Inflammatorisches Verhalten von Typ-II Zellen unter mechanischer Belastung (Zell Stretch *in vitro*)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sevil Aslan-Akineden
aus Cemisgezek/TR

Gießen 2006

Inflammatorisches Verhalten von Typ-II Zellen unter mechanischer Belastung (Zell Stretch *in vitro*)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sevil Aslan-Akineden
aus Cemisgezek/TR

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger
des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter : Prof. Dr. Dr. Grimminger

Gutachter: PD Dr. Noll

Tag der Disputation: 23.03.2006

Für meine Söhne Biyan und Miran,

meinem Ehemann und

meine Eltern Pakize und Hidir Aslan

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schifften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis „ niedergelegt, eingehalten.

Wetzlar, den 08.09.2005

Sevil Aslan-Akineden

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 Vorwort 1

2 Einleitung 2

2.1 Die Morphologie und Architektur der Alveole 2

2.1.1 Die Beschreibung des Alveolarsystems der Lunge 2

2.1.2 Alveolarephithelzellen Typ-I 4

2.1.3 Alveolarephithelzellen Typ-II 4

2.2 Bedeutung und Funktionen der Typ-II Zellen im Alveolarephitel 6

2.3 Darstellung verschiedener experimenteller Dehnungsmechanismen 9

2.4 Mechanische Dehnung des Alveolarephithels
Physiologische und pathophysiologische Mechanismen 12

2.5 Effekte von mechanischen Belastungen
auf die Alveolarepithelzellen 13

2.5.1 Mechanische Dehnungen von Zellen führen zu einer erhöhten
Cytokinfreisetzung 13

2.5.2 Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme des Ca^{2+} 15

2.5.3 Mechanische Dehnung führt zur Zellproliferation 16

2.5.4 Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme der mRNA-
Konzentrationen von SP-C 16

2.5.5 Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme der mRNA Levels von Typ IV Collagen, Tropoplastin und Fibronectin 17

2.6 Mechanische Beatmung am Beispiel des ARDS 18

2.7 Die Rolle des Bakteriellen Endotoxins LPS bei inflammatorischen Prozessen der Lunge 21

2.8 Charakterisierung und Funktionen der Chemokine MCP-1 und MIP-2 25

2.8.1 Physiologische Funktionen des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) im Alveolarephithelzellverband 25

2.8.2 Einfluss des Makrophagen-inflammatorischen Proteins-2 (Mip-2) auf Alveolarepithelzellen 28

3 Fragestellung 29

4 Material und Methoden 31

4.1 Isolierung von Typ-II Zellen aus Rattenlungen 31

4.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung 31

4.1.2 Inkubationsmedien, Zellkulturmaterial und Agenzien 31

4.1.3 Pharmaka und Substanzen zur Isolierung alveolärer Typ-II Zellen 33

4.1.4 Instrumente und Geräte zur Isolierung alveolärer Typ-II Zellen 34

4.1.5 Isolierung von Typ-II Zellen modifiziert nach Dobbs 35

4.2 Identifizierung und Charakterisierung isolierter Typ-II Zellen.....38
4.2.1 Durchführung der Identifizierung/Charakterisierung.....38
4.2.2 Vitalitätstests.....40
4.2.3 Kultur der Alveolaren Epithelzellen.....40
4.2.4 Lactatdehydrogenase (LDH)- Messung.....41

4.3 L2-Zellen.....42
4.3.1 Herstellen von Kulturmedien.....42
4.3.2 Auftauen von L2-Zellen.....42
4.3.3 Splitten von L2-Zellen.....43
4.3.4 Einfrieren von L2-Zellen.....43

4.4 Die Bestimmung von MCP-1 aus Zellüberständen.....44
4.4.1 Lösungen, Antikörper und Materialien für das MCP-1 ELISA.....44
4.4.2 Durchführung der Messung.....45

4.5 Messung von MIP-2 aus Zellüberständen.....47
4.5.1 Lösungen, Antikörper und Materialien für das MIP-2 ELISA.....47
4.5.2 Durchführung der Messung.....48

4.6 Das Stretchgerät.....49
4.6.1 Beschreibung des Stretchgerätes.....49
4.6.2 FX-3000^{TM} Flexercell® Strain Bestandteile.....49

