es bei der Untersuchung des hyperoxischen Lungenschadens gegenüber anderen Modellen wie z.B. in vivo-Markierungen, isolierten Typ-II-Pneumozyten oder Lungenschnitten in Kultur entscheidende Vorteile hat (siehe Diskussion). Mit ³H-Cholin als Surfactant-Vorstufe wurde eine Substanz ausgewählt, die im intakten Organismus von der Lunge aus dem Blut aufgenommen wird [Batenburg, 1992]. ³H-Cholin wird im Lungengewebe vorwiegend von den Typ-II-Pneumozyten als hydrophile Kopfgruppe in Phosphatidylcholin eingebaut (siehe Einleitung). Die Phosphatidylcholin-Synthese findet am endoplasmatischen Retikulum statt. Sie schließt die *de novo*-Synthese wie auch das nachträgliche Remodelling der Fettsäuren primär markierter Phosphatidylcholin-Spezies ein (siehe Einleitung). ³H-markiertes Phosphatidylcholin ist nach dem intrazellulären Transport vom endoplasmatischen Retikulum in den in Lamellarkörperchen gespeicherten Surfactant und der Sekretion des neusynthetisierten Materials sowohl im organischen Extrakt des Lungengewebes als auch in den Lipidextrakten des intrazellulären und alveolären Surfactants detektierbar. Der Einbau von ³H-Cholin in das Lungengewebe ist linear, während der Einbau in den alveolären Surfactant erst mit ca. einstündiger Verzögerung gemessen werden

kann [Post et al, 1983]. Im Gegensatz zu Fettsäuren oder Acetat als Vorstufen wird Cholin nur in Phosphatidylcholin und Sphingomyelin eingebaut, und eine Mehrfachmarkierung des gleichen Moleküls ist praktisch nahezu ausgeschlossen, da Cholin hierfür innerhalb der Zeitdauer der Perfusion metabolisiert werden müßte.

Da, wie schon erwähnt (siehe 3.10), der Einbau von ^3H -Cholin in das Lungengewebe, offenbar wegen der geringen Gewichtsunterschieden, nicht mit dem Körpergewicht korrelierte, und die Lungenmasse als Bezugsgröße nach der Lavage unzuverlässig erschien, wurden alle ^3H -Cholin-Einbaudaten als ^3H -Aktivität/Lunge bzw. ^3H -Aktivität/BALF angegeben. Auch eine Umrechnung in Stoffmengen ist trotz der bekannten spezifischen Aktivität des ^3H -Cholins (siehe 2.4) nicht sinnvoll, da die spezifische Aktivität des Phosphocholins im Lungengewebe, die im Anschluß an die Perfusion gemessen wurde, geringer ist (siehe 3.11.2). Dies ist vermutlich auf die Aufnahme nicht markierten Surfactantmaterials aus dem Alveolarraum und dessen Degradation zurückzuführen. Da über den Verlauf der ^3H -Phosphocholin-Aktivität über den Perfusionszeitraum keine Aussage gemacht werden kann, wurde auf eine Umrechnung in Stoffmengen verzichtet.

3.11.1. Aufnahme von ^3H -Cholin in die Lunge

Aus der Abnahme der ^3H -Cholinaktivität im Perfusat wurde die Stoffmenge an Cholin errechnet, die von der Lunge aufgenommen wurde. Die Cholinaufnahme ist in Tabelle 34 wiedergegeben. Während einer dreistündigen Perfusion mit einer Anfangskonzentration von $25\ \mu\text{M}$ Cholin im Perfusat nehmen Kontrolllungen $1,1\ \mu\text{mol}$ Cholin auf. Nach zweitägiger hyperoxischer Begasung ist diese Menge unverändert. Nach siebentägiger Begasung mit 85% O_2 steigt die Cholinaufnahme um 44% an.

Gruppe	Einbau von ^3H -Cholin ($\mu\text{mol/Lunge}$)	Einbau im Vergleich zur Kontrolle (% von Kontrolle)
Kontrolle	$1,13 \pm 0,14$	100
2 d 85% O_2	$1,11 \pm 0,10$ (n.s.)	97,7 (-2,3%)
7 d 85% O_2	$1,63 \pm 0,17$ ($p < 0,001$)	144,0 (+44%)

Tabelle 34: Aufnahme von ^3H -Cholin in die Lunge

Aus der Abnahme an Radioaktivität im Perfusat wurde die Aufnahme von ^3H -Cholin in die Lunge berechnet (siehe Formelanhang, Formel 17). Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$. $n = 21/8/6$. Signifikanz gegenüber Kontrolle.

3.11.2. Spezifische Aktivität des Phosphocholinpools

Das von der Lunge aufgenommene Cholin wird zu Phosphocholin phosphoryliert. Diese Substanz bildet den Speicher, aus dem die Phosphatidylcholin-Synthese gespeist wird. Um aus dem Einbau von ^3H -Cholin in die Lungenphospholipide eine Aussage über die Synthese machen zu können, ist die spezifische Aktivität dieses Phosphocholin-Pools von entscheidender Bedeutung. Bei gleicher Syntheserate hängt die im Phosphatidylcholin gefundene ^3H -Aktivität von der spezifischen Aktivität des Phosphocholins ab. Je höher diese ist, desto mehr Aktivität wird man bei gleicher Synthese im Lungenphosphatidylcholin finden. Aus diesem Grund wurde die spezifische ^3H -Aktivität von Phosphocholin im wässrigen Überstand des Lungenextrakts bestimmt. Die spezifische Aktivität von Phosphocholin liegt in der Kontrollgruppe bei $6,1 \cdot 10^3$ dpm/nmol. Weder nach zwei Tagen noch nach sieben Tagen hyperoxischer Begasung unterscheidet sich dieser Wert von der Kontrolle (siehe Tabelle 35).

Kontrolle (10^3 dpm/nmol)	2 d 85% O ₂ (10^3 dpm/nmol)	7 d 85% O ₂ (10^3 dpm/nmol)
6,1 ± 0,8	6,2 ± 0,8	5,1 ± 0,7

Tabelle 35: Spezifische Aktivität des Phosphocholins nach dreistündiger isolierter Lungenperfusion

Die wässrige Oberphase des Lungenextraktes wurde lyophilisiert und Phosphocholin mittels Festphasenextraktion von Cholin getrennt. Die Bestimmung der Stoffmenge an Phosphocholin wurde mit einem enzymatischen Assay durchgeführt, die Messung der ^3H -Aktivität erfolgte mit Flüssigszintillationszählung. Daten sind MW ± SD. n = 18/7/5

3.11.3. Einbau von ^3H -Cholin in die Lungenphospholipidfraktionen

Abbildung 40 zeigt die ^3H -Aktivität, die während der dreistündigen Perfusion in die verschiedenen Phospholipid-Fraktionen integriert wurde. Um über die ^3H -Cholin-Aktivität im Phospholipid eine Aussage über die Gesamtsyntheseleistung der Lunge zu erhalten, wurde der ^3H -Aktivität im Lungengewebe-Phospholipid die ^3H -Aktivität im BALF-Phospholipid hinzuge-rechnet, da auch das sezernierte, in Phosphatidylcholin eingebaute ^3H -Cholin in der BALF von der Lunge synthetisiert wurde. Um eine Aussage über den intrazellulären Transport der markierten Phospholipide in den IZS zu ermöglichen, wurde dementsprechend zu der phospholipidgebundenen ^3H -Aktivität im IZS die ^3H -Aktivität in der BALF addiert.

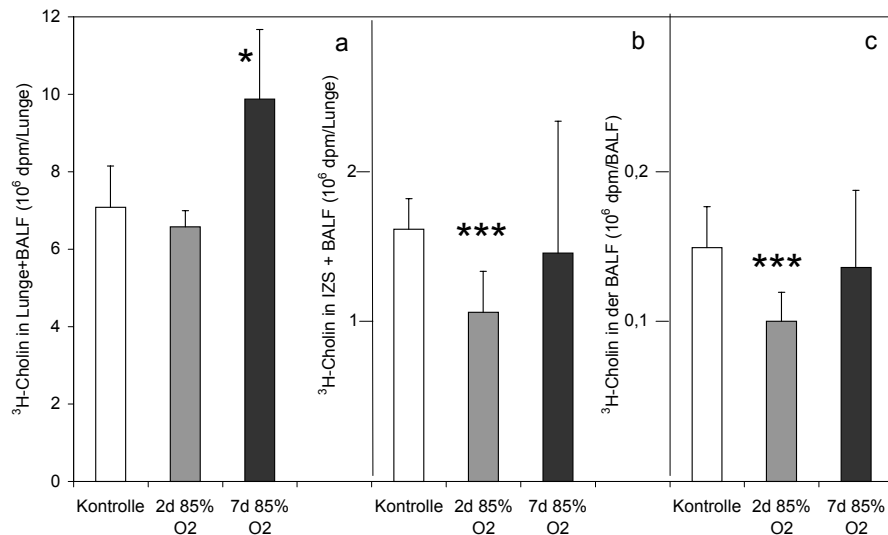


Abbildung 40: ^3H -Cholin-Inkorporation in Phospholipid der Lunge und des Surfactant

^3H -Cholin-Inkorporation in **a)** Lungen-Phospholipid, **b)** Phospholipid des IZS und **c)** der BALF. Berechnung der Werte nach Formelanhang (Formeln 4-7). Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$. $n = 5-21$. Signifikanzen gegenüber Kontrolle: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Kontrolllungen bauen während der Perfusion im Durchschnitt $7,1 \cdot 10^6$ dpm in Phosphatidylcholin ein (siehe Abbildung 40a). Das entspricht $70 \pm 12\%$ der in die Lunge aufgenommenen ^3H -Cholinaktivität. Davon werden während des Experiments $1,6 \cdot 10^6$ dpm in den IZS überführt (siehe Abbildung 40b); $0,15 \cdot 10^6$ dpm werden als markiertes Phosphatidylcholin in die Alveole sezerniert (siehe Abbildung 40c). Nach 2 d 85% O_2 ist der Einbau an Radioaktivität in das Lungenphospholipid unverändert gegenüber der Kontrolle. In den Surfactantpools dagegen ist die ^3H -Aktivität um jeweils 33% gesunken. Nach 7 d 85% O_2 ist der Einbau von ^3H -Cholin in das Lungenphospholipid um 40% erhöht. Im Gegensatz dazu liegt die ^3H -Aktivität in beiden Surfactantpools auf Kontrollniveau.

Bei Kontrolllungen befinden sich nach dreistündiger Perfusion 24% der ^3H -Phosphatidylcholin-Aktivität im intrazellulären und alveolären Surfactantpool. 10% dieser Surfactant- ^3H -Cholin-Markierung bzw. 2,2% der Lungen- ^3H -Cholin-Markierung finden sich in der BALF. Nach zweitägiger Begasung mit 85% Sauerstoff ist der Anteil der ^3H -Cholin-Aktivität im Phospholipid des gesamten (intrazellulären und alveolären) Surfactant und im Phospholipid der BALF gesunken.

	Kontrolle	2 d 85% O ₂	7 d 85% O ₂
(IZS+BAL) / (Lunge+BAL)	24 ± 3	18 ± 5 (**)	14 ± 6 (**)
BALF / (IZS+BALF)	10 ± 2	10 ± 3	11 ± 3
BALF / (Lunge+BALF)	2,2 ± 0,3	1,7 ± 0,2 (***)	1,4 ± 0,3 (***)

Tabelle 36: Verteilung der ³H-Aktivität in den Surfactantpools der Lunge

Aus der ³H-Aktivität im Phospholipid von Lungengewebe, IZS und BALF wurde die relative Verteilung der Aktivität in den Pools nach Formelanhang berechnet. Daten sind MW ± SD. n = 6-21. Signifikanzen gegenüber Kontrolle: ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Der Anteil der Surfactant-³H-Aktivität in der BALF ist dagegen gleich geblieben. Ein vergleichbares Bild bietet sich nach siebentägiger Exposition mit 85% O₂. Der Anteil der phospholipidgebundenen ³H-Aktivität, der sich im gesamten Surfactant bzw. in der BALF befindet, ist noch weiter abgesunken. Auch in dieser Versuchsgruppe ist aber der Anteil der in die BALF eingebauten Surfactant-Phospholipid-Markierung unverändert. Vergleicht man also den Einbau von ³H-Cholin in Phospholipid von Lungengewebe, IZS und BALF, so ist nach 2 d 85% O₂ bei konstanter Phospholipidsynthese der Einbau in IZS und BALF vermindert und das Verhältnis der Markierung von BAL zu IZS unverändert (siehe Tabelle 35). Nach 7 d 85% O₂ findet sich das gleiche Ergebnis verminderter Inkorporation neugebildeten Phosphatidylcholins in IZS und BALF (siehe Tabelle 35) bei primär erhöhter Gesamtsynthese.

3.12. Metabolismus und Transport der individuellen Phosphatidylcholine

Die bisher gezeigten Daten zu Poolgrößenveränderungen und veränderten Zusammensetzungen des Phosphatidylcholins in Lungengewebe, IZS und BALF zeigen, daß nach *in vivo*-Begasung mit 85% Sauerstoff über zwei bzw. sieben Tage der Metabolismus des pulmonalen Phosphatidylcholins im Hinblick auf Synthese, intrazellulären Transport und Sekretion verändert ist. Die individuellen Phosphatidylcholin-Spezies scheinen hiervon unterschiedlich betroffen zu sein. Aus diesem Grund wurde der Metabolismus und das Transport der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies näher untersucht.

Aus den während der isolierten Lungenperfusion mit ³H-Cholin markierten Phospholipidpools von Lungengewebe, IZS und BALF wurde Phosphatidylcholin präpariert und mittels

RP-HPLC in seine molekularen Spezies aufgetrennt. Während der Trennung wurde jede eluierte Phosphatidylcholin-Spezies individuell gesammelt und mittels Flüssigszintillationszählung auf ihre eingebaute ^3H -Aktivität hin untersucht. Wie gezeigt wurde, stimmt das Profil der ^3H -Aktivität im Eluat mit dem Fluoreszenzsignal der einzelnen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin überein (siehe 3.2.5).

3.12.1. Synthese und Einbau in den Surfactant in der gesunden Lunge

Bei den Untersuchungen zum Metabolismus der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies wurde die Auswertung auf die wesentlichen Spezies PC16:0/14:0, PC16:0/16:1, PC16:0/16:0, PC16:0/18:1, PC16:0/18:2 und PC16:0/20:4 beschränkt. Dies hatte folgende Gründe: Vier der sechs Spezies, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1, PC16:0/16:0, PC16:0/18:1, sind Hauptbestandteile des Surfactant. Im Plasma sind sie mit insgesamt 14% nur in geringen Mengen vorhanden (siehe 3.10.4). Der relative Anteil dieser Spezies am Lungen-Phosphatidylcholin beträgt bei der Ratte immerhin 63% (siehe Tabelle 28). Ihr Anteil am alveolären und intrazellulärem Surfactant ist bei der Ratte (siehe Tabelle 30 bzw. Tabelle 29) und beim Schwein (siehe 3.1.1.3) noch höher. Der Metabolismus von PC 16:0/20:4 ist interessant, weil Arachidonsäure (20:4) als Grundsubstanz des Eicosanoidstoffwechsels von Bedeutung ist. Da es im Rahmen des hyperoxischen Lungenschadens auch zu Entzündungsprozessen wie dem Einstrom von Leukozyten [Crapo, 1980] kommt, sind Veränderungen des Arachidonsäuremetabolismus möglich, die sich auch in veränderten Poolgrößen der arachidonsäurehaltigen Subspezies zeigen können. PC16:0/18:2 und PC16:0/18:1 sind die Hauptsyntheseprodukte der *de novo*-Synthese von Phosphatidylcholin [Caesar et al, 1991]. Beide Spezies kommen also für das Remodelling zu DPPC durch Austausch der Fettsäure in der sn-2-Position des Glycerinbackbones im Molekül in Frage (siehe Einleitung). Die relativen Syntheseraten dieser beiden Phosphatidylcholin-Spezies können deshalb einen Hinweis darauf liefern, inwieweit in der isolierten perfundierten Lunge innerhalb von 3h Remodelling stattfindet. Mit dieser Auswahl werden also die für die Untersuchung des Surfactantmetabolismus wichtigen Spezies und der Hauptteil des Phosphatidylcholins in der Lunge und den Surfactantfraktionen erfaßt.

3.12.1.1. Vergleich von Neusynthese und Gleichgewichtszusammensetzung

In der Lunge findet die Synthese von Phosphatidylcholin aus Diacylglycerol und CDP-Cholin statt. Gleichzeitig wird die Zusammensetzung des synthetisierten Phosphatidylcholins durch

das sog. Remodelling modifiziert. Hierbei werden im wesentlichen ungesättigte Fettsäuren in der sn-2-Position des Moleküls durch einen Palmitoylrest ersetzt, was zu einer Anreicherung von PC16:0/16:0 führt (siehe Einleitung).

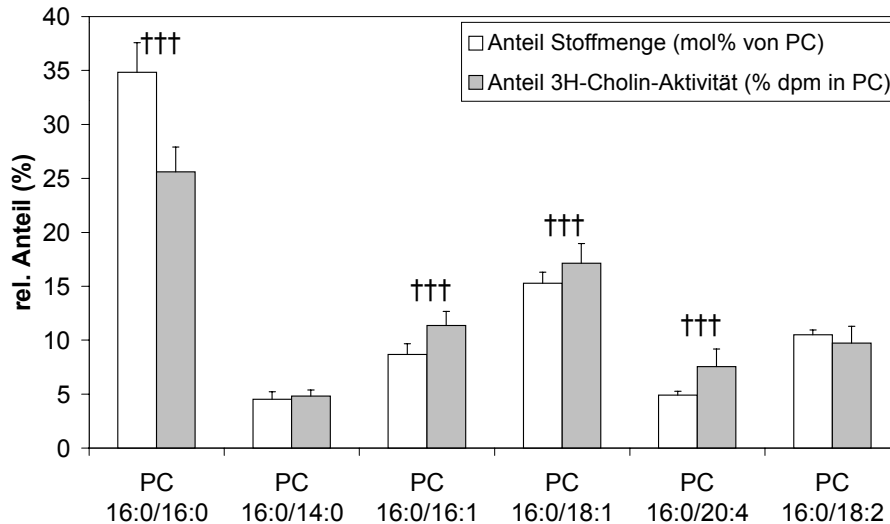


Abbildung 41: Zusammensetzung und ^3H -Cholin-Einbau in die Lungen-Phosphatidylcholin-Spezies

Die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin (PC) wurde mittels RP-HPLC bestimmt und die Verteilung der ^3H -Cholin-Aktivität im Eluat gemessen. Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$. $n = 20/19$. Anteil einzelner Subspezies an der Varianz zwischen prozentualer Zusammensetzung (Stoffmenge) und ^3H -Einbau: ††† $p < 0,001$.

Abbildung 41 zeigt die Zusammensetzung der palmitinsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies in der Lunge im Vergleich zur Verteilung der ^3H -Aktivität in diesen Spezies nach dreistündiger Perfusionsmarkierung von Kontrolllungen mit ^3H -Cholin. Setzt man die Summe aller Stoffmengen der Phosphatidylcholin-Spezies sowie den Einbau von ^3H -Cholin in Phosphatidylcholin jeweils gleich 100%, ergeben sich signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung und dem relativen Einbau von ^3H -Cholin entsprechend unterschiedlicher relativer Syntheseraten der einzelnen Phosphatidylcholin-Spezies (Wilk's Lambda $< 0,0001$).

PC16:0/16:0 bildet mit $1,56 \cdot 10^6$ dpm/Lunge den größten Anteil an der Neusynthese von ^3H -Phosphatidylcholin (siehe Abbildung 41). Weitere Hauptsyntheseprodukte sind PC16:0/16:1, PC16:0/18:1 und PC16:0/18:2. PC16:0/14:0 und PC16:0/20:4 dagegen werden im Lungengewebe nur wenig synthetisiert. Der Stoffmengenanteil stimmt bei fast allen molekularen Spezies nicht mit dem Anteil an ^3H -Einbau bzw. Neusynthese überein, sondern ergibt sich für jede einzelne Spezies aus dem Gleichgewicht von Neusynthese, Abbau und Abtransport. Bei PC16:0/16:0 ist der relative Einbau niedriger als der Stoffmengenanteil. Während der Anteil an ^3H -Cholin-Einbau bei PC16:0/14:0 mit dem Stoffmengenanteil übereinstimmt, ist bei

PC16:0/16:1, PC16:0/18:1 und PC16:0/20:4 der relative Einbau höher. Auch bei PC16:0/18:2 ist der relative Einbau niedriger als der Stoffmengenanteil.

