

Friederike Freimuth
Dr. med.

Messung der Flüssigkeitsresorption an primären Alveolarepithelzellen der Ratte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie

Fach/Einrichtung: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. Heimo Mairbäurl

Durch ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Filtration und Resorption in den Alveolen der Lunge wird der alveoläre Flüssigkeitsfilm sehr genau reguliert. Dies ist die Voraussetzung für einen effektiven Gasaustausch. Verschiedene Ursachen können zu einer vermehrten Ansammlung von Flüssigkeit in den Alveolen führen. Unabhängig von der Ursache des alveolären Lungenödems ist eine eingeschränkte Resorption der Flüssigkeit über das Alveolarepithel mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert.

Die Resorption von Flüssigkeit am Alveolarepithel wird hauptsächlich durch den aktiven Transport von Natriumionen bestimmt. Chloridionen gewährleisten Elektroneutralität, Wasser folgt passiv dem entstehenden osmotischen Gradienten. Hypoxie hat einen hemmenden Einfluss auf die für diesen Ionen transport verantwortlichen, Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanäle. Durch Dexamethason lässt sich die Kanalaktivität stimulieren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, durch direkte Messung der Änderung der Dicke des Flüssigkeitsfilms im konfokalen Mikroskop die Rate zu bestimmen, mit der die Flüssigkeitsresorption stattfindet. Hierzu wurden primäre Alveolarepithelzellen der Ratte auf durchsichtigen Filtern kultiviert und wahlweise in Normoxie oder Hypoxie (24 Stunden, 1,5% Sauerstoff) inkubiert, sowie teilweise mit Dexamethason vorbehandelt. Eine zusätzliche Hemmung der Natriumkanäle wurde durch Zugabe von Amilorid unmittelbar vor der Messung erzielt.

Nach Entfernen des Kulturmediums wurden 20 µl Medium mit Fluoreszenz-markiertem Dextran auf die Filter aufgetragen und die Messung der Schichtdicke der fluoreszierenden Schicht auf den Zellen im Konfokalmikroskop schnellstmöglich gestartet.

Dann wurde zu acht Zeitpunkten zwischen 0 und 13 Minuten die Schichtdicke an fünf voreingestellten Positionen auf dem Filter durch x-z-Scans bestimmt.

Als Maß für die Rate der Resorption wurden die Schichtdicke zum erstmöglichen Messzeitpunkt sowie die Abnahme der Schichtdicke in den ersten 2 Minuten, berechnet mittels linearer Regression, herangezogen. Die Schichtdicke am erstmöglichen Messzeitpunkt und die Rate der Abnahme in normoxischen, mit Dexamethason behandelten Zellen sowie in hypoxischen Zellen mit und ohne Dexamethasonbehandlung unterschieden sich nicht von den Werten in normoxischen Kontrollzellen. Zugabe von Amilorid erhöhte die Schichtdicke am allerersten Messzeitpunkt in normoxischen, mit Dexamethason behandelten Zellen sowie in hypoxischen Zellen mit und ohne Dexamethasonbehandlung. Die letzten beiden Messzeitpunkte nach 10 und 13 Minuten wurden als Maß für die Schichtdicke im steady-state herangezogen. Hier konnten keine signifikanten Effekte der Behandlungen nachgewiesen werden.

Der komplexe Versuchsaufbau ermöglicht eine erste Messung der Schichtdicke frühestens nach ungefähr 40 Sekunden. Die Ergebnisse implizieren, dass dies möglicherweise schon zu spät ist, um die Effekte der verschiedenen Behandlungen auf die Resorption zu zeigen.

Lediglich zum erstmöglichen Messzeitpunkt, jedoch nicht zu späteren Zeitpunkten, ist ein Effekt der Hemmung der Resorption mit Amilorid erkennbar.

Ergänzende Messungen in der Ussing-Kammer zeigen, dass Amilorid und Hypoxie die Aktivität des Natriumtransports am Alveolarepithel hemmen und Dexamethason den Transport sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie stimuliert. Eine direkte Messung der

Resorptionsrate und der Auswirkung von Hypoxie hierauf ist mit der verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Methode jedoch nicht gelungen. Das bedeutet, dass entweder die Methode der Messung der Dicke des Flüssigkeitsfilms nicht ausreichend sensitiv ist, oder dass Flüssigkeitsverschiebungen stattfinden, deren Triebkräfte in der Ussing-Kammer nicht erkannt werden.