4.7 Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse.....53

5 Ergebnisse 54

5.1 Stretchversuche führen nicht zu einer erhöhten Zellschädigung bei L2-Zellen 55

5.2 Stretchversuche führen nicht zu einer erhöhten Zellschädigung bei Typ-II Zellen. 57

5.3 LPS abhängige Freisetzung von MCP-1 bei L2-Zellen 59

5.4 Stretch führt zu einer Erhöhung der MCP-1 Freisetzung bei L2-Zellen 61

5.5 Stretch führt zu einer Erhöhung der MCP-1 Freisetzung bei Typ-II-Zellen 63

5.6 Stretch mit LPS führt zu einer höheren Freisetzung von MCP-1 bei L2-Zellen 65

5.7 Stretch mit LPS führt zu einer höheren Freisetzung von MCP-1 bei Typ-II Zellen 67

5.8 Anti CD-14-Ak führt nicht zu einem vollständigen Rückgang der Cytokinfreisetzung bei L2-Zellen 69

5.9 Anti CD-14-Ak führt nicht zu einem vollständigen Rückgang der Cytokinfreisetzung bei Typ-II Zellen 72

5.10 TNF-Ak führt nicht zu einem vollständigen Rückgang der Cytokinfreisetzung bei L2-Zellen 73

5.11 Stretch führt bei L2-Zellen zu einer Erhöhung der MIP-2 Freisetzung 75

5.12 Stretch führt bei Typ-II Zellen zu einer Erhöhung der MIP-2 Freisetzung 76

6 Diskussion 77

6.1 Inflammatorische Cytokin Produktion der Typ-II Zellen bei mechanischer Belastung 77

6.2 Effekte von physikalischem Stress in Lungen Zellen 78

? Zytokinfreisetzungen bei mechanischer Dehnung 79
? Einfluss der mechanischen Dehnung auf den Ca^{2+} Influx und Efflux in Zellen 81
? Zellproliferationen unter mechanischer Dehnung 82
? Die mRNA Konzentrationen von SP-C unter der Dehnung 82
? Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme der mRNA Levels von Typ IV Collagen, Tropoplastin und Fibronectin 83

6.3 Vorgeschlagene Mechanismen für Mechanorezeptoren 83

? *Stretch aktivierte Ionenkanäle* 83
? *ECM-Integrin Cytoskelett Pathway* 84

6.4 Zukünftige Studien 85

7 Literaturverzeichnis 86

8 Anhang 101

8.1 Abkürzungsverzeichnis 101

8.2 Danksagung 102

8.3 Lebenslauf 103

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der Alveolarwand (Surfactantsystem der Lunge, Morgenroth, de Gruyter Verlag) 3

Abb. 2: Schematische Beschreibungen der Geräte, die gebraucht werden, um Zellen *in vitro* mechanisch zu stimulieren 9

Abb. 3: Struktur des Lipopolysaccharids, LPS. (Charles A. Janeway, Immunologie 5. Auflage, Akademischer Verlag Spektrum, Gustav Fischer) 23

Abb. 4: Die Darstellung des Stretchgerätes (Flexercell International Corporation, FX- 3000™, Flexercell® Strain Unit v.3.2. Users Manual, S 22) Basisplatte mit den 4 speziellen 6-er Well Kultur Platten, Vakuum Pumpe, Monitor, Tastatur, Maus, Rechner 50

Abb. 5: Schematische Darstellung der Bestandteile des Stretchgerätes (Flexercell International Corporation, FX- 3000™, Flexercell® Strain Unit v.3.2. Users Manual, S 22) 51

Abb. 6: Darstellung der Basisplatte mit den Speziellen 6-er Well Platten (Flexercell International Corporation, FX- 3000™, Flexercell® Strain Unit v.3.2. Users Manual, S 22). Der elastische Plattenboden wird mit Vakuum oder Druckluft bewegt. Auf diese Weise werden Zellen während des Wachstums unter lebenserwandten Stress ausgesetzt 52

Abb. 7: L2-Zellen, Zytotoxische Wirkung in Abhängigkeit von Stretch (n=10) . 56

Abb. 8: Typ-II Zellen, LDH-Werte bei verschiedenen Zellbehandlungen (n= 4) 58

Abb. 9: Zeit-Dosis-Kurve der LPS-abhängigen Freisetzung von MCP-1 bei L2-Zellen (n = 4) 60

Abb. 10: L2-Zellen, MCP-1 Freisetzung bei Stretch (n = 4) 62

Abb. 11: MCP-1 Freisetzung mit Stretch sowie ohne Stretch bei Typ-II Zellen (n = 4) 64

Abb. 12: L2-Zellen, Freisetzung von MCP-1 in Anwesenheit von LPS sowie mit und ohne Stretch (n = 3) 66

Abb. 13: Typ-II Zellen, Freisetzung von MCP-1 in Anwesenheit von LPS sowie mit und ohne Stretch (n = 4) 68

Abb. 14: L2-Zellen, MCP-1 Freisetzung bei Stretch, sowie mit LPS und CD-14-AK (n = 3) 71

Abb. 15: Typ-II Zellen, MCP-1 Freisetzung in Anwesenheit von LPS und CD 14-Ak sowie mit und ohne Stretch (n = 4) 72

Abb. 16: L2-Zellen, MCP-1 Freisetzung bei Stretch, sowie mit LPS und TNF-Ak (n = 3) 74

Abb. 17: L2-Zellen, MIP-2 Freisetzung mit sowie ohne Stretch (n = 8)..... 75

Abb. 18: Typ-II Zellen, MIP-2 Freisetzung mit und ohne Stretch (n = 5) 76

1. Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde in der Zeit von Mai 1999 bis Mai 2000 in dem Laborbereich der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ unter der Betreuung von Herrn Dr. med. Frank Rose mit dem Thema: „Inflammatorisches Verhalten von Typ-II Zellen unter mechanischer Belastung (Zell Stretch in vitro)“ in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin durchgeführt.