3.12.1.2. Intrazellulärer Transport der neusynthetisierten Phosphatidylcholone in den Surfactantpool

Die am rauhen endoplasmatischen Reticulum synthetisierten Phospholipide werden im Golgi-Apparat prozessiert und in die Lamellarkörperchen integriert (siehe Einleitung). Die Absolute-³H-Aktivität jeder einzelnen Phosphatidylcholin-Spezies, die innerhalb der isolierten Lungenperfusion in den IZS integriert wird, ist abhängig von der Neusynthese dieser Spezies und hat aus diesem Grund nur einen begrenzten Aussagewert. Ein besseres Maß für die Geschwindigkeit oder Präferenz, mit der ein bestimmtes neusynthetisiertes Phosphatidylcholin in den IZS transportiert wird, erhält man, wenn man berechnet, welcher Anteil der neusynthetisierten ³H-Phosphatidylcholin-Subspezies innerhalb der isolierten Perfusion der Lunge in den IZS integriert wird. Es zeigt sich, daß dieser Anteil für die individuellen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin sehr unterschiedlich ist.

Nach dreistündiger isolierter Lungenperfusion finden sich $44 \pm 6\%$ bzw. $44 \pm 9\%$ des neusynthetisierten ³H-PC16:0/16:0 und ³H-PC16:0/14:0 im Surfactantpool wieder. Immerhin noch $30 \pm 6\%$ des neusynthetisierten ³H-PC16:0/16:1 werden in den Surfactantpool transportiert. Dahingegen beträgt dieser Anteil bei den Hauptsyntheseprodukten PC16:0/18:1 und PC16:0/18:2 nur $19 \pm 5\%$ bzw. $19 \pm 6\%$ und bei PC16:0/20:4 sogar nur $15 \pm 4\%$. Die Anreicherung oder Abreicherung individueller Phosphatidylcholin-Spezies auf dem Weg vom rauhen endoplasmatischen Retikulum zum Surfactantpool (IZS und BALF) ist demnach unabhängig von den relativen Syntheseraten. Die sechs palmitinsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies lassen sich in zwei Gruppen von je drei Substanzen unterteilen. Von PC16:0/16:0, PC16:0/16:1 (jeweils hohe Syntheserate) und PC16:0/14:0 (niedrige Syntheserate) wird innerhalb der isolierten Lungenperfusion jeweils ein hoher Prozentsatz in den IZS transportiert. PC16:0/18:1, PC16:0/18:2 (jeweils hohe Syntheserate) und PC16:0/20:4 (niedrige Syntheserate) werden dagegen nur zu einem geringeren Teil in den IZS integriert. Analog zu diesen Inkorporationsraten neusynthetisierter Phosphatidylcholin-Spezies zeigt Abbildung 42, daß die disaturierten Spezies PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0 sowie PC16:0/16:1 im IZS gegenüber dem Lungengewebe angereichert sind. PC16:0/18:1 und die mehrfach ungesättigten Spezies PC16:0/18:2 und PC16:0/20:4 sind dagegen im IZS vermindert (Wilk's Lambda < 0,0001).

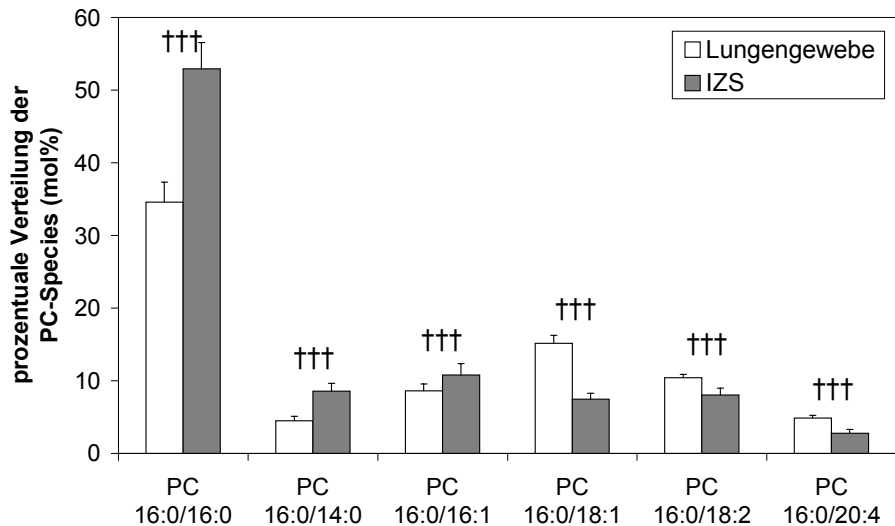


Abbildung 42: Verteilung der Stoffmengen der palmitinsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies im Lungengewebe und IZS (in % von Phosphatidylcholin)

Mittels RP-HPLC wurde der Anteil der palmitinsäurehaltigen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin (PC) im Lungengewebe und IZS bestimmt. Daten sind MW \pm SD. n = 20/14. Anteil einzelner Subspezies an der Varianz: ††† p < 0,001.

3.12.1.3. Sekretion von neusynthetisiertem Surfactant in die BALF

Der Transport von neusynthetisiertem ^3H -Phosphatidylcholin in den IZS während der isolierten Lungenperfusion differiert zwischen den individuellen Spezies, was zu einer unterschiedlichen Verteilung der ^3H -Aktivität in den Phosphatidylcholin-Spezies von Lungengewebe und IZS führt (siehe 3.12.1.2). Im Gegensatz dazu ist die Verteilung der ^3H -Aktivität im Phosphatidylcholin des intrazellulären und alveolären Surfactantpools sehr ähnlich (siehe Abbildung 43a), wenn auch nicht identisch (Wilk's Lambda < 0,0001). Bezieht man die ^3H -Cholinaktivität in den individuellen Phosphatidylcholin-Spezies der BALF auf die jeweilige Aktivität des Gesamtsurfactantpools (BALF und IZS), so zeigt sich, daß von den untersuchten individuellen Spezies von Phosphatidylcholin ein sehr ähnlicher Anteil des neusynthetisierten Materials in die Alveole sezerniert wird. Dieser Anteil liegt nach der dreistündigen isolierten Lungenperfusion bei $8,0 \pm 1,4\%$ für PC16:0/16:0, $10,2 \pm 2,0\%$ für PC16:0/14:0 und $12,0 \pm 2,5\%$ für PC16:0/16:1. Von dem PC16:0/18:1, PC16:0/18:2 und PC16:0/20:4 im Surfactantpool werden innerhalb der Lungenperfusion $7,5 \pm 2,1\%$, $9,5 \pm 3,9\%$ bzw. $8,9 \pm 2,3\%$ in die Alveole sezerniert. Hieraus resultiert eine annähernd vergleichbare Verteilung der ^3H -Aktivität und der Stoffmengen in den palmitinsäurehaltigen Phosphatidylcholin-Spezies von IZS und BALF (siehe Abbildung 43a und b).

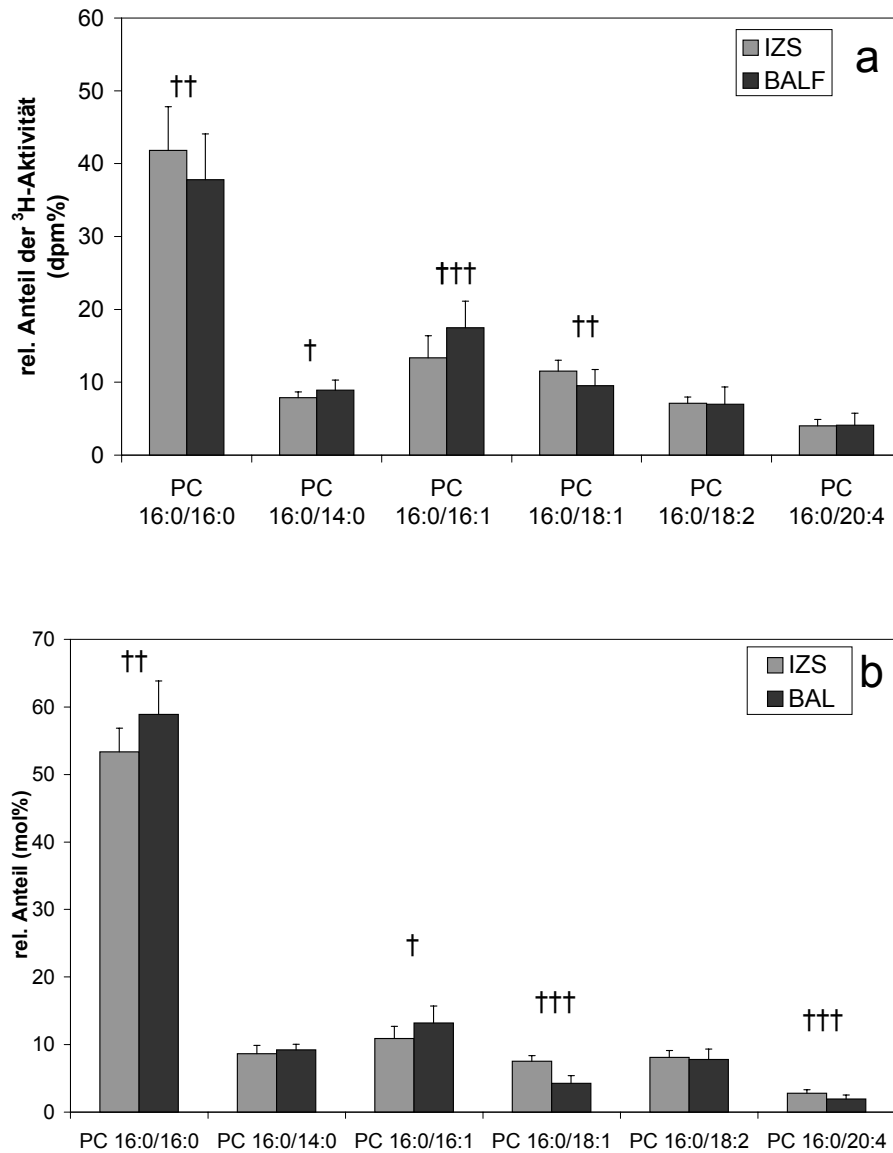


Abbildung 43: Prozentuale Verteilung der ³H-Aktivität (a) und Stoffmengen (b) der palmitinsäurehaltigen PC-Spezies im intrazellulären und alveolären Surfactant-Pool

Mittels RP-HPLC wurden die individuellen Phosphatidylcholin-Spezies von IZS und BALF getrennt und Stoffmenge sowie ³H-Aktivität im Eluat gemessen. MW ± SD. n = 14/20. Anteil einzelner Subspezies an der Varianz: † p < 0,05; †† p < 0,01; ††† p < 0,001.

3.12.2. Metabolismus und Transport der Phosphatidylcholone nach hyperoxischem Lungenschaden

Der Cholineinbau in die molekularen Spezies des Lungengewebes von Kontrollen wurde schon besprochen (siehe 3.12.1). Nach 2 d 85% O₂ ist der Einbau von ³H-Cholin in PC16:0/16:0 um 20% vermindert (siehe Tabelle 37). Der Einbau von ³H-Cholin in die ande-

ren palmitoylierten Phosphatidylcholine ist dagegen unverändert. Nach 7 d 85% O₂ findet sich bei PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1 und PC16:0/18:1 trotz erhöhter Poolgrößen (siehe Tabelle 28) im Lungengewebe kein erhöhter Einbau von ³H-Cholin. Lediglich der ³H-Cholin-Einbau in PC16:0/20:4 und PC16:0/18:2 ist zu diesem Zeitpunkt um 74% bzw. 40% erhöht.

	Kontrolle (10 ⁶ dpm)	2 d 85% O ₂ (10 ⁶ dpm)	7 d 85% O ₂ (10 ⁶ dpm)
PC16:0/16:0	1,56 ± 0,25	1,25 ± 0,21 (-20%, *)	1,94 ± 0,64
PC16:0/14:0	0,30 ± 0,06	0,26 ± 0,07	0,36 ± 0,05
PC 16:0/16:1	0,69 ± 0,15	0,58 ± 0,07	0,93 ± 0,33
PC 16:0/18:1	1,01 ± 0,20	0,85 ± 0,11	1,34 ± 0,39
PC16:0/18:2	0,58 ± 0,14	0,56 ± 0,07	0,82 ± 0,17 (+40%, *)
PC16:0/20:4	0,44 ± 0,08	0,47 ± 0,06	0,77 ± 0,19 (+74%, *)

Tabelle 37: ³H-Cholineinbau in Lungenphosphatidylcholin-Spezies

Die absolute Aktivität in Lungengewebe und BALF wurde aus dem HPLC-Eluat bestimmt. Daten sind MW ± SD. n = 19/7/5. Signifikanz zwischen Stoffmengenanteil und ³H-Cholin-Anteil einer Subspezies: * p < 0,05.

Betrachtet man nun, wie schon bei Kontrollen (siehe 3.12.1), den Anteil an neusynthetisierten ³H-Phosphatidylcholinen, der innerhalb der dreistündigen isolierten Lungenperfusion in den IZS integriert und zum Teil in die Alveole sezerniert wurde, so läßt sich eine Aussage über den intrazellulären Transport der verschiedenen molekularen Spezies vom endoplasmatischen Retikulum zu den Lamellarkörperchen treffen. Nach 2 d 85% O₂ findet sich ein unverändert hoher Anteil des neusynthetisierten ³H-PC16:0/16:0 (Lungengewebe+BALF) im Surfactant (IZS+BALF) (siehe Abbildung 44). Der Anteil aller anderen neusynthetisierten palmitoylierten Phosphatidylcholine im Surfactant ist dagegen mindestens tendenziell vermindert. Nach 7 d 85% O₂ ist der Anteil aller neusynthetisierter palmitoylierter ³H-Phosphatidylcholin-Spezies im Surfactant vermindert, wobei der Unterschied gegenüber der Kontrolle bei PC16:0/16:0 am geringsten ausgeprägt ist. Immerhin noch 36% des neusynthetisierten PC16:0/16:0 finden sich in IZS und BALF wieder. Bei allen anderen Spezies ist der Anteil der ³H-Markierung im Surfactant noch weiter abgesunken.

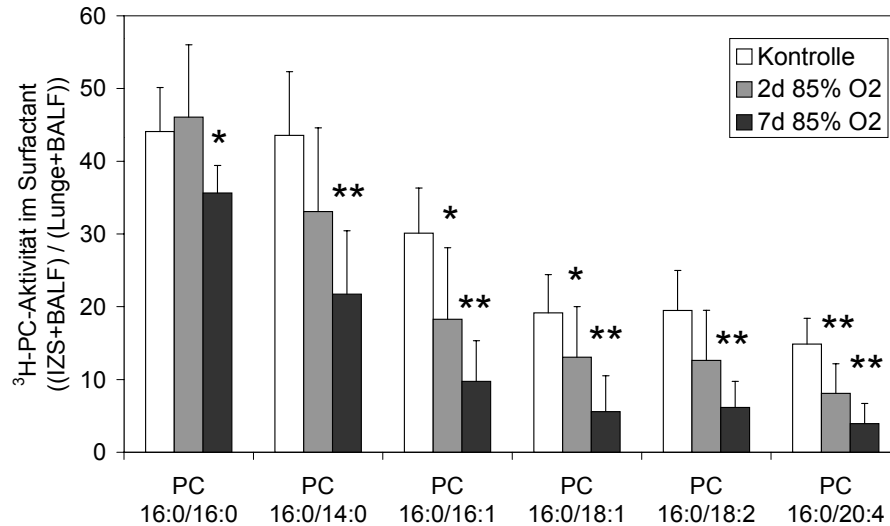


Abbildung 44: relativer Anteil der ^3H -Aktivität der Lungen-Phosphatidylcholin-Spezies im Surfactant

Mittels RP-HPLC wurde der Anteil der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin von Lungengewebe, IZS und der BALF bestimmt und die Verteilung der ^3H -Aktivität im Eluat gemessen. Der Anteil des neusynthetisierten Phosphatidylcholins im (intrazellulären und alveolären) Surfactant wurde nach Formelanhang errechnet. Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$. $n = 19/7/5$. Signifikanzen gegenüber Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Der Anteil der neusynthetisierten Phosphatidylcholone, der im Anschluß an die dreistündige isolierte Lungenperfusion in der BALF gefunden wird, ergibt sich aus dem intrazellulären Transport neusynthetisierten ^3H -Phosphatidylcholins in die Lamellarkörperchen und der Sekretion eines Teils dieses Materials in die Alveole. Für die palmitoylierten Phosphatidylcholone von Kontrolllungen schwankt der Anteil des neusynthetisierten Materials in der BALF zwischen 1,3% bei PC16:0/20:4 und 4,1% für PC16:0/14:0 (siehe Abbildung 45). Dies resultiert, wie besprochen (3.12.1), aus einer unterschiedlichen Effektivität des intrazellulären Transports der verschiedenen Phosphatidylcholone bei vergleichbarer Sekretion. Nach zweitägiger Hyperoxie ist der Anteil an neusynthetisiertem PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0 in der BALF gegenüber der Kontrolle vermindert (siehe Abbildung 45). Alle anderen palmitoylierten ^3H -Phosphatidylcholin-Spezies werden zu einem mit der Kontrolle vergleichbaren Prozentsatz in der BALF gefunden. Nach siebentägiger Hyperoxie (85%) wird zusätzlich zu PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0 auch PC16:0/18:1 zu einem geringeren Prozentsatz in die Alveole sezerniert. Der Anteil des neusynthetisierten PC16:0/16:1, PC16:0/18:2 und PC16:0/20:4 in der BALF ist weiterhin unverändert.

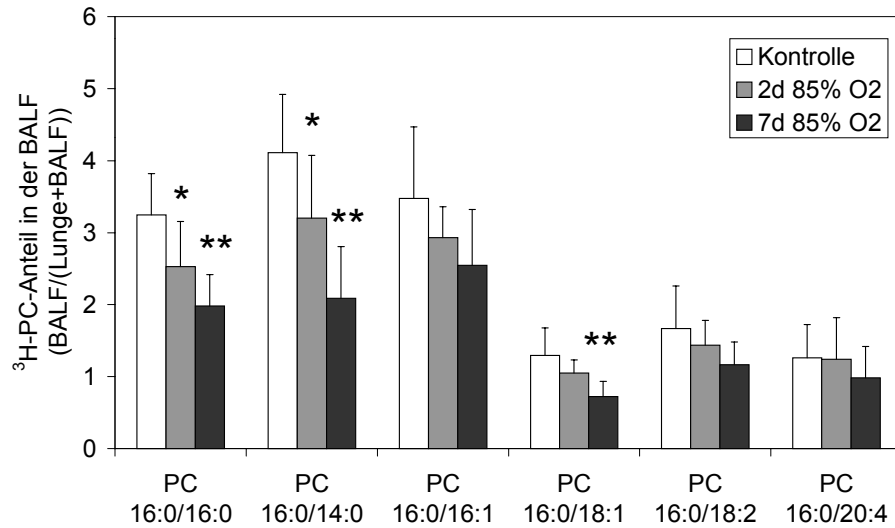


Abbildung 45: relativer Anteil der ^3H -Aktivität der Lungen-Phosphatidylcholin-Spezies im alveolären Surfactant

Mittels RP-HPLC wurde der Anteil der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin von Lungengewebe und der BALF bestimmt und die Verteilung der ^3H -Aktivität im Eluat gemessen. Der Anteil des neusynthetisierten Phosphatidylcholins im alveolären Surfactant wurde nach Formelanhang errechnet. Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$. $n = 19/7/5$. Signifikanzen gegenüber Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4. DISKUSSION

Der hyperoxische Lungenschaden kann unter der Therapie peripherer Hypoxie mit erhöhter Sauerstoffkonzentration im Beatmungsgas auftreten und ist damit in der klinischen Praxis niemals eigenständiges Krankheitsbild, sondern immer an eine Primärerkrankung gekoppelt. Um aber die schädigenden Effekte des Sauerstoffs von denen der Grunderkrankung trennen zu können, wurde in der Grundlagenforschung das Tiermodell des hyperoxischen Lungenschadens etabliert. Unter dem Einfluß der Noxe kommt es zu Entzündungsreaktionen [Crapo et al, 1980; Minoo et al, 1992], einer Störung der Barriere zwischen Kapillare und Alveole [Matalon et al, 1981; Royston et al, 1990; Stenzel et al, 1993; Palazzo et al, 1992] und zu einer Surfactantdysfunktion [Arkovitz et al, 1997; Noguee, 1988; Matalon, 1988] und -dysregulation [Holm et al, 1988; Novotny et al, 1995; Polak et al, 1992; Gross et al, 1981; Ward et al, 1984; Young et al, 1982]. Eine veränderte Regulation der Surfactanthomöostase kann aber durch eine Verringerung der Menge an alveolärem Surfactant oder durch eine Änderung seiner Zusammensetzung potentiell die Funktionalität der Lunge beeinträchtigen. Ein genaues Bild des Surfactantmetabolismus im Zusammenhang mit der Oberflächenaktivität des Surfactant unter dem Einfluß von Hyperoxie ist daher eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von sinnvollen Therapieansätzen.

