

Aus dem Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major  
contributor to cardiogenic lung edema

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Esther Andrea Solymosi

aus Starnberg

Datum der Promotion: 22.06.2014



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract .....	II
Eidesstattliche Versicherung .....	III
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	III
Auszug aus der Journal Summary List .....	V
Publikation „Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema” .....	1
Einleitung .....	1
Ergebnisse .....	2
Diskussion .....	5
Material und Methoden .....	8
Literaturverzeichnis .....	9
Zusätzliche Information .....	10
Lebenslauf .....	13
Publikationsliste .....	14
Danksagung .....	15



## Zusammenfassung

Bislang wurde das kardiale Lungenödem infolge eines akuten Linksherzversagens als Konsequenz einer erhöhten Flüssigkeitsfiltration einerseits und einer Hemmung der alveolären Flüssigkeitsresorption andererseits verstanden. Im Gegensatz zu diesem klassischen Modell konnte kürzlich in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die alveoläre Flüssigkeitsresorption, die auf einer  $\text{Na}^+$ -Resorption durch epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanäle (ENaC) im Alveolarepithel beruht, beim kardialen Lungenödem nicht nur vermindert ist. Vielmehr ändert sich der Flüssigkeitsstrom von einer Resorption zur Sekretion in den Alveolarraum. Daher könnte die transepitheliale Sekretion von Ionen und Flüssigkeit einen zusätzlichen, bisher unerforschten Mechanismus in der Pathophysiologie des kardialen Lungenödems darstellen.

Um alveoläre Flüssigkeitssekretion als bislang unbekannt, fundamentale Ursache des kardialen Lungenödems zu untersuchen und zugrundeliegende Mechanismen zu identifizieren, wurde mittels einer Doppelindikatorenmethode die alveoläre Flüssigkeitsresorption und -sekretion in isolierten und perfundierten Rattenlungen bestimmt. Die epitheliale  $\text{Cl}^-$ -Sekretion und der transepitheliale  $\text{Cl}^-$ -Flux wurden durch radioaktive Ionenmarkierung beziehungsweise durch quantitative  $\text{Cl}^-$ -Messung *in situ* mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. Eine Erhöhung des Druckes im linken Vorhof ( $P_{\text{LA}}$ ) führte zu einer erheblichen aktiven Flüssigkeitssekretion, während die passive Flüssigkeitsfiltration nur einen geringen Teil der gesamten Flüssigkeitsverschiebung ausmachte. Parallel zur Flüssigkeitssekretion wurde auch eine erhöhte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion in den Alveolarraum gemessen. Sowohl die Flüssigkeitssekretion als auch der  $\text{Cl}^-$ -Flux zeigten sich von der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, dem *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) und dem  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC) abhängig. Auch entwickelten CFTR defiziente (*cftr*<sup>-/-</sup>) Mäuse bei erhöhtem  $P_{\text{LA}}$  ein gegenüber Wildtyp-Mäusen deutlich geringeres Lungenödem. Zudem wurde gezeigt, dass wie bei erhöhtem  $P_{\text{LA}}$  auch eine Hemmung von ENaC bei physiologischem  $P_{\text{LA}}$  die alveoläre Flüssigkeitsresorption in eine Flüssigkeitssekretion umkehren und einen  $\text{Cl}^-$ -Flux in den Alveolarraum hervorrufen kann. Da diese ebenfalls von der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, NKCC und CFTR abhängig waren, ist anzunehmen, dass die Hemmung von ENaC den Mechanismus der alveolären Flüssigkeitssekretion beim kardialen Lungenödem repliziert.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass sich bei erhöhtem  $P_{\text{LA}}$  der transepitheliale  $\text{Cl}^-$ -Transport umkehrt und es somit bei kardialem Lungenödem zu einer aktiven Flüssigkeitssekretion in den Alveolarraum kommt. Diese wird durch eine Hemmung der apikalen  $\text{Na}^+$ -Absorption ausgelöst, indem die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase jetzt einen basolateralen  $\text{Na}^+$  Gradienten aufbauen kann, der eine  $\text{Cl}^-$ -Aufnahme über den sekundär aktiven, basolateralen NKCC und letztlich die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion über den apikalen CFTR bewirkt.

In der vorliegenden Arbeit wird die alveolare Flüssigkeitssekretion als neuer Schlüsselfaktor der Pathogenese des kardialen Lungenödems identifiziert und die zugrunde liegenden Mechanismen werden analysiert. Diese Erkenntnisse bieten eine neue Erklärung für die extrarenale Wirkung von Schleifendiuretika, indem sie pulmonale NKCC1 als neue therapeutische Zielstruktur identifizieren.

## Abstract

Cardiogenic pulmonary edema as a consequence of acute left heart failure has so far been attributed to increased fluid filtration and inhibition of alveolar fluid clearance. In contrast to this classical model, experiments from our group recently showed that alveolar fluid clearance, driven by  $\text{Na}^+$  absorption through epithelial  $\text{Na}^+$  channels (ENaC), is not only diminished. In fact, fluid transport reverses from absorption to secretion into the alveolar space. Hence, transepithelial ion and fluid secretion might constitute a so far unrecognized mechanism in the pathophysiology of cardiogenic pulmonary edema.