Hintergrund dieser Arbeit ist die Frage, ob alveoläre Typ-II Zellen unter mechanischem Stress (z.B. unter künstlicher Beatmung) in der Intensivmedizin auf bakterielle Stimulantien (z.B. LPS) sensibler reagieren und damit vermehrt inflammatorische Cytokine freisetzen, die wiederum das Auftreten von ARDS und MSOF (Multiple System Organ Failure) begünstigen.

Zu diesem Zweck wurden Typ-II Zellen aus Rattenlungen isoliert und systematisch der Einfluss mechanischer Dehnung untersucht.

Um die Zellen mechanisch zu dehnen wurde das Zell-Stretch Gerät „FX-3000 Flexercell Strain Unit“ in das Labor eingeführt. Dieses Gerät ist in der Lage, Zellen computergesteuert unter mechanischen Stress zu setzen, indem es die Zellen equibiaxial dehnt. Damit konnte man die künstliche Beatmung in der Intensivmedizin nachahmen.

2. Einleitung

2.1 Morphologie und Architektur der Alveole

2.1.1 Die Beschreibung des Alveolarsystems der Lunge

Der Aufbau der Lunge ist unterteilt in das luftleitende System und das Alveolarsystem. Die Alveolen werden gleichmäßig von Epithelzellen ausgekleidet. Zwei Epithelzelltypen lassen sich nach der äußeren Form der zytoplasmatischen Differenzierung unterscheiden: Typ-I Zellen und Typ-II Zellen (88). Die Lunge des Menschen dient dem Gasaustausch, d.h. der Aufnahme von Sauerstoff und der Abgabe von Kohlendioxid. Morphologisches Korrelat ist die alveolo-kapilläre Membran, welche eine große Gasaustauschfläche bei äußerst geringer Diffusionsbarriere bietet. Die Stärke der alveolo-kapillären Membran wird mit ca. 0,3 µm beschrieben (89, 90). Das Alveolarepithel der Lunge hat eine Gesamtfläche von ca. 80 m^2 in der Expiration und 120 m^2 in der Inspiration. Es bildet damit die größte Fläche des Organismus, die mit der Außenwelt direkt in Kontakt steht. Die große Oberfläche wird gasseitig erzielt durch eine Aufzweigung der Luftwege, ausgehend von der Trachea über Bronchien, Bronchiolen und terminale Bronchiolen (diese dienen dem Gastransport), bevor über diese Strukturen die Gasaustauscheinheiten der Lunge, die Acini erreicht werden (90). Die Acini bestehen aus den respiratorischen Bronchiolen mit den sich anschließenden Alveolargängen, Alveolarsäcken und traubenförmig angeordneten Alveolen. Ausgekleidet ist der alveolare Raum von einem dünnen vom Alveolarepithel synthetisierten Surfactantfilm, der für den physiologischen Ablauf des Respirationszyklus von entscheidender Bedeutung ist. Als Grenzflächenstruktur muss das Alveolarepithel des Gesamtorganismus vor inhalierten Umweltnoxen schützen und gleichzeitig einen suffizienten Gasaustausch gewährleisten. Die alveolaren Epithelzellen dienen hierbei nicht nur als passive Barriere, sondern gewährleisten durch verschiedene Mechanismen die Homöostase der Alveole. So sind sie mit Ionenkanälen bzw. -pumpen ausgestattet. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit, immunmodulatorische Mediatoren und Matrixkomponenten zu sezernieren sowie aktiv alveolären Surfactant zu synthetisieren.

Abb. 1: Aufbau der Alveolarwand (Surfactantsystem der Lunge, Morgenroth, de Gruyter Verlag)

1. Zellkern, 2. Golgifeld, 3. Mitochondrien, 4. Endoplasmatische Reticulum 5. Osmiophile Lamellenkörper, 6. Ausscheidungsvorgang des Surfactantmaterials, 7. Pneumozyten Typ-I Zellen des Alveolarepithels, 8. Kapillarendothel.