Untersuchungen der Surfactantfunktion und seiner Phospholipid-Poolgrößen nach hyperoxischem Lungenschaden wurden an unterschiedlichen Spezies und verschiedenen Altersklassen vom frühgeborenen bis zum adulten Tier durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die untersuchten Spezies und Altersklassen in ihrer Suszeptibilität gegenüber toxischen Sauerstoffschäden differieren [Frank et al, 1978; Giammona et al, 1965; Mustafa et al, 1978]. Da weiterhin die Konzentration der Noxe einen Einfluß auf den Grad der Schädigung hat, ist es schwierig, Untersuchungen an verschiedenen Modellen miteinander zu vergleichen, um einen Gesamteindruck über die histologischen, biochemischen und funktionellen Veränderungen zu erhalten. Obwohl der adaptative Sauerstoffschaden durch mäßig erhöhte Sauerstoffkonzentrationen mit seinen Langzeitfolgen in der klinischen Praxis eher eine Rolle spielt, arbeiten viele Arbeitsgruppen mit einem Modell des (teilweise) letalen Sauerstoffschadens und mit Kurzzeitexperimenten. Während deshalb der Surfactantmetabolismus nach kurzzeitiger Exposition mit hoher Sauerstoffdosis gut untersucht ist, fehlen Daten zu Surfactantfunktion und -metabolismus sowohl in der akuten als auch in der adaptativen bzw. proliferativen Phase des adapta-

tiven Sauerstoffschadens. Weiterhin sind die detaillierte Surfactantzusammensetzung sowie die den Veränderungen in Poolgröße und Zusammensetzung zugrunde liegenden Mechanismen völlig unbekannt. Um zu einem besseren Verständnis des nicht letalen hyperoxischen Lungenschadens zu kommen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß der Begasung mit 85% O₂ auf adulte männliche Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Im Gegensatz zu anderen Modellen wurden alle Parameter sowohl nach zweitägiger als auch nach siebentägiger Hyperoxie gemessen, um den Vergleich der akuten Phase und der proliferativen bzw. adaptativen Phase der Schädigung im selben Modell zu ermöglichen. Untersucht wurden Lungenhistologie, Surfactantfunktion, -biochemie und -metabolismus. Im Gegensatz zu der in der Literatur üblichen Messung von Gesamt-Phospholipid bzw. disaturiertem Phosphatidylcholin wurde in dieser Arbeit die Zusammensetzung und Poolgröße der individuellen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin als Surfactant-Hauptphospholipid detailliert bestimmt. Weiterhin wurde der Metabolismus der Lungen-Phosphatidylcholine durch Einbaustudien mit ³H-Cholin im Modell der isolierten perfundierten Rattenlunge untersucht. Die parallele Analyse von Lungengewebe, intrazellulärem Surfactant (IZS) und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) läßt Rückschlüsse auf Synthese, intrazellulären Transport und Sekretion der Surfactant-Phosphatidylcholine zu und ermöglicht damit erstmals ein Verständnis der komplexen Zusammenhänge von Surfactant-Phospholipidmetabolismus, -Transport und -Gleichgewicht in der Akut- und Adaptationsphase des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens.

4.1. Entzündungsparameter

In der akuten Phase des hyperoxischen Lungenschadens kommt es zunächst zu einer Erhöhung der Konzentration an Sauerstoffradikalen [Freemann et al, 1982], die das Lungenparenchym schädigen. Durch die Schädigung der Zellen setzt eine Entzündungsreaktion ein [Crapo, 1980; Minoo, 1992]. Es kommt schon frühzeitig zu einer Störung der Barriere zwischen Kapillare und Alveole [Matalon et al, 1981; Royston et al, 1990; Stenzel et al, 1993; Palazzo et al, 1992]. Einige der ins Interstitium und in den Alveolarraum penetrierenden Plasmabestandteile inaktivieren den Surfactant [Holm et al, 1987; Holm et al, 1999; Holm et al, 1988; Enhorning et al, 1993]. Im Verlauf der Entzündungsreaktion wandern Leukozyten ins Gewebe ein, und es kommt im Rahmen der Adaptation zu einer generalisierten Zellproliferation [Crapo et al, 1980].

Im hier verwendeten Modell des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens bei der Ratte war in der Akutphase der Schädigung nach zwei Tagen eine erhöhte Dehnbarkeit der Lunge bei der Ventilation der isolierten perfundierten Lunge festzustellen. Lichtmikroskopisch fand sich eine etwas verminderte Zahl an Septen, was die verminderten Kontraktionskräfte des Organs erklärt. Weiterhin fanden sich histologisch diskrete Hinweise auf ein interstitielles Ödem. Dies wurde durch das erhöhte Verhältnis von Lungenfeucht- zu Lungentrockengewicht gestützt. Immunhistologisch ließ sich zu diesem Zeitpunkt zunächst weder eine Vermehrung der Granulozyten und Makrophagen im Interstitium noch erhöhte Zellproliferation nachweisen. Ein Hinweis auf eine Veränderung der Population freier Zellen ergab sich aus dem verminderten Anteil an alveolären Makrophagen und dem etwas erhöhten Anteil an Granulozyten in der BALF. Zu diesem Zeitpunkt waren also erste Anzeichen einer Schädigung des Organs im Sinne einer Permeabilisierung des Kapillarendothels und einer leichten Verminderung der Gasaustauschfläche vorhanden, die auf die Toxizität des Sauerstoffs zurückzuführen sind. Weiterhin hatte eine Entzündungsreaktion eingesetzt.

In der adaptativen Phase des hyperoxischen Lungenschadens zeigte sich die verstärkte Entzündungsreaktion in einem massiven Einstrom von Makrophagen und Granulozyten ins Interstitium und den Alveolarbereich. Die unterschiedliche Ausprägung dieser Reaktion ist Ausdruck einer mehr oder weniger schnellen Antwort der angeborenen Abwehr auf die Zellschädigung durch Hyperoxie. Dies ist auf den nicht identischen genetischen Hintergrund der aus einer Auszucht stammenden Versuchstiere zurückzuführen. Daß nicht alle Tiere mit vergleichbaren Änderungen in der Population an Entzündungszellen reagieren, muß aber nicht zwingend an einer unterschiedlich schnellen Reaktion auf eine vergleichbare Schädigung liegen, sondern kann auch aus einem unterschiedlichen Schutz der Lunge durch antioxidative Enzyme und damit einer Differenz im Grad des Zellschadens resultieren.

Im Zusammenhang mit einer erhöhten Zellproliferation kam es zu diesem Zeitpunkt zu einer Verdickung der Alveolarsepten und damit zu einer Erhöhung der Diffusionsbarriere für das Atemgas. Deutliches Anzeichen für die Vermehrung der Organmasse war das massiv erhöhte Lungentrockengewicht und die makroskopisch sichtbare Steifheit der Lunge während der Ventilation, d.h. ein erhöhter Widerstand gegen das Aufblähen. Das erhöhte Lungenfeuchtgewicht/Lungentrockengewicht-Verhältnis und die erhebliche Zunahme der Menge an Protein und insbesondere Albumin in der BALF wiesen darauf hin, daß die Barriere zwischen Kapillare und Alveole immer noch beeinträchtigt war. Obwohl die Tiere aber zu diesem Zeitpunkt an Gewicht verloren hatten und „krank“ aussahen, starb keines während der Begasung, was

dokumentiert, daß es sich tatsächlich um ein Modell des nicht letalen, adaptativen Lungenschadens handelt.

4.2. Oberflächenaktivität des Surfactant

Die Oberflächenaktivität des alveolären Surfactant wurde im Modell der pulsierenden Blase bestimmt. Dieses Modell zeichnet sich dadurch aus, daß es die Dynamik der Adsorption messbar macht. Die zu Beginn der Messung untersuchte statische Adsorption zeigt, ob der Surfactant die Equilibriums oberflächenspannung innerhalb dieser Zeitspanne erreicht. Die dynamische Kompression ist äquivalent der Expiration im vitalen Organismus. Bei der Verminderung der Oberfläche sollten von einem aktiven Surfactant Oberflächenspannungen < 5 mN/m erreicht werden. γ_{\max} ist Ausdruck der Oberflächenspannung bei Vergrößerung der Oberfläche analog zur Inspiration im vitalen Organismus. Dabei ist die maximale Oberflächenspannung um so niedriger, je schneller Surfactant aus der Subphase an die Grenzfläche adsorbiert. Eine funktionelle Schädigung des Surfactant ist bei verschiedenen inhalativen und entzündlichen Prozessen im Alveolarraum wie Ozon-Inhalation und Hyperoxie, ARDS, Sepsis, SIRS und Pneumonie bereits dokumentiert worden [Currie et al, 1998; Putman et al, 1997; Balaan et al, 1995; D'Angio et al, 1997; Issa et al, 1999; Raymondos et al, 1999; Seeger et al, 1993; Günther et al, 1996]. Aus der Literatur ist eine Verschlechterung der Oberflächenaktivität des pulmonalen Surfactant in Hyperoxiemodellen mit verminderter Überlebensrate bekannt [Balaan et al, 1995; D'Angio et al, 1997; Issa et al, 1999]. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, wie sich die Eigenschaften des Surfactant im Modell des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens verändern.

4.2.1. Oberflächenaktivität des Surfactant in der Akutphase der Hyperoxie

Im hier vorgestellten Modell des adaptativen hyperoxischen Lungenschadens wurde in der Akutphase eine Erhöhung der minimalen und maximalen Oberflächenspannung des pulmonalen Surfactant gefunden, was für geringere Effektivität des Surfactant und eine verminderte Adsorptionsgeschwindigkeit spricht. Für dieses Ergebnis gibt es prinzipiell zwei Erklärungen. Theoretisch besteht einerseits die Möglichkeit, daß die Verunreinigungen des Surfactant nicht aus dem Alveolarbereich kommen, sondern aus den Atemwegen. Die Verschlechterung der Surfactantfunktion wäre dann *in vivo* nicht vorhanden, sondern entstünde erst durch die Technik der bronchoalveolären Lavage. Allerdings wurde in der Literatur bislang noch nicht be-

schrieben, daß unter Hyperoxie Substanzen in den Atemwegen produziert werden, die eine Surfactant-inhibition verursachen könnten. Wenn diese Erklärung auch nicht ausgeschlossen werden kann, so ist sie doch eher unwahrscheinlich. Denkbar ist andererseits eine Surfactant-inhibition, die durch Substanzen im Alveolarbereich zustande kommt. In diesem Fall spiegeln die *in vitro* erhaltenen Daten die Oberflächenaktivität *in vivo* wider. Es sind verschiedene Surfactant-inhibitoren bekannt, deren Anwesenheit im Alveolarbereich unter dem Einfluß hyperoxischer Begasung publiziert oder denkbar ist. Hierzu gehören Ödemflüssigkeit [Kobayashi et al, 1991; Ennema et al, 1998] sowie verschiedene Plasmaproteine [Holm et al, 1987; Holm et al, 1999; Holm et al, 1988; Enhorning et al, 1993]. Erhöhte Phospholipase A₂-Aktivität bzw. eine erhöhte Konzentration an lyso-Phosphatidylcholin in der BALF wurden bei ARDS-Patienten [Kim et al, 1995] bzw. in Tiermodellen des ARDS [Casals et al, 1989; Vadas et al, 1988] festgestellt. Weiterhin zeigen Druck/Volumenkurven, die nach hyperoxischer Begasung am intakten Organ aufgenommen wurden, daß die Compliance der Lunge vermindert ist [Matalon et al, 1988; Ward et al, 1984]. Auch dies spricht für eine Inaktivierung des pulmonalen Surfactant im Alveolarbereich.

Die Tiere mit einem solchermaßen schlecht funktionierenden Surfactant zeigten keine Anzeichen von Atemnot, und die Lungen wiesen auch während der isolierten Perfusion keine Atelektasen auf. Nach dem Gesetz von LaPlace

$$P = \frac{2\gamma}{r}$$

bzw.

$$\frac{\gamma}{r} = konst. \quad \text{bei} \quad P = konst.$$

gilt, daß bei gleichem Außendruck P Alveolen mit größerem Radius r bei einer höheren Oberflächenspannung γ existieren können, ohne zu kollabieren. Die histologisch gefundene Verminderung der Alveolarsepten und die daraus resultierende Vergrößerung des Alveolardurchmessers wirkt in diesem Sinne stabilisierend auf die gasaustauschenden Bereiche. Die Tendenz der Alveole zur Volumenverringerng resultiert aber nicht ausschließlich aus der auf die Grenzfläche zwischen flüssiger Subphase und Gasphase wirkenden Oberflächenspannung. Ein nicht unerheblicher Teil dieser Kontraktionskraft kommt durch die Elastizität des Lungenparenchyms zustande [Goerke, 1992]. Die durch die geringere Anzahl an Alveolarsepten entstehende Verminderung der Kontraktionskräfte des Lungenparenchyms, die zu einer er-

höhten Dehnung des Organs bei der Ventilation führte, bewirkt dessen Stabilisierung bei verschlechterter Surfactantfunktion.

Ein Grund für diese Reduktion der Oberflächenaktivität des Surfactant ist eine erhöhte Konzentration von (Plasma)proteinen in der BALF. Es ist bekannt, daß Plasmaproteine, die aufgrund einer Störung der Barriere zwischen Kapillare und Alveole in den Alveolarraum einströmen [Stenzel et al, 1993; Ghio et al, 1994; Clerch, 1993; Royston et al, 1990; Gross et al, 1981], die Aktivität des Surfactant hemmen können [Holm et al, 1987; Holm et al, 1999; Holm et al, 1988; Enhorning et al, 1993]. Auch im hier vorgestellten Modell wurde eine Erhöhung der Proteinkonzentration gefunden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Proteinzusammensetzung sich erheblich von derjenigen aus Kontroll-BALFs unterscheidet. Wenn es sich bei den zusätzlichen Banden im Bereich von 14-45 kDa auch nicht um die bekannten Surfactantinhibitoren Albumin (69 kDa), Fibrinogen (340 kDa) und Hämoglobin (65 kDa) [Holm et al, 1987; Holm et al, 1999; Holm et al, 1988; Enhorning et al, 1993] handelt, so ist doch denkbar, daß diese Proteine einen ähnlichen Effekt auf die Funktion des alveolären Surfactants haben. Proteine können mit verschiedenen Mechanismen eine Reduktion der Oberflächenspannung bewirken:

- Beschleunigung der Konversion der oberflächenaktiven schweren Surfactant-Aggregate zu leichten inaktiven Aggregaten. Dies wird durch Zugabe von Serum zu Surfactant bewirkt und ist durch den Serinprotease-Inhibitor Diisopropylfluorophosphat zu stoppen [Ueda et al, 1994].
- Verminderung der effektiven Surfactant-Konzentration, wie z.B. der Einschluß von Phospholipiden durch Fibrin [Seeger et al, 1993].
- Anlagerung von Protein an die Phasengrenzfläche und Verhinderung der Ausbildung eines rigiden Dipalmitoylphosphatidylcholinfilms in der Endexpiration bzw. Behinderung der Adsorption von Phospholipiden an die Grenzfläche.

Während vermutlich nur wenige Proteine eine Inaktivierung des pulmonalen Surfactant durch den ersten Mechanismus bewirken, ist eine Anlagerung des Proteins an die Grenzfläche zwischen flüssiger und Gas-Phase bei vielen Proteinen möglich. Die Bindung von Phospholipiden an hydrophobe Domänen im Protein und damit ein Verlust des zur Verfügung stehenden Surfactants ist dagegen im wesentlichen auf hydrophobe Membranproteine beschränkt. Da

aber eine Zerstörung von Zellen und damit Freisetzung von Membranproteinen unter dem Einfluß von Hyperoxie möglich ist, ist dies denkbar.

Auch Phospholipase A₂, die im Rahmen von Entzündungsprozessen eine Rolle spielt und deren Aktivität in der BALF bei Patienten mit ARDS erhöht ist [Kim et al, 1995], wirkt inhibierend auf den Surfactant [Holm, 1992]. Der Mechanismus dieser Inhibierung ist vermutlich die Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Lysophosphatidylcholin und freien Fettsäuren, da auch der Zusatz von lyso-Phosphatidylcholin in Abwesenheit von Phospholipase A₂ die minimale Oberflächenspannung einer Surfactantemulsion erhöht [Holm, 1992].

4.2.2. Oberflächenaktivität des Surfactant in der Adaptationsphase der Hyperoxie

Im Gegensatz zur Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens kommt es in der adaptativen Phase trotz fortschreitender Entzündungsreaktion zu einer deutlichen Verbesserung der Oberflächenaktivität des alveolären Surfactant. Die minimale Oberflächenspannung ist wieder auf dem niedrigeren Niveau der Kontrolle und die maximale Oberflächenspannung ist gegenüber der Kontrolle erniedrigt, was auf verbesserte Adsorptionseigenschaften hinweist. Dies ist um so erstaunlicher, als der Proteingehalt der BALF zu diesem Zeitpunkt weiterhin erhöht ist. Es zeigt sich zu diesem Zeitpunkt sogar tendenziell eine direkte Korrelation des PL/Protein-Verhältnisses mit der Oberflächenspannung (d.h., je höher die Proteinbeladung ist, desto besser ist die Funktion des Surfactant), während bei der Kontrollgruppe und nach zweitägiger Hyperoxie eine inverse Korrelation beider Parameter zu finden ist (d.h., je höher die Proteinbeladung ist, desto schlechter ist die Funktion des Surfactant). Die hieraus resultierende Vermutung, daß sich die Proteinzusammensetzung in der BALF von der akuten Phase zur adaptativen Phase des hyperoxischen Lungenschadens verändert, konnte gelchromatographisch bestätigt werden.

Von verschiedenen Gruppen wurden nach der Begasung von Ratten mit 85-90% O₂ über sieben Tage eine erhöhte Menge an SP-A in der BALF gefunden [Nogee et al, 1989; Nogee et al, 1991; Ohashi et al, 1991]. Auch die Menge an SP-B und SP-C waren in diesem Modell erhöht [Nogee, 1991]. Da SP-B und SP-C die Surfactantfunktion verbessern [Hamm et al, 1996] und SP-A die Surfactantinhibition durch Plasmaproteine aufheben kann [Venkitaraman et al, 1990], würde eine Erhöhung der Menge eines oder mehrerer dieser Surfactantproteine die Tatsache erklären, daß die Oberflächenaktivität des Surfactant mit sinkendem PL/Protein-

Verhältnis ansteigt. Im hier präsentierten Modell des hyperoxischen Lungenschadens wurde die Menge an Surfactantproteinen in der BALF bislang nicht untersucht. Folgeuntersuchungen könnten zeigen, ob die Wiederherstellung der Surfactantfunktion nach siebentägiger Hyperoxie mit einer Vermehrung der Surfactantproteine in der BALF zusammenhängt.

4.3. Poolgrößen und Zusammensetzung der Phospholipide

Die entzündlichen Veränderungen in der Lunge wie Zellproliferation und Invasion von Phagozyten sowie Veränderungen der Surfactantfunktion in Abhängigkeit von der Krankheitsphase legen nahe, daß der Surfactantstoffwechsel durch akute und subchronische Hyperoxie schwerwiegend und unterschiedlich beeinflußt wird. Mengenmäßiger Hauptbestandteil des Surfactant sind ungeachtet der essentiellen Bedeutung spezifischer Apo-Proteine die verschiedenen Phospholipid-Komponenten. PC16:0/16:0 ist dabei diejenige Substanz, die das Erreichen minimaler Oberflächenspannungen < 5 mN/m ermöglicht [van Golde, 1994]. Andere molekulare Spezies von Phosphatidylcholin wie PC16:0/14:0, PC16:0/16:1 und PC16:0/18:1 sind dagegen vermutlich für den Transport und die Adsorption an die Oberfläche nötig [King, 1982]. Die Anwesenheit aller dieser Substanzen ist nötig, um die verschiedenen Aspekte der Surfactantfunktion zu ermöglichen. PC16:0/16:0, dessen Phasenübergangstemperatur aufgrund der beiden gesättigten, sterisch geraden Fettsäureketten oberhalb der Körpertemperatur liegt, stabilisiert die Alveole in der Endexpiration. Die Anwesenheit anderer, ungesättigter Phospholipide, die aufgrund ihrer Molekülstruktur eine niedrigere Phasenübergangstemperatur haben, ist erforderlich, um PC16:0/16:0 zu „lösen“ und durch die erhöhte Fluidität der Lipidschicht dessen Transport und Adsorption an die Grenzschicht zu ermöglichen. Diese Moleküle sind also an den dynamischen Aspekten der Oberflächenaktivität beteiligt. Es ist deshalb verwunderlich, daß im Bereich der Surfactantforschung bislang keine Daten zu den Poolgrößen und zum Metabolismus der individuellen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin existieren. In anderen Arbeiten wurde mit der approximativen, aber ungenauen [Holm et al, 1996] Bestimmung von disaturiertem Phosphatidylcholin gearbeitet [Polak et al, 1992; D'Angio et al, 1997; ; Rice et al, 1989; Ohashi et al, 1991; Young et al, 1982]. Bei dieser Methode wird ein großer Teil der monodesaturierten Phosphatidylcholine PC16:0/16:1, PC16:0/18:1 und PC18:0/18:1 [Holm, 1996] mitbestimmt. Dahingegen wurde in der vorliegenden Arbeit die Zusammensetzung der individuellen molekularen Spezies von Phosphatidylcholin als Hauptphospholipid von Surfactant und Zellmembranen in Lungengewebe, IZS

und BALF untersucht. Die erhaltenen Daten ermöglichen ein tieferes Verständnis der biochemischen Veränderungen des Surfactant nach adaptativem hyperoxischem Lungenschaden.