To investigate alveolar fluid secretion as a so far unknown fundamental cause of cardiogenic edema and identify underlying mechanisms, we determined alveolar fluid clearance and secretion by double indicator dilution technique in isolated-perfused rat lungs.  $\text{Cl}^-$  secretion and transepithelial  $\text{Cl}^-$  flux were measured by radionuclide tracing and  $\text{Cl}^-$  sensitive *in-situ*-microscopy. At elevated left atrial pressure ( $P_{\text{LA}}$ ) alveolar fluid secretion increased markedly, whereas fluid filtration accounted only for a minor portion of the total fluid flux. Parallel to alveolar fluid secretion an augmented  $\text{Cl}^-$  secretion occurred. Both alveolar fluid secretion and  $\text{Cl}^-$  flux were attenuated by inhibitors of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC). Additionally, *Cftr*<sup>-/-</sup> mice developed significantly less pulmonary edema at elevated  $P_{\text{LA}}$  as compared to wild type littermates. Importantly, in the same way as elevated  $P_{\text{LA}}$ , inhibition of ENaC at physiologic  $P_{\text{LA}}$  reversed alveolar fluid clearance to fluid secretion and induced a  $\text{Cl}^-$  flux into the alveolar space. As these were again dependent on  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, NKCC and CFTR, we hypothesize that ENaC inhibition replicates the mechanism of alveolar fluid secretion in cardiogenic pulmonary edema.

These results confirm for the first time that transepithelial  $\text{Cl}^-$  transport reverses at elevated  $P_{\text{LA}}$  and thus leads to active fluid secretion in cardiogenic lung edema. This is triggered by inhibition of apical  $\text{Na}^+$  absorption as  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase now creates a basolateral  $\text{Na}^+$  gradient which leads to  $\text{Cl}^-$  absorption via the secondary active, basolateral NKCC and finally promotes  $\text{Cl}^-$  secretion via apical CFTR.

This study identifies alveolar fluid secretion as new key factor in the pathogenesis of cardiogenic lung edema and analyses underlying mechanisms. These insights offer a new explanation for the extra-renal effect of loop diuretics as they identify pulmonary NKCC1 as a new therapeutic target.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Esther Solymosi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation: **Solymosi EA**, Kaestle-Gembardt SM, Vadász I, Wang L, Neye N, Chupin CJ, Rozowsky S, Ruehl R, Tabuchi A, Schulz H, Kapus A, Morty RE, Kuebler WM. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013

Esther A. Solymosi hat folgenden Anteil an der vorgelegten Publikation:

- Entwurf, Vorbereitung und Durchführung der Versuche zur quantitativen Bestimmung des alveolären Flüssigkeitstransportes mittels einer Doppelindikatoren-Verdünnungsmethode in isolierten und perfundierten Rattenlungen
  - Unter Kontrollbedingungen bei einem  $P_{LA}$  von  $5\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Cl}^-$  freiem alveolärem Instillat bei einem  $P_{LA}$  von  $5\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Cl}^-$  freiem alveolärem Instillat bei einem  $P_{LA}$  von  $15\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Cl}^-$  freiem Perfusat bei einem  $P_{LA}$  von  $5\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Cl}^-$  freiem Perfusat bei einem  $P_{LA}$  von  $15\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Na}^+$  freiem alveolärem Instillat bei einem  $P_{LA}$  von  $5\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Na}^+$  freiem alveolärem Instillat bei einem  $P_{LA}$  von  $15\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Na}^+$  freiem Perfusat bei einem  $P_{LA}$  von  $5\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Na}^+$  freiem Perfusat bei einem  $P_{LA}$  von  $15\text{cmH}_2\text{O}$
  - Mit  $\text{Na}^+$  freiem alveolärem Instillat unter Zugabe von  $\text{CFTR}_{\text{inh}}-172$  bei einem  $P_{LA}$  von  $5\text{cmH}_2\text{O}$
  - Unter Zugabe von Amilorid und Furosemid bei einem  $P_{LA}$  von  $5\text{cmH}_2\text{O}$

- Etablierung und Adaptation der intraalveolären  $\text{Cl}^-$  Bestimmung durch *in situ* Mikroskopie
- Entwurf, Vorbereitung und Durchführung der Versuche zur intraalveolären  $\text{Cl}^-$  Bestimmung durch *in situ* Mikroskopie
  - Unter Kontrollbedingungen
  - Mit  $\text{Cl}^-$  freiem Perfusat
  - Unter Zugabe von Amilorid
  - Unter Zugabe von Amilorid und Furosemid
  - Unter Zugabe von Amilorid und Glibenclamid
  - Unter Zugabe von Amilorid und  $\text{CFTR}_{\text{inh}}-172$
- Statistische Auswertung aller oben genannten Versuchsgruppen
- Theoretische Berechnung des elektrochemischen Potentials des  $\text{Cl}^-$  Flusses
- Verfassen des Artikels gemeinsam mit dem Betreuer



Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories MULTIDISCIPLINARY SCIENCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 56)



Page 1 of 3

*Ranking is based on your journal and sort selections.*

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data						Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">NATURE</a>	0028-0836	526505	36.280	36.235	9.690	841	9.4	1.65524	20.373
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">SCIENCE</a>	0036-8075	480836	31.201	32.452	6.075	871	9.4	1.41162	17.525
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">P NATL ACAD SCI USA</a>	0027-8424	504243	9.681	10.472	1.874	3614	7.8	1.60168	4.896
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">NAT COMMUN</a>	2041-1723	1859	7.396	7.396	1.659	451	1.2	0.01222	4.473
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">J R SOC INTERFACE</a>	1742-5689	3725	4.402	4.591	1.000	160	3.1	0.02298	1.785
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">ANN NY ACAD SCI</a>	0077-8923	43725	3.155	2.997	0.810	447	8.1	0.10127	1.044
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">PHILOS T R SOC A</a>	1364-503X	10139	2.773	3.024	1.351	322	7.8	0.03233	1.422
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">P JPN ACAD B-PHYS</a>	0386-2208	688	2.770	1.934	0.279	43	3.9	0.00298	0.821
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">SCI AM</a>	0036-8733	4878	2.369	2.111	0.459	98	>10.0	0.00736	0.944
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">HFSP J</a>	1955-2068	363	2.317	2.689		0	3.3	0.00391	1.578
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">NATURWISSENSCHAFTEN</a>	0028-1042	5836	2.278	2.427	0.250	120	>10.0	0.01081	0.890
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">P ROY SOC A-MATH PHY</a>	1364-5021	13101	1.971	1.987	0.547	190	>10.0	0.01972	1.138
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">J ROY SOC NEW ZEAL</a>	0303-6758	482	1.933	1.509	0.125	8	>10.0	0.00058	0.571
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">CHINESE SCI BULL</a>	1001-6538	7080	1.321	1.243	0.292	569	5.7	0.01617	0.309
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">AN ACAD BRAS CIENC</a>	0001-3765	1337	1.094	1.208	0.304	112	8.8	0.00223	0.342
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">COMPLEXITY</a>	1076-2787	442	1.020	1.051	0.172	29	8.3	0.00102	0.407
<input type="checkbox"/>	17	<a href="#">AM SCI</a>	0003-0996	1729	0.938	0.923	0.317	41	>10.0	0.00174	0.432
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">CURR SCI INDIA</a>	0011-3891	7586	0.935	1.110	0.295	373	8.0	0.01223	0.323
<input type="checkbox"/>	19	<a href="#">TECHNOL REV</a>	1099-274X	278	0.780	0.429	0.162	37	9.9	0.00097	0.266
<input type="checkbox"/>	20	<a href="#">S AFR J SCI</a>	0038-2353	1724	0.779	0.822	0.271	59	>10.0	0.00214	0.284

## Publikation

Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema.

Solymosi EA, Kaestle-Gembardt SM, Vadász I, Wang L, Neye N, Chupin CJ, Rozowsky S, Ruehl R, Tabuchi A, Schulz H, Kapus A, Morty RE, Kuebler WM.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jun 18;110(25):E2308-16.  
doi:10.1073/pnas.1216382110. Epub 2013 May 3. PubMed PMID: 23645634;  
PubMed Central PMCID: PMC3690871.

<http://www.pnas.org/content/110/25/E2308>

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation durchgeführt und fertiggestellt werden konnte. Insbesondere möchte ich danken:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler für das Überlassen des Themas, für seine konstante Ansprechbarkeit und Unterstützung bei kleinen Problemen und großen Fragen bezüglich der Planung, Realisierung und Auswertung der Versuche sowie die vielen Stunden gemeinsamen Schreibens und Überarbeitens. Darüber hinaus danke ich ihm für sein freundliches Engagement und die vielfältigen Gelegenheiten, in denen ich Einblicke in die deutsche und nordamerikanische Forschungslandschaft gewinnen konnte, insbesondere die Möglichkeit meine Arbeit auf einem Kongress zu präsentieren und dort den wissenschaftlichen Austausch zu suchen.

Frau Dr. Stephanie Gemhardt für die geduldige Einarbeitung und unmittelbare Hilfe darüber hinaus

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kübler für die freundschaftliche und vertrauensvolle Arbeitsatmosphäre auch über die Zusammenarbeit hinaus, insbesondere Ursel Hilse, Arata Tabuchi, Jun Yin, Liming Wang, Caroline Valois, Hannah Nickles, Julia Hoffmann, Björn Hoffmann, Nils Neye, Nadine Klein, Michael Mertens und Ning Yin

Andras Kapus und Katalin Szaszi für den inspirierenden Austausch

Rory Morty, István Vadász und Ramona Ruehl für die erfolgreiche Kooperation

den Böhringer Ingelheim Fonds sowie der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Unterstützung

meinen Eltern, Geschwistern und Freunden für ihre Motivation, ihren Rat und ihren Beistand auch in schwierigen Phasen

und Gott.