2.1.2 Alveolarepithelzellen Typ-I

Pneumozyten Typ-I bedecken ca. 90 % der Alveolaroberfläche. Sie sind sehr großflächige flache Zellen mit wenig Zytoplasma und machen etwa 8 % der Lungenparenchymzellen aus. Das 0,1-0,2 µm breite, flache Zytoplasma enthält wenig Endoplasmatisches Reticulum, vereinzelt Lyosomen, einzelne Mitochondrien und ein Golgifeld. Der ovale Kern ist in der Regel im Zentrum der Zellen angeordnet. In den langen, flachen Zytoplasma-Ausläufern der Zellen liegen eine große Anzahl Pinozytosebläschen. Diese flachen Zytoplasma-Ausläufer überlappen sich über unterschiedlich breite Strecken und können sich in der Expirations- und Inspirationsphase gegeneinander verschieben (1). Diese flachen Zellen sind weit auseinander gezogen und liegen einer kontinuierlich ausgebildeten Basallamelle an, die über weite Strecken mit der Basallamelle der Endothelzelle der Alveolarkapillaren verschmilzt. Die Epithelzellen bilden damit zusammen mit der Basallamelle und dem Kapillarendothel die Barriere für den Gasaustausch an der Alveolarwand (1). Das dünne und attenuierte Zytoplasma der Typ-I Zelle erleichtert den Gasaustausch der Lunge durch die Minimierung der Diffusionsstrecke vom alveolaren Gas zum kapillären Blut.

2.1.3 Alveolarepithelzellen Typ-II

Pneumozyten Typ-II Zellen haben einen Durchmesser von ca. 9 µm. Sie liegen in der Regel einzeln und kommen nur gelegentlich in kleinen Gruppen aus zwei oder drei Zellen im Alveolarepithel vor. Sie sind auf der Oberfläche durch einen Besatz aus 0,1 µm breiten Mikrovilli charakterisiert. Das Zytoplasma der Zellen ist reicher an Organellen als das der Pneumozyten Typ-I. Es beinhaltet raues endoplasmatisches Reticulum, freie Ribosome, Mitochondrien, Lyosomen, Multivesikularkörper und ein ausgeprägtes Golgifeld. Der zentral angeordnete Zellkern besitzt einen deutlich ausgeprägten Nukleolus.

Lamellenkörper sind ein besonders morphologisches Kennzeichen der Typ-II Zellen, sie machen mit 0,2-2 µm Durchmesser etwa 18-24 % des Zytoplasmas

aus. Die Lamellarkörper sind als Substrat der Syntheseleistung dieser Zellen aufzufassen. Hier liegt der Ursprung der intrazytoplasmatisch gebildeten, oberflächenaktiven Substanzen, dem Surfactant. Der Surfactant ist chemisch keine reine Substanz, sondern eine Mischung (Emulsion) aus Phospholipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Der Lipidanteil beträgt etwa 90 %. Die Proteine machen etwa 10 % der Gesamtmenge aus (1).

Typ-II Zellen liegen mit einer breiten Basis auf einer Basallamele auf. Die Zellen werden seitlich von Ausläufern der Pneumozyten Typ-I kragenförmig überlappt, so dass sie das Niveau der Ephitheloberfläche nur wenig überragen (1).

Das alveolare Epithel weist eine Polarität zwischen apikaler und basolateraler Seite auf, was sowohl für die Zellstruktur wie z.B. den apikal gelegenen Mikrovilli, den Enzymbesatz, wie die apikal gelegene Katalase (35) als auch für Ionenkanäle nachweisbar ist. So sind der Na^+/H^+ Antiporter (37) und die Na^+/K^+ ATPase nur auf der basolateralen Seite des alveolaren Epithels vorhanden, während Natrium- und Chloridkanäle nur auf der apikal gelegenen Zellmembran identifiziert werden konnten.

Typ-I Zellen und benachbarte Typ-II Zellen stehen durch „tight-junctions“ in Verbindung, wodurch die eigentliche epitheliale Barrierefunktion gegeben ist. Diese Verbindung besteht aus drei bis sechs sequenziellen Membranfusionen, durch die ein transepithelialer Durchtritt von Molekülen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 kDa verhindert wird. “Gap-junctions“, die auf den intra- und interzellulären Transport von Ionen und Kleinmolekülen spezialisiert sind, existieren mit großer Wahrscheinlichkeit auch zwischen Typ-I und Typ-II Zellen, sind aber nicht in hoher Ausprägung nachweisbar (38). Diese Zell-Zell-Verbindungen regulieren im Allgemeinen die Permeabilität des alveolaren Epithels, sind aber mechanischen Beanspruchungen gegenüber nur in geringem Maße belastbar (39).