4.3.1. Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens

Nach zweitägiger hyperoxischer Begasung waren sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung der Surfactantphospholipide in der BALF unverändert. Dies unterstreicht die Bedeutung der Plasmaproteine für die Verschlechterung der Oberflächenspannung. Im IZS dagegen zeigen sich erste Veränderungen in der Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin. Im Lungengewebe ist bei gleicher Zusammensetzung und Stoffmenge der Phosphatidylcholine die Phospholipidmenge leicht erhöht. Schon zu diesem frühen Zeitpunkt zeigen sich also metabolische Veränderungen, die in Lungengewebe, IZS und BALF nicht gleichgerichtet sind. Hieraus kann man schließen, daß schon in der Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens der Phospholipid- und Surfactantstoffwechsel auf verschiedenen Stufen gestört sind. Auffällig ist weiterhin, daß der alveoläre Surfactant, der direkt aus dem intrazellulär gespeicherten Surfactant hervorgeht, nicht die gleiche leicht veränderte Zusammensetzung aufweist. Dies dokumentiert, wie gut dieses System ausbalanciert und gegen störende Einflüsse abgepuffert ist.

4.3.2. Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens

4.3.2.1. Phospholipid-Poolgrößen

Nach siebentägiger hyperoxischer Begasung finden sich drastische Veränderungen in den Phospholipidpools von BALF, IZS und Lungengewebe. Die Phospholipidmenge in allen drei Fraktionen ist um einen vergleichbaren Prozentsatz erhöht.

Eine Vermehrung des alveolären Surfactant-Pools in der adaptativen Phase des hyperoxischen Lungenschadens ist in der Literatur beschrieben. Die Menge an disaturiertem Phosphatidylcholin bzw. Phospholipid nahm sowohl durch mehrtägige (3-7 d) Begasung mit 85-90% O₂ als auch nach der Genesung von einer 64stündigen Begasung mit 100% O₂ zu [Young et al, 1982; Rice et al, 1989; Noguee et al, 1988; Holm et al, 1988]. Die Steigerung war dabei allerdings abhängig vom Modell und schwankte zwischen einer Zunahme um 50% des Phospholipids [Holm et al, 1988] und ca. 800% des disaturierten Phosphatidylcholins [Noguee et al,

1988]. Young fand bei adulten männlichen Sprague-Dawley-Ratten nach Begasung mit 85% O₂ über 7 Tage eine vier- bis fünffache Erhöhung der Menge an disaturiertem Phosphatidylcholin im alveolärem Surfactant und in der Lamellarkörperchenfraktion, aber nur eine Verdopplung im Lungengewebe [Young et al, 1982], wohingegen hier alle drei Phospholipid-Pools um 70-80% erhöht waren. Die Diskrepanz zwischen Youngs Daten und den hier vorgestellten verwundert, da beide Modelle sehr ähnlich angelegt sind.

Young konnte zeigen, daß die Ausbeute bei der Präparation von Lamellarkörperchen nach Hyperoxie unverändert gegenüber Kontrollen ist, daß also der Anstieg der Menge an intrazellulärem Surfactant durch Hyperoxie kein durch die Methode produzierter Effekt ist. Wäre bei der in dieser Arbeit verwendeten Technik der Isolierung von intrazellulärem Surfactant die Ausbeute nach Hyperoxie geringer, würde dies die unterschiedlichen Ergebnisse zum Teil erklären. Dies kann aber ausgeschlossen werden, da der erhöhte Prozentsatz an PC16:0/16:0 im IZS zu einer deutlichen Steigerung des Anteils an dieser Substanz im Lungengewebe führen würde, wenn der IZS-Pool wesentlich stärker zugenommen hätte als der Phospholipid-Pool des Lungengewebes. Dies ist aber nicht zu beobachten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Poolgröße des IZS tatsächlich nicht stärker erhöht ist als diejenige des Lungengewebes. An dieser Stelle zeigt sich auch, daß die von Young durchgeführte alleinige Bestimmung von disaturiertem Phosphatidylcholin nur eine sehr begrenzte Aussagekraft hat, da sie keinerlei Aussagen über die genaue Phospholipidmenge, den Anteil von Phosphatidylcholin an diesen Phospholipiden oder die Stoffmenge von PC16:0/16:0 ermöglicht. Unterschiede in der Methodik können auch bei der BALF nicht die Differenz im Ergebnis erklären. Allerdings handelt es sich bei dem verwendeten Tierstamm um Auszuchttiere, so daß die Suszeptibilität gegenüber Sauerstoff zwischen verschiedenen Studien differieren kann.

Trotz der Unterschiede in den Ergebnissen beider Studien findet sich allerdings eine wichtige Gemeinsamkeit. In beiden Fällen wurde eine gleichmäßige Erhöhung des intrazellulären und alveolären Surfactantpools gefunden. Dies zeigt, daß der Effekt zumindest partiell auf eine Vermehrung der Typ-II-Pneumozyten zurückzuführen ist, die unter vergleichbaren Bedingungen beschrieben wurde [Crapo et al, 1980; Young et al, 1982]. Liegen weiterhin metabolische Störungen vor, so müssen verschiedene Stufen des Surfactant-Metabolismus- und Transports betroffen sein, da bei der Beschleunigung oder Verlangsamung nur eines Vorgangs einer der beiden Pools auf Kosten des anderen wachsen würde. Eine Erhöhung des alveolären Phospholipidpools durch Plasmainflux konnte ausgeschlossen werden. Dies gilt auch für den Phospholipidpool des Lungengewebes. Gründe für dessen Vermehrung sind die histologisch

nachgewiesene erhöhte Zellpopulation mit ihren Membranphospholipiden sowie die Zunahme des IZS.

4.3.2.2. Zusammensetzung der Phosphatidylcholine

Die Zusammensetzung der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin war in Lungengewebe, intrazellulärem und alveolärem Surfactant verändert. Auffällig war die Tatsache, daß die Veränderungen in den drei Fraktionen nicht immer gleichgerichtet waren. Hieraus lassen sich zwei Folgerungen ableiten:

1. Während die Untersuchung der Poolgrößen noch den Eindruck vermitteln könnte, zu diesem Zeitpunkt würden mehr Typ-II-Pneumozyten in einer Lunge mit mehr Zellmasse einfach mehr Surfactant produzieren, so zeigt die Analyse der individuellen molekularen Phosphatidylcholin-Spezies, daß hier sehr viel komplexere Mechanismen vorliegen. Das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Phosphatidylcholinen, welches im Normalfall sehr geringen Schwankungen unterliegt, ist in der adaptativen Phase des hyperoxischen Lungenschadens verschoben. Dies zeigt, daß am Auf- und Abbau sowie am Transport der Phosphatidylcholine Mechanismen beteiligt sind, die nicht für alle Spezies mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen und welche durch die hyperoxische Begasung unterschiedlich beeinträchtigt werden.
2. Die Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies in IZS und BALF waren nahezu gegensätzlich verändert, obwohl der alveoläre Surfactant direkt aus dem intrazellulären Surfactant hervorgeht. Im IZS findet sich anteilmäßig mehr PC16:0/16:0, in der BALF dagegen weniger. Es existiert aber innerhalb dieser Gruppe (7d 85% O₂) keine Korrelation zwischen dem Anteil an PC16:0/16:0 in der BALF und im IZS, was auf eine mehr oder weniger verzögerte Sekretion dieser Spezies hingedeutet hätte. Dies läßt darauf schließen, daß die Vermehrung von PC16:0/16:0 im IZS nicht in einem ursächlichen Zusammenhang mit dessen prozentualer Verminderung in der BALF steht. Der Metabolismus dieser Phosphatidylcholin-Spezies muß daher auf verschiedenen Stufen verändert sein. Auch aus den Erhöhungen aller drei Phospholipid-Pools wurde schon darauf geschlossen, daß eine Störung des Surfactant-Phospholipid-Metabolismus nicht nur einen der aufeinanderfolgenden Mechanismen betreffen kann.

Sowohl in der BALF als auch im Lungengewebe findet sich nicht nur eine absolute, sondern auch anteilmäßige Erhöhung der Menge an PC16:0/20:4. Die aus Arachidonsäure gebildeten

Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Bei der verstärkten Bildung dieser Substanzen kann ein konstanter Arachidonsäurepool im Gewebe nur aufrechterhalten werden, wenn die Synthese von Arachidonsäure auch zunimmt. Ein verminderter Arachidonsäurepool würde zu einer Verknappung der Substanz und zu einem vermindertem Anteil arachidonsäurehaltiger Phosphatidylcholin-Spezies führen. Dies trifft aber für die Lunge nicht zu. Vielmehr finden sich zu einem Zeitpunkt, zu dem vermehrt Entzündungszellen in der Lunge vorhanden sind, zu dem also vermutlich auch vermehrt Arachidonsäure in Entzündungsmediatoren umgesetzt wird, mehr arachidonsäurehaltige Phosphatidylcholin-Spezies. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Erhöhung der Stoffmenge dieser Phosphatidylcholin-Spezies im Lungenparenchym nur durch Plasmainflux und den Einstrom dieser Entzündungszellen zustande kommt. Auch hier muß also davon ausgegangen werden, daß Änderungen des Phosphatidylcholin-Metabolismus die individuellen Phosphatidylcholin-Spezies unterschiedlich betreffen.

Zusammenfassend finden sich schon nach zweitägiger Hyperoxie erste Veränderungen in der Zusammensetzung der Phospholipide des IZS und des Lungengewebes, während der alveoläre Surfactant in dieser Hinsicht noch unverändert ist. Nach siebentägiger Hyperoxie ist die Stoffmenge und die Zusammensetzung der Phospholipide im intrazellulärem und alveolären Surfactantpool sowie im Lungengewebe massiv verändert. Diese Effekte können durch den Einstrom von Blutplasma und neutrophilen Granulozyten nicht oder nur zum Teil erklärt werden. Daher wird hier postuliert, daß ein veränderter Metabolismus an diesen Prozessen beteiligt ist und daß die metabolischen Änderungen sich in der Akutphase und der Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens voneinander unterscheiden. Ein Zusammenhang der Veränderungen in der BALF mit der Surfactantfunktion kann sowohl in der akuten Phase als auch in der adaptativen Phase des nicht letalen hyperoxischen Lungenschadens ausgeschlossen werden.

4.4. Phospholipid-Metabolismus und -Transport

Aus den Veränderungen der Phospholipid-Poolgrößen von Lungengewebe, IZS und BALF sowie phasenabhängig unterschiedlichen Änderungen in der Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies resultierte die Notwendigkeit, mit Markierungsexperimenten Synthese, intrazellulären Transport und Sekretion sowohl des Gesamt-Phosphatidylcholins als auch der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies zu untersuchen. Dies war besonders wichtig im

Hinblick auf die selektive Erhöhung der Surfactant-Hauptkomponente PC16:0/16:0 im IZS und dem Fehlen seiner Akkumulation in der BALF. Im Modell der isolierten perfundierten ventilierten Rattenlunge wurde hierzu die Aufnahme von ^3H -Cholin aus dem Perfusat und sein Einbau in die Phosphatidylcholine des Lungengewebes sowie des intrazellulären und alveolären Surfactant untersucht.

Die Vorteile des Modells der isolierten perfundierten ventilierten Rattenlunge liegen im Erhalt des Zellverbandes und der Abkopplung des Organs von hormonellen Einflüssen des Körpers sowie der Möglichkeit, die Ventilation und Perfusionsparameter zu standardisieren. Hormonelle Einflüsse und die Dehnung der surfactantsynthetisierenden Typ-II-Pneumozyten regeln den Metabolismus und die Sekretion des Surfactant [Wright, 1991; Haagsman et al, 1991]. Da im hyperoxischen Lungenschaden aber sowohl die hormonelle Steuerung des Surfactant-Metabolismus [Polak et al, 1992; Mengel et al, 1993] als auch potentiell die Dehnung des Lungenparenchyms durch dessen Versteifung *in vivo* beeinflusst werden, wurde diesem Modell trotz des begrenzten Versuchszeitraums der Vorzug gegenüber der *in vivo*-Markierung bzw. der Kultivierung von Typ-II-Pneumozyten gegeben. Metabolismusstudien ergeben nur am vitalen Organ valide Ergebnisse. Wichtig ist deshalb eine sehr zügige Präparation und eine ausreichende Versorgung mit organischen Nährsubstanzen und Sauerstoff sowie eine Limitierung des Experiments auf eine Zeitdauer, während der der Metabolismus unverändert aufrecht erhalten wird. Die isolierte perfundierte Lunge wurde schon 1973 zur Untersuchung des Lungenphospholipidmetabolismus angewandt [Godinez et al, 1973]. Seitdem wurde es zur Aufklärung des Surfactantmetabolismus [Moxley, 1991] und seiner hormonellen Kontrolle [Bernhard et al, 1994; Wali et al, 1993; Fisher et al, 1991; Nicholas et al, 1981; Fisher et al, 1985] verwendet. Verschiedene Modelle des radikalinduzierten Lungenschadens, z.B. Hyperoxie [Januszkiewicz, 1984], NO_2 -Exposition [Mengel et al, 1993] und Schaden durch Perfusion mit platelet activating factor (PAF) [Huang, 1994] wurden am Modell der isolierten perfundierten Lunge untersucht. Es wurden Perfusionsexperimente über bis zu 6h Dauer durchgeführt [Fisher et al, 1991]. Dies dokumentiert die Eignung des Modells für die hier durchgeführten Untersuchungen.

4.4.1. Einbau von ^3H -Cholin

Der quasilineare Einbau der Surfactantvorstufe ^3H -Cholin zeigt zusammen mit dem Ausbleiben von Ödemen und Atelektasen die metabolische Integrität und Stabilität des Organs über den Untersuchungszeitraum. Die Anfangskonzentration an Cholin liegt mit $25 \mu\text{mol/l}$ deutlich über der normalen Plasmakonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ [Zeisel et al, 1981; Lanser et al, 1978], die Aufnahme von Cholin ist in der isolierten perfundierten Lunge aber bis zu einer Cholin-konzentration von 10mmol/l proportional zur eingesetzten Konzentration [Johnson et al, 1979]. Das Abflachen der Einbaukurve mit zunehmender Perfusionsdauer ist daher kein Anzeichen von nachlassender Vitalität des Organs, sondern resultiert aus der abnehmenden Cholin-konzentration. In der ersten Stunde der Perfusion werden $7,5 \text{nmol/min}$ ^3H -Cholin von der Lunge aufgenommen, in der dritten Stunde immerhin noch 5nmol/min . Diese Werte stimmen mit der von Johnson ermittelten Einbaurrate überein [Johnson et al, 1979].

4.4.2. Neusynthese von Phosphatidylcholin

Der Einbau von ^3H -Cholin in den Phospholipidpool des Lungengewebes ist wie der Lungen-Phospholipidpool in der Akutphase der Hyperoxie unverändert, in der Adaptationsphase dagegen erhöht. Da die spezifische Aktivität des Phosphocholins in beiden Phasen unverändert ist, kann die ^3H -Cholin-Aktivität im Phospholipid des Lungengewebes mit der Neusynthese von Phosphatidylcholin gleichgesetzt werden. Diese Daten lassen darauf schließen, daß in der Akutphase der Schädigung der Anabolismus von Phosphatidylcholin noch nahezu unverändert funktioniert. In der Adaptationsphase kann die verstärkte Aufnahme von Phospholipidvorstufen als Konsequenz der erhöhten Zellmasse und ihres Erhaltungsstoffwechsels verstanden. Es fällt allerdings auf, daß der Phosphatidylcholin-Pool im Lungengewebe stärker erhöht als die Cholinaufnahme und Neusynthese von Phosphatidylcholin. Hieraus resultiert eine signifikant verminderte spezifische Synthese von Phosphatidylcholin nach sieben Tagen Hyperoxie. Da die surfactantsynthetisierenden Typ-II-Pneumozyten in der Lunge durch eine besonders hohe Phosphatidylcholin-Synthese hervorstechen, wäre eine Verminderung des Anteils an Typ-II-Pneumozyten in der Lunge durch verstärkte Proliferation anderer Zelltypen und Einwanderung von Entzündungszellen theoretisch denkbar. Dagegen spricht aber die Tatsache, daß beide Surfactant-Phospholipidpools um den gleichen Prozentsatz erhöht waren wie der Phospholipidpool im Lungengewebe. Auch fand Young unter gleichen Bedingungen bei einer Verdoppelung des Volumens des Lungenparenchyms eine Verdoppelung der Anzahl an

Typ-II-Pneumozyten [Young et al, 1982], so daß diese Erklärung unwahrscheinlich ist. Die verminderte spezifische Phosphatidylcholin-Synthese wird daher vermutlich durch eine verminderte Surfactant-Phospholipidsynthese verursacht. Dies sollte sich trotz des geringen Anteils dieses Zelltyps von nur ca. 15% aller Zellen des Lungenparenchyms [Crapo et al, 1980] wegen der erwähnten hohen Syntheseleistung bemerkbar machen.

In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise auf eine verminderte Phosphatidylcholin-Synthese in der Lunge nach hyperoxischer Begasung [Gross et al, 1981; Ward et al, 1984; Gilder et al, 1976]. Gross fand nach der Begasung von Mäusen über 48 h mit 98% O₂ *in vivo* einen verminderten Einbau von Glycerin in Phosphatidylcholin und disaturiertes Phosphatidylcholin. Nach 60h Begasung konnte er an vitalen Lungenschnitten einen um 50% verminderten Einbau von Glycerin und Palmitat messen [Gross et al, 1982]. Ward fand nach 48 h Begasung mit > 95% O₂ bei weiblichen neugeborenen Kaninchen an Lungenschnitten einen auf 72% des Kontrollwertes verminderten Einbau von Cholin [Ward et al, 1984]. Nach der Begasung von Kaninchen mit reinem Sauerstoff über 4 h mit 3 atm wurde ein um 44-49% verminderten Einbau von Palmitat, Oleat und Cholin in das Phosphatidylcholin von Lungenschnitten gemessen [Gilder et al, 1976]. Durch die extrem hohe Sauerstoffkonzentration wurde innerhalb von nur 4 h die Phospholipidsynthese genauso stark reduziert wie in dem von Gross beschriebenen Modell innerhalb von 60 h. In diesen Untersuchungen wurde schon in der Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens eine verminderte Synthese gefunden, was im Gegensatz zu den hier beschriebenen Daten steht. Allerdings handelt es sich bei den zitierten Modellen um eine potentiell letale Sauerstoffkonzentration im Gegensatz zu der hier verwendeten adaptativen Dosis, bei der eine verminderte spezifische Synthese erst nach sieben-tägiger Hyperoxie gemessen wurde. Das legt den Schluß nahe, daß die Synthese um so stärker verzögert ist, je länger die Sauerstoffexposition andauert und je konzentrierter das Gas ist. Weiterhin zeigen die hier gewonnenen Daten, daß eine Verlangsamung der Phospholipidsynthese nicht schon in der Akutphase der Hyperoxie eintreten muß, sondern bei geringerer Schädigung der Zellen erst verzögert festzustellen ist. Die Lunge ist demnach in der „Adaptationsphase“ insofern nicht vollständig an den erhöhten Sauerstoffpartialdruck angepaßt, als der Surfactant-Metabolismus nur eingeschränkt funktioniert.

Holm erzielte nach Begasung von Kaninchen mit 100% O₂ über 64 h eine Verminderung des Cholineinbaus in Typ-II-Pneumozyten und zeigte, daß im Anschluß an eine Erholungsphase von 200 h in Raumluft der Einbau dieser Phosphatidylcholin-Vorstufe gegenüber der Kontrolle erhöht und an das erhöhte Phospholipidlevel in der BALF angeglichen war [Holm et al,

1988]. In einer weiteren Studie fand er nach der Begasung von Kaninchen mit 60% O₂ über 3 Wochen in isolierten Typ-II-Pneumozyten einen um 110% erhöhten Einbau von Cholin in Phosphatidylcholin und disaturiertes Phosphatidylcholin sowie einen um 90% erhöhten Phospholipid-Pool der BALF [Holm et al, 1987]. Diese Untersuchungen dokumentieren, daß die Inhibierung der Surfactantsynthese durch Hyperoxie reversibel ist und daß nach vollständiger Adaptierung an die Noxe ein Niveau erreicht wird, welches bei erhöhtem Phospholipid-Pool einer vergleichbaren spezifischen Synthese wie in Kontrolltieren entspricht. Bezogen auf das hier verwendete Modell kann dies dahingehend interpretiert werden, daß die sogenannte Adaptationsphase ein Übergangszustand ist, in dem die Tiere zwar schon in der Lage sind, noch höhere, vorher letale Sauerstoffkonzentrationen zu tolerieren [Rosenbaum et al, 1969], die phospholipid-biochemischen Parameter aber eine eingeschränkte Funktion der Typ-II-Pneumozyten zeigen.

4.4.3. Transport des neusynthetisierten Phosphatidylcholins in den IZS

Der Einbau von Phosphatidylcholin in den IZS innerhalb der isolierten Lungenperfusion ist nach zweitägiger hyperoxischer Begasung gegenüber der Kontrolle vermindert. Dies ist in Hinsicht auf den unveränderten Phospholipid-Pool im IZS bemerkenswert. Einerseits zeigt sich, daß schon zu diesem Zeitpunkt eine massive Veränderung des Surfactant-Transports vorliegt, die sich in der Poolgröße (noch) nicht niederschlägt. Andererseits wirft es die Frage auf, warum der Phospholipidpool trotz verminderten Einbaus von neusynthetisiertem Phosphatidylcholin nicht abnimmt. Theoretisch könnten die Wiederaufnahme von „verbrauchtem“ Surfactant aus der Alveole und das Recycling dieses wiederaufgenommenen Surfactant effektiver geworden sein, so daß der IZS verstärkt aus wiederaufgenommenem Material gebildet wird. Dies würde bedeuten, daß weniger alveolärer Surfactant von Makrophagen phagozytiert wird bzw. durch die Atemwege abtransportiert wird. Allerdings ist die Effektivität des Surfactantrecycling mit bis zu 85% [van Golde, 1994] sehr hoch. Daher ist fragwürdig, ob eine Verringerung des „Surfactant-Verlustes“ ausreicht, um einen verminderten Zustrom von neusynthetisiertem Material in den IZS zu kompensieren. Die Tatsache, daß der Anteil des neusynthetisierten Surfactant, der in die BALF sezerniert wurde, nach zweitägiger Hyperoxie unverändert war, läßt eher darauf schließen, daß der Transport des neusynthetisierten Materials und die Sekretion gleichermaßen verzögert sind. Auch dies würde in einem unveränderten Phospholipid-Pool resultieren.

Nach siebentägiger Begasung findet sich der gleiche Widerspruch wie nach zweitägiger Begasung: bei erhöhter Phospholipidmenge im IZS ist die Integration von neusynthetisiertem Phosphatidylcholin in diesen Pool nur auf Kontrollniveau. Auch zu diesem Zeitpunkt ist wiederum der Anteil des neusynthetisierten Surfactant, der in der BALF gefunden wurde, unverändert, so daß auch in dieser Phase eine gleichzeitige – relative – Verminderung von intrazellulärem Transport in den IZS und Sekretion in die Alveole die plausible Erklärung für diesen Widerspruch ist.

In der Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens durch letale Sauerstoffkonzentrationen wurde von unveränderter Aufnahme von Phosphatidylcholin in Lungenschnitte, verminderter Sekretion von *in vivo* vorgelabeltem Phosphatidylcholin [Ward et al, 1983] und verringerter Aufnahme von exogenem Surfactant *in vivo* [Novotny et al, 1995] berichtet. Die hier präsentierten Daten zeigen, daß die Surfactant-Homöostase auch durch eine adaptative Sauerstoffkonzentration in der gleichen Weise gestört ist und daß diese Veränderungen im Anschluß an die Akutphase der Schädigung nicht abklingen, sondern in der Adaptationsphase weiterbestehen.

4.4.4. Sekretion des neusynthetisierten Phosphatidylcholins in die Alveole

In der Akutphase der Hyperoxie wurde eine gegenüber der Kontrolle verminderte Menge des neusynthetisierten Phosphatidylcholins in der BALF gefunden. Dies könnte allein eine Auswirkung des verzögerten Transports neusynthetisierten Materials in den intrazellulären Surfactant sein. Dagegen spricht aber die Tatsache, daß der Anteil an neusynthetisiertem Surfactant, der in die Alveole sezerniert wurde, gleichgeblieben ist (s.o.). Da absolut weniger neusynthetisierter Surfactant in den IZS integriert wurde, folgt hieraus auch eine Verminderung der sezernierten Stoffmenge. Geht man also davon aus, daß der Transport von neusynthetisiertem Phosphatidylcholin in den IZS verzögert ist, so kann dieses Ergebnis nur dahingehend interpretiert werden, daß auch die Sekretion des neusynthetisierten Surfactant vermindert ist. Daher ergibt sich weiterhin als Konsequenz der verminderten Sekretion bei gleichbleibender Phospholipid-Poolgröße nur die Möglichkeit eines verminderten Reuptake. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sind an dieser Stelle nicht eindeutig (s.o.), und aus den hier dargestellten Untersuchungen ist eine endgültige Antwort auf diese Frage nicht möglich, da das verwendete Modell nicht sämtliche Aspekte des Surfactant-Metabolismus und -Transports erfassen kann.

In der Adaptationsphase der Hyperoxie ist bei erhöhtem alveolärem Phospholipidpool die Sekretion neusynthetisierten Phosphatidylcholins nur auf Kontrollniveau. Auch zu diesem Zeitpunkt ist die Ursache hierfür nicht allein in einem verzögerten intrazellulären Transport zu suchen. Aus den oben angeführten Gründen sprechen die Ergebnisse auch in dieser Phase für eine verringerte Sekretion und möglicherweise ein vermindertes Reuptake alveolären Surfactants in die Typ-II-Pneumozyten. An der prinzipiellen Situation gegenüber der Akutphase der Schädigung hat sich, vermutlich aufgrund der Vermehrung der surfactantproduzierenden Zellen [Crapo et al, 1980; Young et al, 1982], nur der Phospholipidpool, nicht aber die Störung des Metabolismus geändert.

Aus diesen Metabolismusstudien ergibt sich im Zusammenhang mit den Phospholipid-Poolgrößen nun erstmals ein umfangreiches Bild des Phosphatidylcholin-Stoffwechsels in der Akutphase und Adaptationsphase des adaptativen hyperoxischen Lungenschaden: Nach zweitägiger Begasung ist die Aufnahme von Cholin in die Lunge und die Synthese von Phosphatidylcholin unverändert. Der intrazelluläre Transport des neusynthetisierten Materials sowie vermutlich auch Sekretion und Reuptake sind dagegen verzögert. Diese massive Störung des Surfactant-Phospholipid-Metabolismus macht sich aber in den Phospholipid-Pools des intrazellulären und alveolären Surfactant zu diesem Zeitpunkt (noch) nicht bemerkbar. Nach siebentägiger hyperoxischer Begasung ist die Aufnahme von Cholin und die Neusynthese von Phosphatidylcholin erhöht, wegen des hohen Phospholipidpools ist aber die spezifische Synthese erniedrigt. Intrazellulärer Transport, Sekretion und Reuptake sind, soweit das aus den Daten ableitbar ist, immer noch verzögert. Die Störung des Surfactant-Phospholipid-Metabolismus ist zu diesem Zeitpunkt prinzipiell mit derjenigen nach zweitägiger Begasung vergleichbar, hat sich demgegenüber aber weiter verschärft.

4.5. Metabolismus und Transport der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies

Anhand der Analysen der molekularen Spezies von Phosphatidylcholin in Lungengewebe, IZS und BALF zeigt sich, daß der Metabolismus dieser Spezies durch Hyperoxie unterschiedlich verändert ist. Weiterhin wurde auf Basis des Einbaus von ³H-Cholin in die Phospholipid-Pools von Lungengewebe, IZS und BALF eine schwerwiegende Störung des Surfactant-Phospholipid-Metabolismus und -Transports sowohl in der Akutphase als auch in der Adaptationsphase der hyperoxischen Begasung festgestellt, die sowohl die Synthese (nur in

der Adaptationsphase) als auch intrazellulären Transport, Sekretion und möglicherweise Reuptake betrifft. Aus diesem Grund wurde der Einbau von ^3H -Cholin in die Phosphatidylcholin-Spezies in alle drei Fraktionen Lungengewebe, intrazellulären und alveolären Surfactant untersucht.

4.5.1. Metabolismus und Transport in der gesunden Lunge

In der gesunden Lunge wurde der Hauptanteil der ^3H -Markierung in PC16:0/16:0 gefunden. In PC16:0/18:1 und PC16:0/18:2 wurde ein geringerer Anteil an Radioaktivität eingebaut. Es ist aber bekannt, daß in der Lunge PC16:0/18:1 und PC16:0/18:2 die primären Syntheseprodukte der *de novo*-Synthese von Phosphatidylcholin sind [Caesar et al, 1991]. PC16:0/16:0 dagegen wird nur etwa zur Hälfte aus der *de novo*-Synthese gewonnen [Batenburg et al, 1992]. Der Rest dieser Spezies entsteht durch den Austausch der Fettsäure in der sn-2-Position aus monodesaturierten Spezies [Batenburg, 1992]. Hierfür steht der in den Lungenzellen vorhandene Pool freier Fettsäuren zur Verfügung, der sich aus Fettsäuren des Perfusats und des zellulären Pools zusammensetzt. Der Prozeß des Remodelling setzt nach Literaturdaten an Lungen und frisch isolierten Zellen schon wenige Minuten nach der Synthese des Primärmoleküls ein [Rüstow et al, 1992]. Deshalb kann bei den hier gemachten Experimenten nicht zwischen primär synthetisierten Phosphatidylcholin-Spezies und deren nachträglicher Veränderung durch Fettsäureaustausch unterschieden werden. Die Zusammensetzung der neusynthetisierten Phosphatidylcholine zeigt aber, daß im verwendeten Modell der isolierten perfundierten Rattenlunge beide Stoffwechselwege aktiv sind.

Der Anteil der neusynthetisierten Phosphatidylcholine, der in den IZS integriert wird, ist sehr unterschiedlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß genau diejenigen Phosphatidylcholine, die im IZS gegenüber dem Lungengewebe angereichert sind (PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1), schneller in den intrazellulären Surfactantpool integriert werden als andere palmitoylierte Spezies. Dies deutet darauf hin, daß diese surfactanttypischen Phosphatidylcholin-Spezies durch einen selektiven Transport vom Ort der Synthese in die Lamellarkörperchen im IZS gegenüber dem Lungengewebe angereichert werden. Nijssen konnte zeigen, daß Lamellarkörperchen-Proteine bei der Rekonstitution von Lamellarkörperchen bevorzugt mit 1-Acyl-2-palmitoyl-Phosphatidylcholin gegenüber 1-Acyl-2-oleoyl-Phosphatidylcholin assoziieren [Nijssen et al, 1987]. Tsao stellte fest, daß in Lungenschnitten mehr Dipalmitoylphosphatidylcholin als Dioleoylphosphatidylcholin in Lamellarkörperchen inkorporiert wurde [Tsao, 1980]. Diese Ergebnisse deuten an, daß die Integration einzelner

Phosphatidylcholin-Spezies in die Lamellarkörperchen selektiv stattfindet. Die hier präsentierten Daten zeigen erstmalig, daß dieses Prinzip für alle wesentlichen Phosphatidylcholin-Spezies des Surfactant gilt. Die Tatsache, daß die beiden disaturierten Phosphatidylcholone PC16:0/16:0 und PC16:0/14:0 zu einem wesentlich höheren Prozentsatz in den IZS integriert werden als alle einfach und mehrfach ungesättigten Phosphatidylcholone, ist ein Hinweis darauf, daß der zugrunde liegende Transportmechanismus hinsichtlich der räumlichen Struktur des Phosphatidylcholins selektiert und Phosphatidylcholone mit gesättigten, sterisch geraden Fettsäureresten bevorzugt.

Der sezernierte Anteil der in den intrazellulären Surfactant integrierten Phosphatidylcholone ist für die untersuchten palmitoylierten Phosphatidylcholone vergleichbar. Auch unterscheidet sich die Zusammensetzung dieser Phosphatidylcholone in IZS und BALF nur wenig. Dies zeigt, daß bei der Sekretion des Surfactant keine Selektion der individuellen Phosphatidylcholin-Spezies stattfindet. Die Unterschiede in der Zusammensetzung, die zwischen intrazellulärem und alveolärem Surfactant existieren, sind gering und können durch unterschiedliche Turnoverzeiten der verschiedenen Spezies in der Alveole entstehen.

4.5.2. Metabolismus und Transport nach hyperoxischem Lungenschaden

Berechnet man die Synthese der einzelnen Phosphatidylcholin-Spezies, so zeigt sich nach zweitägiger Hyperoxie eine verminderte Synthese von PC16:0/16:0, während alle anderen untersuchten Spezies nicht signifikant verändert sind. Nach siebentägiger Hyperoxie hat trotz erhöhter Poolgrößen aller palmitoylierten Phosphatidylcholone nur die Synthese von PC16:0/18:2 und PC16:0/20:4 zugenommen, woraus eine verminderte spezifische Synthese der „surfactanttypischen“ Phosphatidylcholin-Spezies PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1 und PC16:0/18:1 resultiert. Dies bestätigt die Untersuchungen, die eine verminderte Synthese durch hyperoxische Begasung beschreiben (s.o.), zeigt aber weiterhin, daß es sich hierbei um einen Prozeß handelt, der sehr spezifisch nur einzelne Phosphatidylcholin-Spezies betrifft. Neben vermindertem intrazellulären Transport des neusynthetisierten Phosphatidylcholins und verminderter Sekretion ist in beiden Phasen also auch die Neusynthese einzelner Phosphatidylcholin-Spezies reduziert.

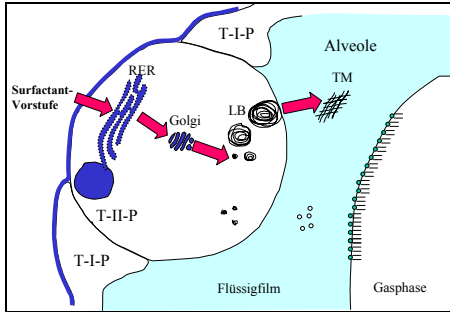
Die Tatsache, daß in der Adaptationsphase die arachidonsäurehaltige Spezies PC16:0/20:4 vermehrt gebildet wird, obwohl Arachidonsäure im Perfusat nicht enthalten ist, stützt die schon aus dem erhöhten Anteil an PC16:0/20:4 in dieser Phase abgeleitete These, daß der

Arachidonsäuremetabolismus der Zellen sich verändert hat. Die vermehrte Synthese von PC16:0/20:4 zeigt ebenso wie der Zuwachs dieser Substanz, daß der intrazelluläre Arachidonsäure-Pool im Zusammenhang mit der massiven Entzündungsreaktion nach siebentägiger hyperoxischer Begasung erhöht ist.

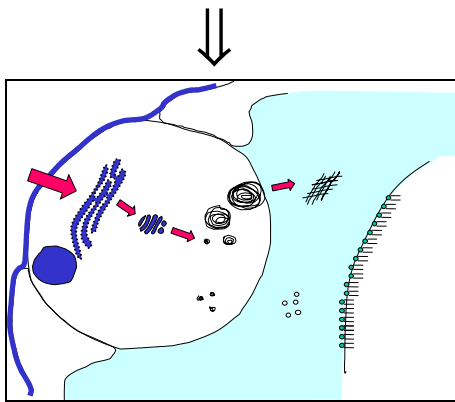
In nicht hyperoxiegeschädigten Lungen werden die verschiedenen Phosphatidylcholone unterschiedlich schnell in den IZS integriert. Die neusynthetisierten surfactanttypischen Spezies PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1 werden beim Transport in den IZS gegenüber anderen palmitoylierten Phosphatidylcholinen bevorzugt, was zu deren Anreicherung im IZS gegenüber dem Lungengewebe führt. In der Akutphase und mehr noch in der Adaptationsphase der Hyperoxie ist diese Selektierung einzelner Phosphatidylcholone zugunsten der disaturierten und zuungunsten der monodesaturierten Spezies verschoben. Das korrespondiert mit dem verminderten Anteil von monodesaturierten Spezies zugunsten von PC16:0/16:0 im IZS. Aufgrund dieser Daten wird postuliert, daß die veränderte Zusammensetzung des gespeicherten Surfactant die Konsequenz einer zunächst nahezu unveränderten, später gleichmäßig verminderten Synthese der surfactanttypischen Phosphatidylcholone und einer Beeinträchtigung des Transports der ungesättigten Phosphatidylcholone in die Lamellarkörperchen ist. Da der Transport der einzelnen Spezies nicht gleichmäßig inhibiert ist, ist zu vermuten, daß es mehrere Transportmechanismen bzw. -proteine gibt, die durch die Hyperoxie unterschiedlich beeinflusst werden.

Aus dem selektiv höheren Transport einzelner neusynthetisierter Phosphatidylcholone in den IZS bei vergleichbarer Sekretion der verschiedenen Spezies resultiert im Alveolarraum der gesunden Lunge eine relative Anreicherung der neusynthetisierten surfactanttypischen Spezies PC16:0/16:0, PC16:0/14:0 und PC16:0/16:1 gegenüber anderen neusynthetisierten palmitoylierten Spezies. Sowohl in der Akutphase als auch in der Adaptationsphase der Hyperoxie findet sich aber ein geringerer Anteil der neusynthetisierten disaturierten Phosphatidylcholin-Spezies im Alveolarraum. Dieser Effekt, der in der Adaptationsphase der Hyperoxie verstärkt auftritt, erklärt einerseits den verringerten Anteil der disaturierten Phosphatidylcholone in der BALF. Andererseits wirft er die Frage auf, warum aus einem intrazellulären Surfactant, der gegenüber der gesunden Lunge an neusynthetisiertem PC16:0/16:0 angereichert ist, ein Surfactant sezerniert werden kann, der weniger dieser neusynthetisierten Spezies enthält. Während in der gesunden Lunge bei der Sekretion der Phosphatidylcholone nicht selektiert wird, scheinen durch die Hyperoxie bevorzugt ungesättigte Phosphatidylcholin-Spezies sezerniert zu werden. Dies ist aber nur möglich, wenn die Zusammensetzung der einzelnen Lamellar-

körperchen durch die hyperoxische Begasung differiert und Speicherorganellen mit einem hohen Anteil an disaturierten Phosphatidylcholinen im Typ-II-Pneumozyten zurückgehalten werden.

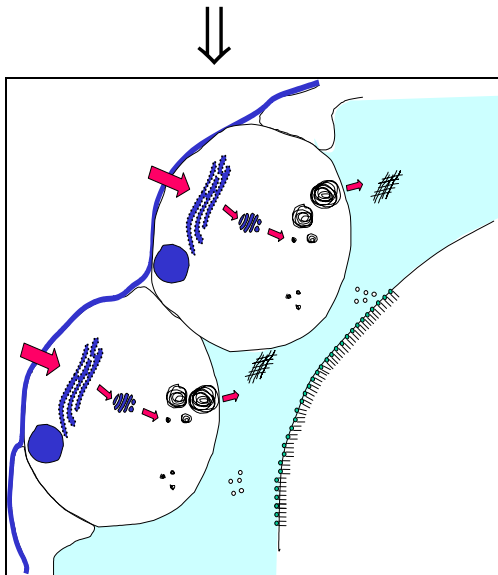


Surfactant-Phospholipidmetabolismus der gesunde Lunge



Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens

- Phospholipid-Pools und Aufnahme der Surfactant-Vorstufe unverändert
- nahezu unveränderte Synthese von Phosphatidylcholin
- intrazellulären Phospholipid-Transports und Sekretion verringert, jeweils abhängig von der Spezies



Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens

- Erhöhte Zellmasse
- erhöhte Phospholipid-Pools von Lungengewebe, IZS und BALF
- erhöhte Aufnahme der Surfactant-Vorstufe
- Surfactant-Synthese, intrazellulärer Phospholipid-Transport und Sekretion relativ zum Phospholipid-Pool vermindert, abhängig von der Spezies

Abbildung 46: Surfactant-Phospholipid-Metabolismus vor und nach hyperoxischem Lungenschaden

Zusammenfassend findet man in der Akutphase der Hyperoxie eine noch nahezu unveränderte Synthese der einzelnen Phosphatidylcholine. Der Transport der ungesättigten Phosphati-

dylcholine in die Lamellarkörperchen ist inhibiert, wohingegen die Sekretion der disaturierten Spezies verzögert ist. In der Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens ist die spezifische Synthese fast aller Phosphatidylcholine verringert. Die Veränderungen im intrazellulären Transport und in der Sekretion der Lamellarkörperchen treten deutlicher zutage und haben zu einer Anreicherung von PC16:0/16:0 im IZS und dessen prozentualer Verminderung im alveolären Surfactant geführt. Abbildung 46 faßt die hyperoxiebedingten Änderungen des Surfactant-Phospholipid-Metabolismus bildhaft zusammen.