2.2 Bedeutung und Funktionen der Typ-II Zellen im Alveolarepithel

1. Synthese und Sekretion des Surfactants

Ergebnisse aus autoradiographischen Untersuchungen führten zur der Erkenntnis, dass die Bausteine für das Surfactant den Typ-II Zellen wahrscheinlich über das Blut zugeführt werden. Nach intravenöser Applikation von markiertem Palmitat und Cholin erscheinen diese Substanzen innerhalb weniger Minuten im endoplasmatischen Retikulum und im Golgifeld der Typ-II Zellen (91, 92). Neben der Speicherung findet möglicherweise auch eine fortgesetzte Synthese in den appositionell an Größe zunehmenden Lamelarkörpern statt. Die Biosynthese der oberflächenaktiven Substanzen konnte nach Lavagierung aus der Lunge verfolgt werden. Außerdem ist es möglich, die Typ-II Zellen aus den Lungen von Versuchstieren zu isolieren und den Ablauf der Biosynthese systemisch *in vitro* zu beobachten (93-95).

2. Rekonstruktion und Reparatur des Alveolarepithels, durch ihre Fähigkeit zur Proliferation und Transdifferenzierung zu Typ-I Zellen

Typ-II Zellen gelten als potente Zellen, die in der Lage sind, zu proliferieren und sich zu Typ-I Zellen zu differenzieren (96). Die Typ-I Zellen hingegen stellen das Endstadium der Differenzierung dar. Den Vorgang der Differenzierung von einer hoch differenzierten Zelle, wie der Typ-II Zelle, zu einer weniger differenzierten Zelle bezeichnet man als Transdifferenzierung (97). Der Vorgang der Transdifferenzierung stellt einen wichtigen physiologischen Prozess dar, der es den Typ-II Zellen ermöglicht, im Falle einer Schädigung des Alveolarephithels, dieses durch reperative und proliferative Prozesse zu ersetzen (96). Bei Primärkulturen von Typ-II Zellen, die *in vitro* kultiviert werden, kann man nach einer gewissen Zeit eine Transdifferenzierung beobachten. Die Zellen zeigen nach dieser Transdifferenzierung einen Verlust von Typ-II zellspezifischen

Charakteristika (z.B. Verlust der kuboidalen Zellform und der Lamellarkörper) (98). Diese Beobachtungen bestätigen den Vorgang der Transdifferenzierung von Typ-II Zellen auch in vitro, die in diesem Zusammenhang auch als Dedifferenzierung bezeichnet werden kann.

3. Transepithelialer Natrium-Transport von der apikalen zur basolateralen Seite zur Reduktion der alveolaren Flüssigkeitsmenge

Eine wichtige Aufgabe der Alveolarepithelzellen besteht darin, überschüssige Flüssigkeit aus den Alveolen zu transportieren und so den Gasaustausch zu gewährleisten (99). Es handelt sich um komplexe Mechanismen, die für die Einhaltung des Gleichgewichts zwischen alveolar-interstitieller und der intravasalen Flüssigkeit verantwortlich sind. Dabei finden sich neben passiven Transportmechanismen auch Mechanismen des aktiven Transportes (100). Die Na^+/K^+-ATPase liegt von basolateral den Alveolarepithelzellen an (101). Apikal weisen die Zellen einen Amilorid-sensitiven Na^+-Kanal auf (102). Die Na^+/K^+-ATPase spielt eine zentrale Rolle beim vektoriellen Transport von Na^+-Ionen. Sie hält einen transzellulären elektrischen Gradienten aufrecht, der durch den gegenseitigen Transport von Na^+-Ionen und K^+-Ionen entsteht (103). Dieser aktive Transport kommt durch die Hydrolyse von ATP zustande. Die Na^+/K^+-ATPase ist ein heterodimeres Protein, welches aus zwei Untereinheiten, der α- und der β-Untereinheiten, besteht. Die ATP Bindungsstelle befindet sich an der katalytischen α-Untereinheit (104). Es sind drei Isoformen dieser α-Untereinheit bekannt: α_1, α_2 und α_3. Jede Isoform zeigt eine differierende Na^+-Affinität und eine ungleiche Organverteilung. Ebenso existieren drei Isoformen der β-Untereinheit, von der man annimmt, sie sei für die Membranintegration der a-Untereinheit verantwortlich (105). Bei den Typ-II Zellen der Lunge findet sich hauptsächlich die α_1- sowie die $ß_1$-Isoform. Demgegenüber ist die α_2-Isoform bei den Typ-I Zellen zu finden. Die übrigen Isoformen (α_3, β_2, β_3) sind in der Lunge nicht vertreten (106).