Die hier vorliegenden Daten über die akute und subchronische Wirkung von Sauerstoff auf die Lunge und den pulmonalen Surfactant zeigen einerseits eine Beeinträchtigung der Surfactantfunktion in der Akutphase der Schädigung, andererseits eine persistierende massive Störung des Surfactant-Phospholipid-Metabolismus. Ein Einfluß des Phospholipid-Metabolismus auf die Surfactantfunktion konnte in diesem Modell jedoch ausgeschlossen werden. Daraus darf aber nicht die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die unter dem Einfluß von Hyperoxie auftretende Beeinträchtigung der Lungenfunktion im Tiermodell und am beatmeten Patienten generell nicht im Zusammenhang mit dem gestörten Surfactant-Metabolismus steht. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß das gesamte Surfactant-Turnover verlangsamt ist und daß das Gleichgewicht zwischen alveolärem und intrazellulärem Surfactant nur deshalb bestehen bleibt, weil alle Prozesse gleichmäßig verzögert sind. Dies macht die Lunge aber anfällig gegenüber anderen störenden Einflüssen. Eine Schädigung des Lungengewebes durch mechanische Beatmung mit verstärktem Plasmainflux würde zu einem Verlust von aktivem Surfactant sowohl durch dessen Einschluß in Fibringerinnsel [Seeger et al, 1993] als auch durch die beschleunigte Umwandlung der oberflächenaktiven großen Surfactant-Aggregate in inaktive kleine Aggregate [Ueda et al, 1994] führen. Die geschädigten Typ-II-Pneumozyten wären dann möglicherweise nicht mehr in der Lage, diese Verluste auszugleichen, so daß die Lungenfunktion durch einen Mangel an aktivem alveolärem Surfactant beeinträchtigt werden könnte. Eine leichte Erhöhung der Sauerstoffkonzentration oder eine hinzukommende Infektion wirken in die gleiche Richtung: die verstärkte Produktion von Sauerstoffradikalen – im letzteren Fall durch aktivierte Phagozyten – bewirkt eine stärkere Schädigung des Kapillarendothels. Dessen Permeabilität nimmt zu und wiederum dringt verstärkt Plasma in den Alveolarraum ein.

Sobald also die Lunge nicht mehr „nur“ von einer mäßig erhöhten Sauerstoffkonzentration geschädigt wird, sondern andere Faktoren das Ausmaß der Zellschäden steigern, kann die Beeinträchtigung der Surfactantproduktion einen entscheidenden Einfluß auf den Verlauf der

Erkrankung bekommen. Und da, wie erwähnt, die Hyperoxie in der Praxis immer an eine Grunderkrankung gekoppelt ist, darf bei der Entwicklung von neuen Therapieformen dieser Krankheitsbilder der verzögerte Surfactant-Metabolismus nicht außer acht gelassen werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die akute und subchronische Wirkung von Sauerstoff auf die Lunge und den pulmonalen Surfactant untersucht. Nach zwei- (Akutphase) bzw. siebentägiger (Adaptationsphase) Begasung von adulten Ratten mit 85% O₂ wurden Lungenhistologie, Surfactantfunktion, -biochemie und -metabolismus im Vergleich zu Kontrolltieren bestimmt. Die funktionelle Charakterisierung des alveolären Surfactant erfolgte im Pulsating Bubble Surfactometer. Der Lungen- und Surfactant-Phospholipid-Metabolismus wurde anhand des Einbaus von ³H-Cholin in die Phosphatidylcholine von Lungengewebe, intrazellulär gespeichertem Surfactant (IZS) und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) im Modell der isolierten perfundierten Rattenlunge untersucht.

5.1. Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens

In der Akutphase des hyperoxischen Lungenschadens zeigte sich die sauerstoffbedingte Schädigung des Lungenparenchyms histologisch in einer verringerten Anzahl an Septen und in einer erhöhten Dehnbarkeit der Lunge während der isolierten Perfusion. Eine Beeinträchtigung des Kapillarendothels als Barriere für Plasmabestandteile machte sich in einem leicht erhöhten Lungenfeucht-/Lungentrockengewicht-Verhältnis sowie einer erhöhten Proteinmenge in der BALF bemerkbar. Als Folge der Schäden am Lungengewebe kam es zu einer Entzündungsreaktion, die sich zu diesem Zeitpunkt allerdings nur in einer leichten Erhöhung des Anteils eosinophiler Granulozyten an den lavagierbaren Zellen äußerte.

Die Surfactantfunktion war in dieser Phase beeinträchtigt. Hiervon war sowohl die Fähigkeit des Surfactants, kleine Blasen zu stabilisieren, als auch die dynamische Adsorption an die Oberfläche betroffen. Als Ursache für diesen Funktionsverlust konnte die Zusammensetzung der Phospholipide ausgeschlossen werden, da diese unverändert war. Vielmehr wurde eine veränderte Zusammensetzung der Proteine und ein erhöhtes Protein/Phospholipid-Verhältnis in der BALF gefunden, was auf Plasmainflux bzw. Zellyse hinweist und die eingeschränkte Oberflächenaktivität des Surfactants erklärt.

Im Phospholipid-Pool des Lungengewebe fand sich ein vermindertes PC/PL-Verhältnis und im IZS eine Erhöhung des Anteils an PC16:0/16:0, während die Zusammensetzung der Phos-

pholipide in der BALF unverändert war. Die Aufnahme von ^3H -Cholin in die Lunge war auf Kontrollniveau. Auf der Basis des Einbaus von ^3H -Cholin in die Phospholipid-Pools wurde eine unveränderte Synthese sowie eine Beeinträchtigung des intrazellulären Phospholipid-Transports und der Surfactant-Sekretion festgestellt. Der Einbau der markierten Vorstufe in die einzelnen Phosphatidylcholone zeigte, daß nicht alle molekularen Spezies von diesen Änderungen des Metabolismus betroffen waren. Die Verzögerung des intrazellulären Transports betraf die ungesättigten, nicht aber die disaturierten Spezies. Dagegen schienen von der verringerten Sekretion nur die disaturierten, nicht aber die ungesättigten Phosphatidylcholone betroffen zu sein. Die solchermaßen veränderte Phospholipid-Homöostase dokumentiert eine eingeschränkte Funktion der surfactantproduzierenden Typ-II-Pneumozyten, die sich in der Zusammensetzung und Größe der Phospholipid-Pools aber noch nicht auswirkt.

5.2. Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens

In der Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens wurde verstärkte Zellproliferation sowie eine Einwanderung von Granulozyten und Makrophagen in das Interstitium und den Alveolarraum als Zeichen der Entzündungsreaktion festgestellt. Die Lunge war in ihrer Struktur verändert und die Septen verdickt. In dem weiterhin erhöhten Lungenfeucht-/Lungentrockengewicht-Verhältnis und der Proteinansammlung in der BALF zeigt sich die persistierende Permeabilität des Kapillarendothels für Plasmabestandteile.

Die Oberflächenaktivität des Surfactant hatte sich wieder normalisiert, die dynamische Adsorption gegenüber Kontrollen sogar verbessert. Zwar war die Proteinmenge in der BALF weiterhin erhöht, allerdings bewirkte die gesteigerte Proteinbeladung des Surfactant in dieser Phase keine Verringerung der Oberflächenaktivität und die Zusammensetzung der Proteine hatte sich gegenüber der Akutphase verändert.

Die Phospholipid-Pools in Lungengewebe, IZS und BALF waren erhöht und die Zusammensetzung der Phosphatidylcholin-Spezies unterschied sich in allen drei Fraktionen von der Kontrolle. Auffällig war eine Steigerung des Anteils an PC16:0/16:0 im IZS bei einer Reduzierung des Anteils dieser Spezies in der BALF sowie eine überproportionale Vermehrung der arachidonsäurehaltigen Spezies in Lungengewebe und BALF. Der Lungen-Phospholipid-Metabolismus war in der Adaptationsphase noch stärker beeinträchtigt als in der Akutphase. Die Neusynthese von Phosphatidylcholin war erhöht, jedoch weniger ausgeprägt als die Poolgröße im Lungengewebe. Dies betraf alle surfactanttypischen Spezies, nicht aber

PC16:0/20:4. Der Transport neusynthetisierten Phosphatidylcholins in den intrazellulären und alveolären Surfactant-Pool war noch stärker verzögert als in der Akutphase. Die Inhibierung des intrazellulären Transports in den IZS betraf in dieser Phase alle Spezies, allerdings waren die ungesättigten Spezies hiervon wie auch in der Akutphase stärker betroffen als die disaturierten. Die Sekretionshemmung bestand dagegen weiterhin im wesentlichen für die disaturierten Spezies. Auch in der Adaptationsphase des hyperoxischen Lungenschadens sind die Typ-II-Pneumozyten demnach in ihrer Funktion der Surfactantproduktion massiv eingeschränkt.

SCHLAGWORTE:**HYPEROXIE – LUNGE - SURFACTANTMETABOLISMUS**

6. ABSTRACT

In this study, the effect of acute and subchronic influence of oxygen on lung and pulmonary surfactant was investigated. Lung histology, surfactant function, biochemistry and metabolism of adult rats were determined after two (acute phase) and seven (adaptive phase) days of *in vivo* hyperoxia (85% O₂). Surface properties of alveolar surfactant were determined in a pulsating bubble surfactometer. Lung and surfactant phospholipid metabolism was investigated measuring the incorporation of ³H-choline into phosphatidylcholines of lung tissue, intracellularly stored surfactant (ICS) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in isolated perfused rat lungs.

6.1. Acute phase of hyperoxic lung injury

In the acute phase of hyperoxic lung injury histology of lung parenchyma revealed a diminished number of alveolar septae and lungs showed an increased dilatibility during the isolated perfusion. A slightly enhanced lung wet weight/lung dry weight ratio and an increase in alveolar protein indicated a partial loss of the capillary endothelium's ability to operate as a barrier for plasma components. The only symptom of an inflammatory response as a consequence of lung injury was a slight increase in the proportion of eosinophilic granulocytes in lavageable cells.

An impairment of surfactant function included the ability to stabilize small bubbles as well as the dynamic adsorption. The composition of alveolar surfactant phospholipids was not altered and thus was not the reason for this functional loss. An altered protein composition and an enhanced protein/phospholipid ratio in the BALF indicated plasma influx and/or cell lysis and explained the impaired surface tension lowering properties of surfactant.

In lung tissue, the phosphatidylcholine/phospholipid ratio was decreased. The proportion of PC16:0/16:0 was increased in ICS but not in BALF. The uptake of ³H-choline was unaltered. Based on the incorporation of ³H-choline into the phospholipid pools of lung tissue, ICS and BALF, synthesis was unchanged but intracellular transport of phospholipids to lamellar bodies as well as surfactant secretion were impaired. Incorporation of labeled precursor into individual phosphatidylcholines revealed that these alterations did not include all of the spe-

cies. Intracellular transport of unsaturated but not of disaturated species was delayed whereas secretion of disaturated but not unsaturated species seemed to be decreased. These changes in lung phospholipid homeostasis show an impaired function of surfactant production of type II pneumocytes which does not yet affect the composition and pool size of alveolar surfactant phospholipids.

6.2. Adaptive phase of hyperoxic lung injury

In the adaptive phase of hyperoxic lung injury enhanced cell proliferation and the immigration of granulocytes and macrophages into interstitium and alveoli showed the proceeding inflammatory response. The lung structure was altered and alveolar septae were thickened. The increase in lung wet weight/lung dry weight ratio and accumulation of proteins in the alveolar space indicated a persisting permeability of capillary endothelium for plasma components.

The surface tension lowering properties of alveolar surfactant were back to control level and the dynamic adsorption was even more rapid. Protein content of BALF was still and even more increased but the elevated protein/phospholipid ratio did not affect the minimal surface tension, and the composition of proteins was changed compared to the acute phase of injury.

Phospholipid pool sizes in lung tissue, ICS and BALF were elevated and the composition of phosphatidylcholine species was altered. The proportion of PC16:0/16:0 in ICS was increased whereas it was decreased in BALF. Lung phospholipid metabolism was even more impaired in the adaptive phase than it was in the acute phase. Synthesis of phosphatidylcholine was less increased than the phospholipid pool size of the lung. This included PC16:0/16:0, PC16:0/14:0, PC16:0/16:1 and PC16:0/18:1, but not PC16:0/20:4. The intracellular transport of all phosphatidylcholine species was decreased. This effect was more obvious for the unsaturated species, though. Secretion was still inhibited for the disaturated but not unsaturated species. In the adaptive phase of hyperoxic lung injury the ability of type II pneumocytes to produce surfactant is still affected and composition of alveolar surfactant is altered as a consequence.

KEYWORDS:

HYPEROXIA – LUNG - SURFACTANTMETABOLISM

7. LITERATUR

Akino, T. (1992): LIPID COMPONENTS OF THE SURFACTANT SYSTEM, in: Robertson, B., van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. (eds.): PULMONARY SURFACTANT: FROM MOLECULAR BIOLOGY TO CLINICAL PRACTICE, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: MOLEKULARBIOLOGIE DER ZELLE, 3. Deutsche Auflage 1995, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Arkovitz, M.S., Garcia, V.F., Szabo, C., McConnell, K., Bove, K., Wispe, J.R. (1997): DECREASED PULMONARY COMPLIANCE IS AN EARLY INDICATOR OF PULMONARY OXYGEN INJURY, *J. Surg. Res.* 67, 193-198

Balaan, M.R., Bowman, L., Dedhia, H.V., Miles, P.R. (1995): HYPEROXIA-INDUCED ALTERATIONS OF RAT ALVEOLAR LAVAGE COMPOSITION AND PROPERTIES, *Exp. Lung Res.* 21, 141-56

Baritussio, A.G., Magoon, M.W., Goerke, J., Clements, J.A. (1981): PRECURSOR-PRODUCT RELATIONSHIP BETWEEN RABBIT TYPE II CELL LAMELLAR BODIES AND ALVEOLAR SURFACE-ACTIVE MATERIAL. SURFACTANT TURNOVER TIME, *Biochim. Biophys. Acta* 666, 382-93

Barnard, M.L., Gurdian, S., Turrens, J.F. (1993): ACTIVATED POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES INCREASE LOW-LEVEL CHEMILUMINESCENCE OF ISOLATED PERFUSED RAT LUNGS, *J. Appl. Physiol.* 75, 933-39

Barr, H.A., Nicholas, T.E., Power, J.H.T. (1988): CONTROL OF ALVEOLAR SURFACTANT IN RATS AT REST AND DURING PROLONGED HYPERPNEA: PHARMACOLOGICAL EVIDENCE FOR TWO TISSUE POOLS OF SURFACTANT, *J. Pharmacol.* 93, 473-82

Bartlett, G.R. (1959): PHOSPHORUS ASSAY IN COLUMN CHROMATOGRAPHY, *J. Biol. Chem.* 234, 466-68

Batenburg, J.J. (1992): BIOSYNTHESIS OF SURFACTANT LIPIDS, in: Robertson, B., van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. (eds.): PULMONARY SURFACTANT: FROM MOLECULAR BIOLOGY TO CLINICAL PRACTICE, 1992, Elsevier Science Publishers B.V.

Batenburg, J.J. (1992): SURFACTANT PHOSPHOLIPIDS: SYNTHESIS AND STORAGE, *Am. J. Physiol* 262, L367-L385

Batenburg, J.J., den Breejen, J.N., Geelen, M.J.H., Bijleveld, C., van Golde, L.M.G. (1990): PHOSPHATIDYLCHOLINE SYNTHESIS IN TYPE II CELLS AND REGULATION OF THE FATTY ACID SUPPLY, in: von Wichert, P., Müller, B. (eds): BASIC RESEARCH ON LUNG SURFACTANT. *Prog. Respir. Res.*, 1990, Basel, Karger

Bernhard, W. (1988): UNTERSUCHUNGEN ZUM STOFFWECHSEL DER PULMONALEN SURFACTANT- UND SONSTIGER PHOSPHOLIPIDE AN DER ISOLIERTEN, VENTILIERTEN UND PERFUNDIERTEN RATTENLUNGE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES EINFLUSSES DES β -ADRENOCEPTORAGONISTEN TERBUTALIN UND DES β -ADRENOCEPTORANTAGONISTEN ICI 18.551, Inaugural-Dissertation, Universität Marburg

Bernhard, W., Haagsman, H.P., Tschernig, T., Poets, C.F., Postle, A.D., van Eijk, M.E., von der Hardt, H. (1997): CONDUCTIVE AIRWAY SURFACTANT: SURFACE-TENSION FUNCTION, BIOCHEMICAL COMPOSITION, AND POSSIBLE ALVEOLAR ORIGIN, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 41-50

Bernhard, W., Müller, B., von Wichert, P. (1994): β -ADRENERGIC PRIMING OF RATS IN VIVO MODULATES THE EFFECT OF B-AGONIST IN VITRO ON SURFACTANT PHOSPHOLIPID METABOLISM OF ISOLATED LUNGS, *Eur. J. Clin. Invest.* 24, 393-99

Bernhard, W., Postle, A.D., Linck, M., Sewing, K.-F. (1995): COMPOSITION OF PHOSPHOLIPID CLASSES AND PHOSPHATIDYLCHOLINE MOLECULAR SPECIES OF GASTRIC MUCOSA AND MUCUS, *Biochim. Biophys. Acta* 1255, 99-104

Bernhard, W., Wang, J.-Y., Tschernig, T., Tümmler, B., Hedrich, H.J., von der Hardt, H. (1997): LUNG SURFACTANT IN A CYSTIC FIBROSIS ANIMAL MODEL: INCREASED ALVEOLAR PHOSPHOLIPID POOL SIZE WITHOUT ALTERED COMPOSITION AND SURFACE TENSION FUNCTION IN CFTR^{m1HGU/m1HGU} MICE, *Thorax* 52, 723-30

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959): A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-17

Bonikos, D.S., Bensch, K.G., Northway, W.H.Jr. (1976): OXYGEN TOXICITY IN THE NEWBORN: THE EFFECT OF CHRONIC CONTINUOUS 100 PERCENT OXYGEN EXPOSURE ON THE LUNGS OF NEWBORN MICE, *Am. J. Pathol.* 85, 623-50

- Brown, D.L., Pattishall, E.N. (1993): OTHER USES OF SURFACTANT, *Clin. Perinatol.* 20, 761-89
- Burck, H-C. (1988): HISTOLOGISCHE TECHNIK, 6. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart
- Burdge, G.C., Kelly, F.J., Postle, A.D. (1993): SYNTHESIS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE IN GUINEA-PIG FETAL LUNG INVOLVES ACYL REMODELLING AND DIFFERENTIAL TURNOVER OF INDIVIDUAL MOLECULAR SPECIES, *Biochim. Biophys. Acta* 161, 251-57
- Caesar, P.A., McElroy, M.C., Kelly, F.J., Normand, I.C.S., Postle, A.D. (1991): MECHANISMS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE ACYL REMODELING BY HUMAN FETAL LUNG, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 5, 363-70
- Casals, C., Herrera, L., Miguel, E., Garcia-Barreno, P., Muncio, A. (1989): COMPARISON BETWEEN INTRA- AND EXTRACELLULAR SURFACTANT IN RESPIRATORY DISTRESS INDUCED BY OLEIC ACID, *Biochim. Biophys. Acta* 1003, 201-03
- Chander, A., Fisher, A.B. (1990): REGULATION OF LUNG SURFACTANT SECRETION, *Am. J. Physiol.* 258, L241-L253
- Clark, J.M., Lambertsen, C.J. (1967): PULMONARY OXYGEN TOXICITY: A REVIEW, *Pharmacol. Rev.* 23, 37-133
- Clersch, L.B., Massaro, D. (1993): TOLERANCE OF RATS TO HYPEROXIA. LUNG ANTIOXIDANT ENZYME GENE EXPRESSION, *J. Clin. Invest.* 91, 499-508
- Costabel, U. (1994): ATLAS DER BRONCHOALVEOLÄREN LAVAGE, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Coursin, D.B., Cihla, H.P. (1996): PULMONARY EFFECTS OF SHORT TERM SELENIUM DEFICIENCY, *Thorax* 51, 479-83
- Crapo, J.D., Barry, B.E., Foscue, H.A., Shelburne, J.S. (1980): STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN RAT LUNGS OCCURRING DURING EXPOSURES TO LETHAL AND ADAPTIVE DOSES OF OXYGEN, *Am. Rev. Respir. Dis.* 122, 123-45
- Crapo, J.D., Barry, B.E., Gehr, P., Bachofen, M., Weibel, E.R. (1982): CELL NUMBER AND CELL CHARACTERISTICS OF THE NORMAL HUMAN LUNG, *Am. Rev. Respir. Dis.* 125, 740-45
- Crapo, J.D., Marsh-Salin, J., Ingram, P., Pratt, P.C. (1978): TOLERANCE AND CROSS-TOLERANCE USING NO₂ AND O₂. II, PULMONARY MORPHOLOGY AND MORPHOMETRY, *J. Appl. Physiol.* 44, 370-79
- Crapo, J.D., Tierney, D.F. (1974): SUPEROXIDE DISMUTASE AND PULMONARY OXYGEN TOXICITY, *Am. J. Physiol.* 226, 1401-07
- Creuwels, L.A.J.M., van Golde, L.M.G., Haagsman, H.P. (1997): THE PULMONARY SURFACTANT SYSTEM: BIOCHEMICAL AND CLINICAL ASPECTS, *Lung* 175, 1-39
- Crouch, E., Üarghi, D., Kuan, S-F., Persson, A. (1992) SURFACTANT PROTEIN D: SUBCELLULAR LOCALIZATION IN NONCILIATED BRONCHIOLAR EPITHELIAL CELLS, *Am. J. Physiol.* 263, L60-L66
- Crouch, L.S., Prough, R.A., Kennedy, K.A., Snyder, J.B., Warshaw, J.B. (1988): RAT LUNG ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES AND THEIR SPECIFIC PROTEINS DURING HYPEROXIA, *J. Appl. Physiol.* 65, 797-804
- D'Angio, C., Finkelstein, J.N., Lomonaco, M.B., Paxhia, A., Wright, S.A., Baggs, R.B., Notter, R.H., Ryan, R.M. (1997): CHANGES IN SURFACTANT PROTEIN GENE EXPRESSION IN A NEONATAL RABBIT MODEL OF HYPEROXIA-INDUCED FIBROSIS, *Am. J. Physiol.* 272, L720-L730
- Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., Jones, K.M. (1969): DATA FOR BIOCHEMICAL RESEARCH (2. Aufl.), Kap. 11, Clarendon Press
- Dreyfuss, D., Soler, P., Saumon, G. (1995): MECHANICAL VENTILATION-INDUCED PULMONARY EDEMA. INTERACTION WITH PREVIOUS LUNG ALTERATIONS, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1568-75
- Duck-Chong, C.G. (1978): THE ISOLATION OF LAMELLAR BODIES AND THEIR MEMBRANOUS CONTENT FROM RAT LUNG, LAMB TRACHEAL FLUID AND HUMAN AMNIOTIC FLUID, *Life Sci.* 22, 2025-30
- Enhörning, G. (1977): PULSATING BUBBLE TECHNIQUE FOR EVALUATING PULMONARY SURFACTANT, *J. Appl. Physiol.* 43 (2), 198-203
- Enhörning, G., Holm, B.A. (1993): DISRUPTION OF PULMONARY SURFACTANT'S ABILITY TO MAINTAIN OPENNESS OF A NARROW TUBE, *J. Appl. Physiol.* 74, 2922-27
- Ennema, J.J., Kobayashi, T., Robertson, B., Curstedt, T. (1988): INACTIVATION OF EXOGENOUS SURFACTANT IN EXPERIMENTAL RESPIRATORY FAILURE INDUCED BY HYPEROXIA, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 32, 665-71

- Fisher, A.B., Arad, I., Dodia, C., Chander, A., Feinstein, S.I. (1991): cAMP INCREASES SYNTHESIS OF SURFACTANT-ASSOCIATED PROTEIN A BY PERFUSED RAT LUNG, *Am. J. Physiol.* 260, L226-L233
- Fisher, A.B., Dodia, C., Chander, A. (1985): β -ADRENERGIC MEDIATORS INCREASE PULMONARY RETENTION OF INSTILLED PHOSPHOLIPIDS, *J. Appl. Physiol.* 59, 743-748
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. P. (1925): THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS, *J. Biol. Chem.* 66, 375-400
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. (1956): A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDS FROM ANIMAL TISSUES, *J. Biol. Chem.* 226, 497-509
- Forman, H.J., Fisher, A.B. (1981): ANTIOXIDANT ENZYMES OF RAT GRANULAR PNEUMOCYTES. CONSTITUTIVE LEVELS AND EFFECT OF HYPEROXIA, *Lab. Invest* 45, 1-6
- Frank, L, Bucher, J.R., Roberts, R.J. (1978): OXYGEN TOXICITY IN NEONATAL AND ADULT ANIMALS OF VARIOUS SPECIES, *J. Appl. Physiol.* 45, 699-740
- Freeman, B.A., Crapo, J.D. (1982): BIOLOGY OF DISEASE: FREE RADICAL AND TISSUE INJURY, *Lab. Invest* 47, 412-26
- Ghio, A.J., Fracica, P.J., Young, S.L., Piantadosi, C.A. (1994): SYNTHETIC SURFACTANT SCAVENGES OXIDANTS AND PROTECTS AGAINST HYPEROXIC LUNG INJURY, *J. Appl. Physiol* 77, 1217-23
- Gilder, H., McSherry, C.K. (1976): PHOSPHATIDYLCHOLINE SYNTHESIS AND PULMONARY OXYGEN TOXICITY, *Biochim. Biophys. Acta* 44, 48-56
- Godinez, R.I., Longmore, W.J. (1973): USE OF THE ISOLATED PERFUSED RAT LUNG IN STUDIES ON LUNG LIPID METABOLISM, *J. Lipid Res.* 14, 138-44
- Goerke, J. (1992): SURFACTANT AND LUNG MECHANICS, in: Robertson, B., van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. (eds.): PULMONARY SURFACTANT: FROM MOLECULAR BIOLOGY TO CLINICAL PRACTICE, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
- Goerke, J., Clements, J.A. (1986): ALVEOLAR SURFACE TENSION AND LUNG SURFACTANT, in P.T. Macklem and J.Mead (eds.): HANDBOOK OF PHYSIOLOGY – THE RESPIRATORY SYSTEM, American Physiological Society, Bethesda, MD, 1986, 247-61
- Gore, R.G., Jones, R. (1988): PULMONARY VASCULAR REACTIVITY IN HYPEROXIC PULMONARY HYPERTENSION IN THE RAT, *J. Appl. Physiol* 65, 2617-23
- Gratzner, H.G. (1982): MONOCLONAL ANTIBODY TO 5-BROMO- AND 5-IODODEOXYURIDINE: A NEW REAGENT FOR DETECTION OF DNA REPLICATION, *Science* 218, 474-75
- Gross, N.J., Smith, D.M. (1981): IMPAIRED SURFACTANT PHOSPHOLIPID METABOLISM IN HYPEROXIC MOUSE LUNG, *J. Appl. Physiol.* 51, 1198-1203
- Haagsman, H.P. (1994): SURFACTANT PROTEINS A AND D, *Biochem. Soc. Trans* 22, 100-06
- Haagsman, H.P., van Golde, L.M.G. (1991): SYNTHESIS AND ASSEMBLY OF LUNG SURFACTANT, *Annu. Rev. Physiol.* 53, 441-64
- Hallman, M., Miyai, K., Wagner, R.M. (1976): ISOLATED LAMELLAR BODIES FROM RAT LUNG. CORRELATED ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES, *Lab. Invest.* 35, 79-8
- Hamm, H., Fabel, H., Bartsch, W. (1992): THE SURFACTANT SYSTEM OF THE ADULT LUNG: PHYSIOLOGY AND CLINICAL PERSPECTIVES, *Clin. Investig.* 70, 637-57
- Hamm, H., Kroegel, C. Hohlfeld, J. (1996): SURFACTANT: A REVIEW OF ITS FUNCTIONS AND RELEVANCE IN ADULT RESPIRATORY DISORDERS, *Respir. Med.* 90, 251-70
- Harris, J.D., Jackson, F., Moxley, M.A., Longmore, W.J. (1989): EFFECTS OF EXOGENOUS SURFACTANT INSTILLATION IN EXPERIMENTAL ACUTE LUNG INJURY, *J. Appl. Physiol* 66, 1846-51
- Hartog, A., Gommers, D., Lachmann, B. (1995): ROLE OF SURFACTANT IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (ARDS), *Monatsh. Arch. Chest. Dis.* 50, 372-77
- Ho, Y.-S., Dey, M.S., Crapo, J.D. (1996): ANTIOXIDANT ENZYME EXPRESSION IN RAT LUNGS DURING HYPEROXIA, *Am. J. Physiol.* 270, L810-L818
- Holm, B.A., Wang, Z., Notter, R.H. (1999): MULTIPLE MECHANISMS OF LUNG SURFACTANT INHIBITION, *Pediatr. Res.* 46, 85-93

- Holm, B.A., Enhorning, G., Notter, R.H. (1988): A MECHANISM BY WHICH PLASMA PROTEINS INHIBIT SURFACTANT FUNCTION, *Chem. Phys. Lipids* 49, 49-55
- Holm, B.A., Matalon, S., Finkelstein, J.N., Notter, R.H. (1988): TYPE II PNEUMOCYTE CHANGES DURING HYPEROXIC LUNG INJURY AND RECOVERY, *J. Appl. Physiol.* 65, 2672-78
- Holm, B.A., Notter, R.H. (1987): EFFECTS OF HEMOGLOBIN AND RED BLOOD CELL MEMBRANE LIPIDS ON THE BIOPHYSICAL AND PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF PULMONARY SURFACTANT, *J. Appl. Physiol.* 63, 1434-42
- Holm, B.A., Notter, R.H., Leary, J.F., Matalon, S. (1987): ALVEOLAR EPITHELIAL CHANGES IN RABBITS AFTER A 21-DAY EXPOSURE TO 60% O₂, *J. Appl. Physiol.* 62, 2230-36
- Holm, B.A., Notter, R.H., Siegle, J., Matalon, S. (1985): PULMONARY PHYSIOLOGICAL AND SURFACTANT CHANGES DURING INJURY AND RECOVERY FROM HYPEROXIA, *J. Appl. Physiol* 59, 1402-09
- Horowitz, S., Watkins, R.H., Auten, L.R.Jr., Mercier, C.E., Cheng, E.R. (1991): DIFFERENTIAL ACCUMULATION OF SURFACTANT PROTEIN A,B, AND C mRNA IN TWO EPITHELIAL CELL TYPES OF HYPEROXIC LUNGS, *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5, 511-15
- Huang, Y.-C., Nozik, E.S., Piantadosi, C.A. (1994): SUPEROXIDE DISMUTASE POTENTIATES PLATELET-ACTIVATING FACTOR-INDUCED INJURY IN PERFUSED LUNG, *Am. J. Physiol.* 266, L-246-L254
- Hunt, A.N., Burdge, G.C., Postle, A.D. (1996): PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF NEONATAL GUINEA PIG LIVER AND PLASMA: EFFECT OF POSTNATAL FOOD RESTRICTION, *Lipids* 31, 489-95
- Issa, A., Lappalainen, U., Kleinman, M., Bry, K., Hallman, M. (1999): INHALED NITRIC OXIDE DECREASES HYPEROXIA-INDUCED SURFACTANT ABNORMALITY IN PRETERM RABBITS, *Ped. Res.* 45, 247-54
- Januszkiewicz, A.J., Faiman, M.D. (1984): THE EFFECT OF IN VIVO HYPEROXIC EXPOSURE ON THE RELEASE OF ENDOGENOUS HISTAMINE FROM THE RAT ISOLATED PERFUSED LUNG, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72, 134-41
- Jenkinson, S.G., Black, R.D., Lawrence, R.A. (1988): GLUTATHIONE CONCENTRATIONS IN RAT LUNG BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID: EFFECTS OF HYPEROXIA, *J. Lab. Clin. Med.* 112, 345-51
- Johnson, R.G., Lugg, M.A., Nicholas, T.E. (1979): UPTAKE OF [¹⁴C] CHOLINE AND INCORPORATION INTO LUNG PHOSPHOLIPID BY THE ISOLATED PERFUSED RAT LUNG, *Lipids* 14, 555-58
- Junqueira, L.C., Carneiro, J.: HISTOLOGIE, 3. deutsche Auflage, 1991, Springer-Verlag, Berlin
- Katyal, S.L., Estes, L.W., Lombardi, B. (1977): METHOD FOR THE ISOLATION OF SURFACTANT FROM HOMOGENATES AND LAVAGES OF LUNG OF ADULT, NEWBORN, AND FETAL RATS, *Lab. Invest.* 36, 585-92
- Kim, D.K., Fukuda, T., Thompson, B.T., Cockrill, B., Hales, C., Bonventre, J.V. (1995): BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID PHOSPHOLIPASE AS ACTIVITIES ARE INCREASED IN HUMAN ADULT RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME, *Am. J. Physiol.* 269, L109-L118
- Kimball, R.E., Reddy, K., Peirce, T.H., Schwartz, L.W., Mustafa, M.G., Cross, C.E. (1976): OXYGEN TOXICITY: AUGMENTATION OF ANTIOXIDANT DEFENSE MECHANISMS IN RAT LUNG, *Am. J. Physiol* 230, 1425-31
- King, R.J. (1982): PULMONARY SURFACTANT, *J. Appl. Physiol.* 53, 1-8
- King, R.J., Clements, J.A. (1972): SURFACE ACTIVE MATERIAL FROM DOG LUNG. II. COMPOSITION AND PHYSIOLOGICAL CORRELATIONS, *Am. J. Physiol* 223, 715-26
- King, R.J., Coalson, J.J., Seidenfeld, J.J., Anzueto, A.R., Smith, D.B., Peters, J.I. (1989): O₂- AND PNEUMONIA-INDUCED LUNG INJURY. II. PROPERTIES OF PULMONARY SURFACTANT, *J. Appl. Physiol.* 67, 357-65
- Kistler, G.S., Caldwell, P.R.B., Weibel, E.R. (1967): DEVELOPMENT OF FINE STRUCTURAL DAMAGE TO ALVEOLAR AND CAPILLARY LINING CELLS IN OXYGEN-POISONED RAT LUNGS, *J. Cell. Biol.* 33, 605-28
- Kobayashi, T., Nitta, K., Ganzuka, M., Inui, S., Grossmann, G., Robertson, B. (1991): INACTIVATION OF EXOGENOUS SURFACTANT BY PULMONARY EDEMA FLUID, *Pediatr. Res.* 29, 353-56
- Lachmann, B. (1992): OPEN UP THE LUNG AND KEEP THE LUNG OPEN, *Intensive Care Med.* 18, 319-21
- Lanser, A.C., Mounts, T.L., Emken, E.A. (1978): METABOLISM OF LINOLEATE VERSUS LINOELAIDATE IN THE LAYING HEN, *Lipids* 13, 103-09
- Layne, E. (1957): SPECTROPHOTOMETRIC AND TURBIDIMETRIC METHODS FOR MEASURING PROTEINS, *Methods Enzymol.* 3, 447-454
- Lewis, J.F., Ikegami, M., Jobe, A.H. (1992): METABOLISM OF EXOGENOUSLY ADMINISTERED SURFACTANT IN THE ACUTELY INJURED LUNGS OF ADULT RABBITS, *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 19-23

- Löffler, G., Petrides, P.E.: BIOCHEMIE UND PATHOBIOCHEMIE, 5 Auflage 1997, Springer-Verlag Berlin
- Longmore, W.J., Moxley, M.A. (1992): METABOLISM OF PULMONARY SURFACTANT: MODEL SYSTEMS, in: Robertson, B., van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. (eds.): PULMONARY SURFACTANT: FROM MOLECULAR BIOLOGY TO CLINICAL PRACTICE, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT, *J. Biol. Chem.* 193, 265-75
- Magoon, M.W., Wright, J.R., Baritussio, A., Williams, M.C., Goerke, J., Benson, B.J., Hamilton, R.L., Clements, J.A. (1983): SUBFRACTIONATION OF LUNG SURFACTANT – IMPLICATIONS FOR METABOLISM AND SURFACE ACTIVITY, *Biochim. Biophys. Acta* 750, 18-31
- Mansour, H., Brun-Pascaud, M., Marquetty, C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Hakim, J., Pocidalò, J.-J. (1988): PROTECTION OF RAT FROM OXYGEN TOXICITY BY INDUCERS OF CYTOCHROME P-450 SYSTEM, *Am. Rev. Respir. Dis.* 137, 688-94
- Mason, R.J., Nellenbogen, J., Clements, J.A. (1976): ISOLATION OF DISATURATED PHOSPHATIDYLCHOLINE WITH OSMIUM TETROXIDE, *J. Lipid Res.* 17, 281-84
- Matalon, S., Holm, B.A., Leowen, G.M., Baker, R.R., Nötter, R.H. (1988): SUBLETHAL HYPEROXIC INJURY TO THE ALVEOLAR EPITHELIUM AND THE PULMONARY SURFACTANT SYSTEM, *Exp. Lung Res.* 14, 1021-33
- Mengel, R.G., Bernhard, W., Barth, P., von Wichert, P., Müller, B. (1993): IMPAIRED REGULATION OF SURFACTANT PHOSPHOLIPID METABOLISM IN THE ISOLATED RAT LUNG AFTER NITROGEN DIOXIDE INHALATION, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 216-23
- Minoo, P., King, R.J., Coalson, J.J. (1992): SURFACTANT PROTEINS AND LIPIDS ARE REGULATED INDEPENDENTLY DURING HYPEROXIA, *Am. J. Physiol.* 263, L291-8
- Morgan, T.E. (1971): BIOSYNTHESIS OF PULMONARY SURFACE ACTIVE LIPID, *Arch. Internal Med.* 127, 401-07
- Moxley, M.A., Jacoby, J., Longmore, W.J. (1991): UPTAKE AND REUTILIZATION OF SURFACTANT PHOSPHOLIPIDS BY TYPE II CELLS OF ISOLATED PERFUSED LUNG, *Am. J. Physiol.* 260, L268-L273
- Nicholas, T.E., Barr, H.A. (1981): CONTROL OF RELEASE OF SURFACTANT PHOSPHOLIPIDS IN THE ISOLATED PERFUSED RAT LUNG, *J. Appl. Physiol.* 51, 96-98
- Nijssen, J.G., Hardeman, D., Lucas Luyckx, H.N.M., Promes, L.W., Post, J.A., van den Bosch, H. (1987): ISOLATION OF PROTEIN COMPONENTS FROM RAT LUNG LAMELLAR BODIES, *Biochim. Biophys. Acta* 917, 131-39
- Nogee, L.M., Wispe, J.R. (1988): EFFECTS OF PULMONARY OXYGEN INJURY ON AIRWAY CONTENT OF SURFACTANT-ASSOCIATED PROTEIN A, *Ped. Res.* 24, 568-73
- Nogee, L.M., Wispé, J.R., Clark, J.C., Whitsett, J.A. (1989): INCREASED SYNTHESIS AND mRNA OF SURFACTANT PROTEIN A IN OXYGEN EXPOSED RATS, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1, 119-25
- Nogee, L.M., Wispé, J.R., Clark, J.C., Whitsett, J.A. (1989): INCREASED EXPRESSION OF PULMONARY SURFACTANT PROTEINS IN OXYGEN-EXPOSED RATS, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 4, 102-97
- Novotny, E., Hudak, B.B., Matalon, S., Holm, B.A. (1995): HYPEROXIC LUNG INJURY REDUCES EXOGENOUS SURFACTANT CLEARANCE *In Vivo*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1843-47
- Ohashi, T., Tadaka, S., Motoike, T., Tsuneishi, S., Matsuo, M., Sano, K., Nakamura, H. (1991): EFFECT OF DEXAMETHASONE ON PULMONARY SURFACTANT METABOLISM IN HYPEROXIA-TREATED RAT LUNGS, *Pediatr. Res.* 29, 173-77
- Ohashi, T., Takada, S., Motoike, T., Tsuneishi, S., Matsuo, M., Sano, K., Nakamura, H. (1991): EFFECT OF DEXAMETHASONE ON PULMONARY SURFACTANT METABOLISM IN HYPEROXIA-TREATED RAT LUNGS, *Ped. Res.* 29, 173-77
- Oosterlaken-Dijksterhuis, M.A., van Eijk, M., van Buel, B.L.M., van Golde, L.M.G., Haagsman, H.P. (1991): SURFACTANT PROTEIN COMPOSITION OF LAMELLAR BODIES ISOLATED FROM RAT LUNG, *Biochem. J.* 274, 115-19
- Palazzo, R.M., Wangenstein, O.D., Niewoehner, D.E. (1992): TIME COURSE OF FUNCTIONAL REPAIR OF THE ALVEOLAR EPITHELIUM AFTER HYPEROXIC INJURY, *J. Appl. Physiol.* 73, 1881-87
- Pattle, R.E. (1955): PROPERTIES, FUNCTION AND ORIGIN OF THE ALVEOLAR LINING LAYER, *Nature Lond.* 175, 1125-26
- Patton, G.M., Fasulo, J.M., Robins, S.J. (1982): SEPARATION OF PHOSPHOLIPIDS AND INDIVIDUAL MOLECULAR SPECIES OF PHOSPHOLIPIDS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, *J. Lipid Res.* 23, 190-96