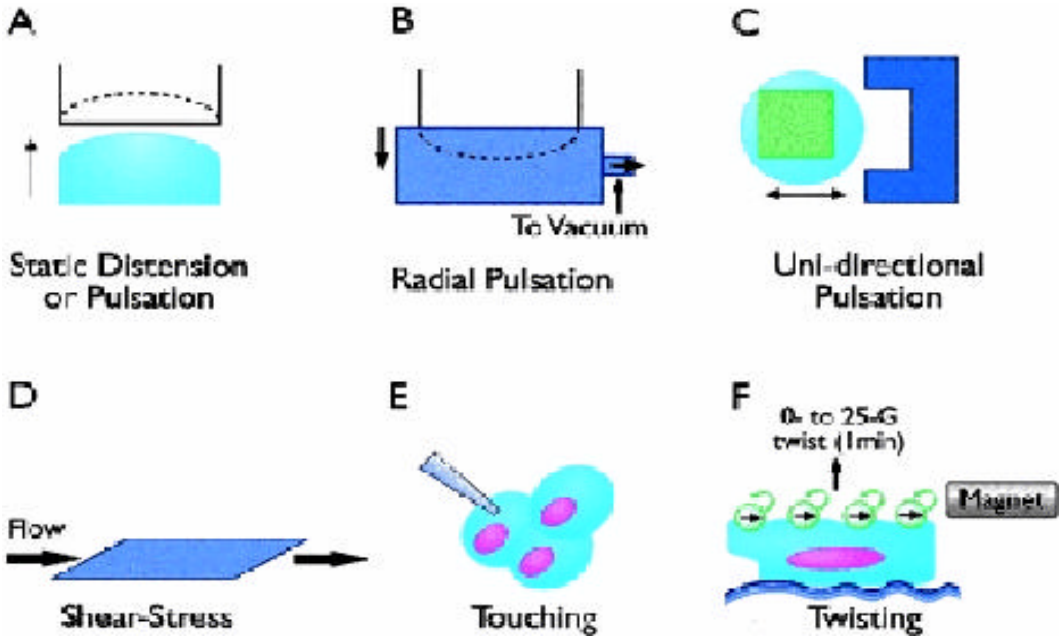
4. Abwehrfunktion durch Freisetzung von Cytokinen und Koordinationsfunktion bei der Rekrutierung von Immunzellen

Akute und chronische Lungenerkrankungen sind durch die Präsenz von aktivierten Makrophagen und anderen Entzündungszellen gekennzeichnet. Diese Makrophagen werden hauptsächlich aus dem Pool peripherer Monozyten des Blutes rekrutiert (107). Der chemotaktische Gradient für diese Rekrutierung wird von immunkompetenten Zellen hergestellt, zu denen auch die Typ-II Zellen gerechnet werden. Typ-II Zellen sind in der Lage, bioaktive Faktoren zu produzieren, die eine inflammatorische Situation initieren und unterhalten können. In dieser Arbeit werden die Cytokine MCP-1 und MIP-2 untersucht, die von Typ-II Zellen sezerniert werden.

2.3 Darstellung verschiedener experimenteller Dehnungsmeschanismen

Heutzutage weiß man, dass Dehnung (physikalischer Stress) bei Lungenzellen physiologische und pathophysiologische Effekte bewirken können. Alveolarzellen unterliegen durch die Atmungsluft, durch den Blutfluss und durch die Atembewegungen im Pleuralspalt bestimmten Dehnintensitäten. Deshalb sind im letzten Jahrzehnt verschiedene Geräte entwickelt worden, um Zellen zu dehnen. Manche sind von ihnen auch kommerziell erhältlich. Diese werden je nach ihren physikalischen Merkmalen in Gruppen aufgeteilt, beispielsweise statischer gegen cyclischer *Stretch*, uniaxialer gegen biaxialer Stretch und zweidimensionaler gegen dreidimensionaler Stretch.

Abb. 2: Schematische Beschreibungen der Geräte, die gebraucht werden, um Zellen *in vitro* mechanisch zu stimulieren.



Schema A: Durch den positiven Druck von unten wird die elastische Membran nach oben bewegt (112). Die Zellschicht auf der Membran erfährt dadurch eine biaxiale Dehnung. Es hat den Vorteil, dass bestimmte Versuche unter dem Mikroskop begutachtet werden können.

Schema B: Dieses Gerät, welches wir auch in unseren Versuchen verwendet haben, ist kommerziell erhältlich. Im Equipment ist eine Vakuum Pumpe enthalten. Diese Pumpe erzeugt computergesteuert unter der elastischen Membran, den speziellen 6'er Well Platten, einen negativen Druck, d.h. der elastische Boden wird nach unten bewegt. Die Platten können mit verschiedenen extrazellulären Substanzen beschichtet werden, somit können die Zellen an der Membran adhärent werden. Verschiedene biaxiale-cyclische und biaxial-statische Dehnungen können durchgeführt werden (114, 115, 116). Bezüglich der Korrelation der Dehnung zwischen der Membran und den daraufliegenden Zellen gibt es verschiedene Beobachtungen. Winston et al. (116) beschreiben, dass die Zelldehnung 60 % der Membrandehnug beträgt. Wirtz und Dobbs (117) beobachteten auch, dass die Zelldehnung welcher verglichen mit der Membrandehnung geringer ausfällt. Sie spekulieren, dass eventuell bestimmte Zellbereiche bei der Dehnung sich von der Membran lösen könnten, so dass diese auf der Membran während der Dehnung gleiten könnten (117). Somit würde die Dehnung der Zellen kleiner ausfallen als die der Membran (117). Im Gegensatz dazu beobachteten Lee et al. (188) bei der equibiaxialen Dehnung von Herzfibroblasten aus der Ratte eine hohe Korrelation mit der Membrandehnung. Die Diskrepanz dieser verschiedenen Ergebnisse macht es erforderlich, diese in späteren Studien zu untersuchen.

Schema C: In diesem Modell werden die Zellen in einer drei-dimensionalen Kultur gestretcht. Es ist bekannt, dass sich der Phänotyp der Lungenzellen, insbesondere der Typ-II Zellen, *in vitro* schnell verändern kann. Wenn die Zellen in einer Umgebung mit einer niedrigen Dichte sind, flachen sie schnell ab und

verlieren ihre Fähigkeit, Surfactantproteine zu bilden. Es ist aber gezeigt worden, dass die dreidimensionale Umgebung bei Lungenzellen eine Aufrechthaltung der Zell-Morphologie und des Phänotyps gewährleistet (119). Bei den drei-dimensionalen Kulturen handelt es sich um denaturierte Collagen-Schwämme. Diese mesenchymale Substanz ist auch physiologisch um die Zellen vorhanden (120, 121, 122). Das ursprüngliche drei-dimensionale Stretch Gerät wurde von Skinner entworfen (115). Dieses wurde später zu einem computerisierten Bio Stretch System weiterentwickelt (124).

Schema D: Beim Scheerstress entsteht eine Reibungsfläche auf einer Oberfläche in eine Richtung. Eine parallele Platte wird unter einem Zellmonolayer in einer Richtung hin und her bewegt (125). Man muss aber beachten, dass Zellen durch die Luftwege, pulmonale Blutgefäße und Pleuralraum nicht nur dem Sheerstress, sondern auch dem mechanischen Stress ausgesetzt sind.

Schema E: Bei dieser Methode ist man in der Lage, eine einzige Zelle unter Stress zu versetzen (126). Eine Glas Pipette mit ~1 µm Spitzendurchmesser wird mit Hilfe eines Mikromanipulators in die Nähe der Membran der Zelle positioniert. Mit einem Computer-kontrollierten Piezoelectric-Gerät kann die Zelle dann in Bewegung versetzt werden.

Schema F: Hierbei werden die Zellen, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, mit kugelförmigen eisenhaltigen Perlen gebunden. Durch Magnetfelder werden dann die Zellen gedreht (127, 128). Es entsteht ein so genannter Scheerstress an der Zelloberfläche.

2.4 Mechanische Dehnung des Alveolarepithels, physiologische und pathophysiologische Mechanismen

Es ist mittlerweile unumstritten, dass physikalische Kräfte eine sehr wichtige Rolle bei der Regulation, Funktion und Metabolismus der Lungenzellen spielen (43). Sonografisch ist gezeigt worden, dass Atmungsbewegungen schon in der zehnten Schwangerschaftswoche bei einem Fetus zu sehen sind

Aber abnormale physikalische Kräfte tragen dazu bei, dass in den Lungengeweben verschiedene pathologische Vorgänge in Gang gesetzt werden. Um die durch mechanischen Stress hervorgerufenen Krankheiten der Lunge wie z.B. Barotrauma, bedingt durch die intensivmedizinische künstliche Beatmung, Pulmonary Hypertension, Pulmonary Hypoplasia, Asthma, COPD vorzubeugen und zu behandeln, bedarf es noch der intensiveren Forschung. Denn mechanische Stimulation führt zu unbekannten Regelkreisen intrazellulärer Signaltransduktionswege, die noch nicht definitiv nachvollziehbar sind.

Bislang wurden mit verschiedenen Zellen unseres Körpers Versuche durchgeführt, die mechanischem Stress ausgesetzt waren, wie z.B. zellulare und molekulare Antworten von Herzmuskelzellen auf Stretch (44), Genregulation durch Stretch von Endothelzellen (45), Mechanotransduktion von Gefäßmuskelzellen (46), Knochenzellen (47) und Endothelialzellen (48, 49).

Die genaue mechanisch intrazellulare Signaltransduktion, hervorgerufen durch mechanische Belastung der Lungenzellen, ist jedoch noch nicht gezeigt worden.