- Polak, M.J., Knight, M.E., Andresen, T.L., DeSena, C. (1992): EFFECTS OF HYPEROXIA AND BETA-ADRENERGIC STIMULATION ON PULMONARY SURFACTANT IN NEONATAL RABBITS, *Exp. Lung Res.* 18, 373-84
- Post, M., Batenburg, J.J., Schuurmans, E.A.J.M., Oldenburg, V., van der Molen, A.J., van Golde, L.M.G. (1983): THE PERFUSED RAT LUNG AS A MODEL FOR STUDIES ON THE FORMATION OF SURFACTANT AND THE EFFECT OF AMBROXOL ON THIS PROCESS, *Lung* 161, 349-59
- Postle, A.D. (1987): METHOD FOR THE SENSITIVE ANALYSIS OF INDIVIDUAL MOLECULAR SPECIES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING POST-COLUMN FLUORESCENCE DETECTION, *J. Chromatogr.* 415, 241-51
- Putman, E., van Golde, L.M.G., Haagsman, H.P. (1997): TOXIC OXIDANT SPECIES AND THEIR IMPACT ON THE PULMONARY SURFACTANT SYSTEM, *Lung* 175, 75-103
- Raymondos, K., Martin-Carrera, I., Bernhard, W., Poets, C., von der Hardt, H. (1996): A METHOD FOR THE ISOLATION AND PREPARATION OF SURFACTANT FROM TRACHEOBRONCHIAL ASPIRATES IN INFANTS AND CHILDREN FOR QUANTITATIVE AND PULSATING BUBBLE ANALYSIS, *Eur. J. Clin. Investig.* 26, 983-88
- Rice, W.R., Burhans, M., Wispe, J.R. (1989): EFFECT OF OXYGEN EXPOSURE ON ATP CONTENT OF RAT BRONCHOALVEOLAR LAVAGE, *Ped. Res.* 25, 396-98
- Rick, W. (1990): *KLINISCHE CHEMIE UND MIKROSKOPIE*, 6. Auflage, Springer-Verlag Berlin
- Robertson, B., van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. (eds.) (1992): *PULMONARY SURFACTANT: FROM MOLECULAR BIOLOGY TO CLINICAL PRACTICE*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
- Rosenbaum, R.M., Wittner, M., Lenger, M. (1969): MITOCHONDRIAL AND OTHER ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN GREAT ALVEOLAR CELLS OF OXYGEN-ADAPTED AND POISONED RATS, *Lab. Invest.* 20, 516-28
- Royston, B.D., Webster, N.R., Nunn, J.F. (1990): TIME COURSE OF CHANGES IN LUNG PERMEABILITY AND EDEMA IN THE RAT EXPOSED TO 100% OXYGEN, *J. Appl. Physiol* 69, 1532-37
- Rüstow, B., Kunze, D., Rabe, H., Reichmann G. (1985): THE MOLECULAR SPECIES OF PHOSPHATIDIC ACID, DIACYLGLYCEROL AND PHOSPHATIDYLCHOLINE SYNTHESIZED FROM SN-GLYCEROL 3-PHOSPHATE IN RAT LUNG MICROSOMES, *Biochim. Biophys. Acta* 835, 465-76
- Rüstow, B., Schlame, M., Haupt, R., Wilhelm, D., Kunze, D. (1992): STUDIES ON THE FORMATION OF DIPALMITOYL SPECIES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE AND PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE IN PULMONARY TYPE II CELLS, *Biochem. J.* 282, 453-58
- Said, S.I., Avery, M.E., Davies, R.K., Banerjee, C.M., El-Gohary, M. (1964): PULMONARY SURFACE ACTIVITY IN INDUCED PULMONARY EDEMA, *J. Clin. Invest.* 44, 458-64
- Sanders, R.L., Hassett, R.J., Vatter, A.E. (1980): ISOLATION OF LUNG LAMELLAR BODIES AND THEIR CONVERSION TO TUBULAR MYELIN FIGURES IN VITRO, *Anatom. Rec.* 198, 485-501
- Schlame, M., Casals, C., Rüstow, B., Rabe, H., Kunze, D. (1988): MOLECULAR SPECIES OF PHOSPHATIDYLCHOLINE AND PHOSPHATIDYLGLYCEROL IN RAT LUNG SURFACTANT AND DIFFERENT POOLS OF PNEUMOCYTES TYPE II, *Biochem. J.* 253, 209-15
- Seeger, W., Grube, C., Günther, A. (1993): PROTEOLYTIC CLEAVAGE OF FIBRINOGEN: AMPLIFICATION OF ITS SURFACTANT INHIBITORY CAPACITY, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 9, 239-47
- Shelley, S.A., Balis, J.U., Paciga, J.E., Espinoza, C.G., Richman, A.V. (1982): BIOCHEMICAL COMPOSITION OF ADULT HUMAN LUNG SURFACTANT, *Lung* 160, 195-206
- Shelley, S.A., Paciga, J.E., Balis, J.U. (1977): PURIFICATION OF SURFACTANT FROM LUNG WASHINGS AND WASHINGS CONTAMINATED WITH BLOOD CONSTITUENTS, *Lipids* 12, 505-10
- Shelley, S.A., Paciga, J.E., Balis, J.U. (1984): LUNG SURFACTANT PHOSPHOLIPIDS IN DIFFERENT ANIMAL SPECIES, *Lipids* 19, 857-62
- Shiffer, K., Hawgood, S., Haagsman, H.P., Benson, B., Clements, J.A., Goerke, J. (1993): LUNG SURFACTANT PROTEINS, SP-B AND SP-C, ALTER THE THERMODYNAMIC PROPERTIES OF PHOSPHOLIPID MEMBRANES: A DIFFERENTIAL CALORIMETRY STUDY, *Biochem.* 32, 590-97
- So, K.L., de Buijzer, E., Gommers, D., Lachmann, B. (1993): EFFECT OF EXOGENOUS SURFACTANT THERAPY ON PARAQUAT INTOXICATION IN RATS, *Eur. Respir. J.* 6 (Suppl.), 559s
- Sosenko, I.R., Innis, S.M., Frank, L. (1991): INTRALIPID INCREASES LUNG POLYUNSATURATED FATTY ACIDS AND PROTECTS NEWBORN RATS FROM OXYGEN TOXICITY, *Ped. Res.* 30, 413-17

- Sosensko, I.R., Innis, S.M., Frank, L. (1989): MENHADEN FISH OIL, N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, AND PROTECTION OF NEWBORN RATS FROM OXYGEN TOXICITY, *Ped. Res.* 25, 399-404
- Stenzel, J.D., Welty, S.E., Benzick, A.E., Smith, E.O'B., Smith, C.V., Hansen, T.N. (1993): HYPEROXIC LUNG INJURY IN FISCHER AND SPRAGUE-DAWLEY RATS IN VIVO, *Free Rad. Biol. Med.* 14, 531-39
- Sugahara, K., Iyama, K., Sano, K., Kuroki, Y., Akino, T., Matsumoto, M. (1996): OVEREXPRESSION OF SURFACTANT PROTEIN SP-A, SP-B, AND SP-C mRNA IN RAT LUNGS WITH LIPOPOLYSACCHARIDE INDUCED INJURY, *Lab. Invest.* 74, 209-20
- Sugahara, K., Iyama, K., Sano, K., Morioka, T. (1994): DIFFERENTIAL EXPRESSIONS OF SURFACTANT PROTEIN SP-A, SP-B, AND SP-C mRNA IN RATS WITH STREPTOTOCIN-INDUCED DIABETES DEMONSTRATED BY IN SITU HYBRIDIZATION, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 11, 397-404
- Ueda, T., Ikegami, M., Jobe, A. (1994): SURFACTANT SUBTYPES. IN VITRO CONVERSION, IN VIVO FUNCTION, AND EFFECTS OF SERUM PROTEINS., *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 149, 1254-59
- Vadas, P., Pruzanski, W., Stefanski, E., Sternby, B., Mustard, R., Bohnen, J., Fraser, I., Farewell, V., Bombardier, C. (1988): PATHOGENESIS OF HYPOTENSION IN SEPTIC SHOCK: CORRELATION OF CIRCULATORY PHOSPHOLIPASE A₂ LEVELS WITH CIRCULATORY COLLAPSE, *Crit. Care Med.* 16, 1-7
- Välimäki, M., Pelliniemi, T.-T., Niinikoski, J. (1975): OXYGEN-INDUCED CHANGES IN PULMONARY PHOSPHOLIPIDS IN THE RAT, *J. Appl. Physiol* 39, 780-87
- Van Eijk, M., De Haas, C.G.M., Haagsman, H.P. (1995): QUANTITATIVE ANALYSIS OF PULMONARY SURFACTANT PROTEINS B AND C, *Anal. Biochem* 232, 231-37
- Van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J., Robertson, B. (1994): THE PULMONARY SURFACTANT SYSTEM, *NIPS* 9, 13-20
- Van Golde, L.M.G., de Vries, A.C.J., Batenburg, J.J. (1987): ASPECTS OF METABOLISM AND STORAGE OF PULMONARY SURFACTANT: EXPERIMENTS WITH ISOLATED TYPE II PNEUMOCYTES AND LAMELLAR BODIES, *Eur. J. Respir. Dis.* 71. Suppl. 153, 182-88
- Voet, D., Voet, J.G.: BIOCHEMIE, 1.korrigierter Nachdruck der 1. deutschen Auflage 1994, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Von Neergard, K. (1929): NEUE AUFFASSUNGEN ÜBER EINEN GRUNDBEGRIFF DER ATEMMECHANIK. DIE RETRAKTIONSKRAFT DER LUNGE, ABHÄNGIG VON DER OBERFLÄCHENSPIGUNG IN DEN ALVEOLEN, *Z. Gesamte Exp. Med.* 66, 373-94
- Wali, A., Beers, M.F., Dodia, C., Feinstein, S.I., Fisher, A.B. (1993): ATP AND ADENOSINE 3', 5'-CYCLIC MONOPHOSPHATE STIMULATE THE SYNTHESIS OF SURFACTANT PROTEIN A IN RAT LUNG, *Am. J. Physiol* 264, L431-L437
- Ward, J.A., Roberts, R.J. (1984): EFFECT OF HYPEROXIA ON PHOSPHATIDYLCHOLINE SYNTHESIS, SECRETION, UPTAKE UND STABILITY IN THE NEWBORN RABBIT LUNG, *Biochim. Biophys. Acta* 796, 42-50
- Ward, J.A., Roberts, R.J. (1984): HYPEROXIA EFFECTS ON PULMONARY PRESSURE: VOLUME CHARACTERISTICS AND LAVAGE SURFACTANT PHOSPHOLIPID IN THE NEWBORN RABBIT, *Biol. Neonate* 46, 139-48
- Weibel, E.R. (1971): OXYGEN EFFECT ON LUNG CELLS. *Arch. Internal. Med.* 128, 54-56
- Weissbach, S., Neuendank, A., Pettersson, M., Schaberg, T., Pison, U. (1994): SURFACTANT PROTEIN A MODULATES RELEASE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES FROM ALVEOLAR MACROPHAGES, *Am. J. Physiol* 267, L660-L666
- Westermann, J., Ronneberg, S., Fritz, F.J., Pabst, R. (1989): PROLIFERATION OF MACROPHAGE SUBPOPULATIONS IN THE ADULT RAT: COMPARISON OF VARIOUS LYMPHOID ORGANS, *J. Leucyte Biol.* 46, 263-69
- Wright, J.R. (1990): CLEARANCE AND RECYCLING OF PULMONARY SURFACTANT. *Am. J. Physiol.* 259, L1-L12
- Young, S.L., Crapo, J.D., Kremers, S.A., Brumley, G.W. (1982): PULMONARY SURFACTANT LIPID PRODUCTION IN OXYGEN-EXPOSED RAT LUNGS, *Lab. Invest.* 46, 570-76
- Zeisel, S.H., Wurtmann, R.J. (1981): DEVELOPMENTAL CHANGES IN RAT BLOOD CHOLINE CONCENTRATION, *Biochem. J.* 198, 565-70

8. ANHANG

8.1. Formeln

PL-Stoffmenge in der Lunge:

$$n(PL) = n(50\mu\text{l FE}) * \frac{V_{FE}}{50\mu\text{l}} * \frac{m(Lu_r + Lu_l)}{m(Lu_r)} \quad (\text{Formel 1})$$

PL-Stoffmenge in der BAL:

$$n(PL) = n(500\mu\text{l BALE}) * \frac{V_{BAL}}{500\mu\text{l}} \quad (\text{Formel 2})$$

PL-Stoffmenge im IZS:

$$n(PL) = n(50\mu\text{l IZSE}) * \frac{V_{IZSE}}{50\mu\text{l}} * \frac{V_{RS}}{3,75\text{ml}} * \frac{m(Lu_r + Lu_l)}{m(Lu_l)} \quad (\text{Formel 3})$$

Spezifische Aktivität im Lungen-PL:

$$A_{sp}^T = \frac{cpm(50\mu\text{l FE})}{n(50\mu\text{l FE}) * 0,4076} \quad (\text{Formel 4})$$

Spezifische Aktivität in der BAL:

$$A_{sp}^T = \frac{cpm(500\mu\text{l BALE})}{n(500\mu\text{l BALE}) * 0,4076} \quad (\text{Formel 5})$$

Spezifische Aktivität im IZS-PL:

$$A_{sp}^T = \frac{cpm(50\mu\text{l IZSE})}{n(50\mu\text{l IZSE}) * 0,4076} \quad (\text{Formel 6})$$

Absolutaktivität im PL:

$$A^T = A_{sp}^T * n(PL) \quad (\text{Formel 7})$$

Stoffmenge der einzelnen PC-Spezies in der Lunge:

$$n(m.Sp.) = \frac{F_{Peak}(m.Sp.) * n(i.Std, Pr \ddot{a}p.)}{F_{Peak}(i.Std)} * \frac{5000\mu\text{l}}{V(Pr \ddot{a}p.)} * \frac{m(Lu_r + Lu_l)}{m(Lu_r)} \quad (\text{Formel 8})$$

Stoffmenge der einzelnen PC-Spezies in der BAL:

$$n(m.Sp.) = \frac{F_{Peak}(m.Sp.) * n(i.Std, Pr \ddot{a}p.)}{F_{Peak}(i.Std)} * \frac{V(BAL)}{V(Pr \ddot{a}p.)} \quad (\text{Formel 9})$$

Stoffmenge der einzelnen PC-Spezies im IZS:

$$n(m.Sp.) = \frac{F_{Peak}(m.Sp.) * n(i.Std, IZS)}{F_{Peak}(i.Std)} * \frac{V(RS)}{3,75ml} * \frac{m(Lu_r + Lu_l)}{m(Lu_l)} \quad (\text{Formel 10})$$

Relativer Anteil der einzelnen PC-Spezies:

$$a_{rel} = \frac{F_{Peak}(m.Sp.) * 100}{F_{Peak}(\sum m.Sp.)} \quad (\text{Formel 11})$$

PC/PL-Verhältnis:

$$PC/PL = \frac{\sum n(m.Sp.)}{n(PL)} \quad (\text{Formel 12})$$

Konzentration der einzelnen PC-Spezies im Plasma:

$$c(m.Sp.) = \frac{F_{Peak}(m.Sp.) * n(i.Std, 500\mu l)}{F_{Peak}(i.Std)} * 2 \quad (\text{Formel 13})$$

Phosphatidylcholin/Sphingomyelin-Ratio:

$$L/S - Ratio = \frac{F_{Peak}(SPH)}{\sum F_{Peak}(m.Sp.)} \quad (\text{Formel 14})$$

Masse an Protein in der BALF:

$$m(Pr) = c_{BAL}(Pr) * V_{BAL} \quad (\text{Formel 15})$$

PL/Protein-Verhältnis:

$$PL/Protein - Verh\u00e4ltnis = \frac{n(PL)}{m(Pr)} \quad (\text{Formel 16})$$

Cholinaufnahme:

$$n(Lunge, 3h) = n(Perfusat, 0h) - n(Perfusat, 3h) \quad (\text{Formel 17})$$

Cholinkonzentration im Perfusat:

$$n_t(Perfusat) = \frac{cpm_t(200\mu l Perfusat) * 2,5\mu mol}{cpm_{t=0}^{th}(200\mu l Perfusat)} \quad (\text{Formel 18})$$

Spezifische Aktivität des Phosphocholins:

$$A_{sp}^T = \frac{cpm(10\mu Lsg.) * 2}{n(20\mu Lsg.)}$$

(Formel 19)

8.2. Symbole

A_{sp}^T	spezifische ^3H -Aktivität
Bq	Becquerel
Ci	Curie
g	Erdbeschleunigung
n	Stoffmenge
t	Zeit
$t_{rt, rel}$	relative Retentionszeit

8.3. Abkürzungen

^3H -Cholinchlorid	[<i>methyl</i> - ^3H]-Cholinchlorid
a	Anteil
BALE	Extrakt der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
bidest.	bidestilliert
BrdU	Brom-desoxy-uridin
BSA	bovines Serum-Albumin
c	Konzentration
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation(en)
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
dpm	decompositions per minute (Zerfälle pro Minute)
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-L-phosphatidylcholin
F	Fläche
FE	Flächeneinheiten
FE	Folchextrakt
G	Gewicht

HPLC	High pressure liquid chromatography (Hochdruckflüssigchromatographie)
I.E.	internationale Einheiten
i.Std	interner Standard
IZS	intrazellulärer Surfactant
IZSE	Extrakt des intrazellulären Surfactant
KG	Körpergewicht
l	links
Lsg.	Lösung
Lu	Lunge
m	Masse
m.Sp.	molekulare Spezies
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PEEP	positive end expiratory pressure (positiver endexpiratorischer Druck)
PIP	peak inspiratory pressure (inspiratorischer Spitzendruck)
PL	Phospholipid
POPC	Palmitoyloleoyl-L-phosphatidylcholin
Pr	Protein
PS	Phosphatidylserin
r	rechts
rel.	relativ
RP-HPLC	reversed phase HPLC (Umkehrphasen-HPLC)
RS	Rohsurfactant
s.o.	siehe oben
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Laurylsulfat)
SPF	spezifisch pathogenfrei
SPH	Sphingomyelin
T	Temperatur
TFE	Trifluorethanol

th	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volumen

9. PUBLIKATIONSLISTE

9.1. Vorveröffentlichungen der vorliegenden Arbeit

Dombrowsky H., Bernhard W., von der Hardt H. (1997): ISOLIERUNG VON SURFACTANT AUS LUNGENGeweBE DURCH NABR-DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION, *Pneumologie* 51, 153-254 (Sonderheft, Abstracts des 38. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 5.-8. März 1997)

Dombrowsky H., Bernhard W., von der Hardt H. (1998): SURFACTANTMETABOLISMUS NACH HYPEROXISCHEM LUNGENSCHADEN IM MODELL DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN RATTENLUNGE, *Monatsschr. Kinderheilkd.* 146, 271-301 (Abstracts der 20. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie, 2-4 April 1998)

Dombrowsky H., von der Hardt H., Bernhard W. (1998): DYSREGULATION OF SURFACTANT METABOLISM IN PERFUSED RAT LUNG AFTER IN VIVO HYPEROXIC LUNG INJURY, *Abstract book 5th Marburg Surfactant Syposium: Surfactant and Alveolar Biology*, September 14-16, 1998, p70

Dombrowsky, H. (1999): HYPEROXIE UND SURFACTANT, 2. Lübecker Internationales Surfactant Symposium: Surfactantbehandlung des RDS und ARDS, 07.05.1999, Veröffentlichung der Referate durch Boehringer Ingelheim Pharma KG in Vorbereitung

Bernhard, W., Tschernig, T., Dombrowsky, H., von der Hardt, H. (in Vorbereitung): ADAPTATIVER HYPEROXISCHER LUNGENSCHADEN BEI DER RATTE I: HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN, Präsentation auf der Jahrestagung 1999 der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie

Dombrowsky, H., Rau, G.A., von der Hardt, H. Bernhard, W. (in Vorbereitung): ADAPTATIVER HYPEROXISCHER LUNGENSCHADEN BEI DER RATTE II: SURFACTANTFUNKTION, POOLGRÖßENVERÄNDERUNGEN UND VERÄNDERTE LIPIDZUSAMMENSETZUNG, Präsentation auf der Jahrestagung 1999 der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie

Dombrowsky, H., von der Hardt, H. Bernhard, W. (in Vorbereitung): ADAPTATIVER HYPEROXISCHER LUNGENSCHADEN BEI DER RATTE III: SYNTHESE INDIVIDUELLER PHOSPHATIDYLCHOLINE UND VERMINDERTER EINBAU IN DEN SURFACTANT, Präsentation auf der Jahrestagung 1999 der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie

9.2. Sonstige Veröffentlichungen

Bernhard W., Dombrowsky H., Poets C.F.(1998): SURFACTANT IN BIRDS IS SIMILAR TO CONDUCTIVE AIRWAY SURFACTANT BUT NOT TO ALVEOLAR SURFACTANT FROM MAMMALS, Abstract book 5th Marburg Surfactant Symposium: Surfactant and Alveolar Biology, September 14-16, 1998, p19

10. LEBENS LAUF

Name: Heike Dombrowsky
Anschrift: Magdeburgstr. 17
38124 Braunschweig
Geburtsdatum: 10.12.1968
Geburtsort: Braunschweig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Rainer Wilfried Dombrowsky
Rose Barbara Dombrowsky, geb. Siekmann

Schul Ausbildung:

08/75-07/79 Grund- und Hauptschule Braunschweig-Waggum
08/79-07/81 Orientierungsstufe Braunschweig-Rühme
08/81-05/88 Lessinggymnasium Braunschweig-Wenden

Studium:

10/89-03/96 Chemiestudium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
03/92 Vordiplom
03/96 Diplom

Promotion:

06/96-10/99 Pädiatrische Pneumologie und Neonatologie, Zentrum Kinderheil-
kunde, Humangenetik und Dermatologie der Medizinischen Hoch-
schule Hannover
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
04/00 mündliche Prüfung
seit 03/00 Allergy and Inflammation Sciences, Child Health, Southampton
General Hospital, University of Southampton
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Braunschweig, im Januar 2000