Obwohl die initiale Schädigung des Beatmungstraumas pulmonalen Ursprungs ist, führt bei Patienten, die an ihrer akuten Erkrankung versterben, meist ein Multiorganversagen zum Tode. Ursache hierfür ist der Einfluss des Beatmungstraumas auf lokale und systemische inflammatorische Mediatoren (85, 86).

2.5 Effekte von mechanischen Belastungen auf Alveolarepithelzellen

Bis jetzt haben Studien gezeigt, dass mechanische Belastung der Zellen in die folgenden Bereiche eingreift:

1. Inflammatorische Mediatoren-Produktion

2. Beeinflussung der Calcium-Freisetzung

3. Beeinflussung der „Zell-Proliferation“

4. Beeinflussung des Surfactant Metabolismus

5. Umstrukturierung des Extrazellulärraums

6. Beeinflussung der Zellpermeabilität

2.5.1 Mechanische Dehnungen von Zellen führen zu einer erhöhten Cytokinfreisetzung

Mechanische Beatmung ist in der Intensivmedizin mittlerweile eine unentbehrliche Therapiemaßnahme bei Atmungsproblemen.

Schädigende Ventilationsstrategien führen zu einer Zunahme von TNF-a, Interleukine wie IL-1β, IL-6 und IL-10, MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein) und Interferon-?. Diese Werte maß man in der Lungenlavage von isolierten Rattenlungen (72).

Bei der human-alveolaren Epithelzelllinie A459 wurden durch die Belastung mit dem Flexercell Stretchgerät IL-8 freigesetzt (74).

Inflammatorische Cytokine, die während der Lungenbeatmung produziert werden, können zur Entwicklung einer akuten Lungenschädigung (ARDS) und zur Entwicklung von multiplen Organschädigungen wie z.B. MSOF führen (73).

Bethmann und Kollegen zeigten, dass bei isolierten Mäuselungen, die mit -25 cm H_2O Beatmung, gegenüber der physiologischen -10 cm H_2O Beatmung, höhere Werte von TNF-a und IL-6 im Perfusat zu messen waren (60).

Es ist auch herausgefunden worden, dass primär in Kultur gelegte alveolare Epithelzellen, die am ersten Tag gestretcht wurden, prozentual mehr Schädigungen erlitten hatten, als alveolare Ephithelzellen, die am fünften Tag gestretcht wurden (75). In verlängerten Kulturzeiten haben die Typ-II Zellen die Eigenschaft, sich morphologisch in Typ-I Zellen zu verwandeln.

Prostaglandin Synthese: Die Synthese von biologisch aktiven Eicosanoiden durch die Epithelzellen der Luftwege tragen zur Regulierung des Tonus der glatten Muskeln in den Luftwegen und zur inflammatorischen Antwort bei. Mit dem Flexercell Stretch Gerät ist gezeigt worden, dass cyclischer Stretch die Synthese der Prostaglandine nach unten reguliert. Unter anderem von: PGE_2, PGI_2, Thromboxane A_2 von Katzen und humanen Lungenepithel Zellen (76). In anderen Studien ist wiederum gezeigt worden, dass Scheerstress bei fetalen Rattenlungenzellen eine rapide Freisetzung von Prostacyclinen bewirkt (77, 78). Diese Ergebnisse zeigen, dass verschiedene mechanische Belastungen zu unterschiedlichen inflammatorischen Antworten führen.

In den Zellstretchversuchen ist es wichtig, die Zellen so zu behandeln, dass sie weniger der Zelldeformation und dem Zelltod unterliegen. Alveolarschäden nehmen mit dem Ausmaß und der Dauer der Dehnung zu (54) und verringern sich mit der zellulären Dichte. Je länger sie *in vitro* in Ruhe gelassen werden, d.h. Zellen, die *in vitro* erst nach ein paar Tagen gestretcht werden, sind stabiler und unterliegen weniger dem Zelltod (54).

Mechanischer Stress der Lunge, z.B. durch mechanische Beatmung, wird auch in Zusammenhang gebracht mit einer Begünstigung von ARDS. Die Mortalitätsrate von ARDS ist größer als 50 %, die meisten Patienten sterben jedoch an MSOF (Multiple System Organ Failure) (55). Denn Entzündungen (wie z.B. durch mechanische Ventilation) können hervorrufen, dass Granulozyten von der Lunge (Alveolen) über das Herz in den großen Kreislauf gelangen. Bedingt durch

Zunahme der Permeabilität zwischen Alveolen und Kapillaren gelangen verschiedene Mediatoren vom kleinen Kreislauf in den großen Kreislauf. Schließlich befinden sich ein Drittel aller Granulozyten außerhalb des Knochenmarks in den Lungen. Die Anwesenheit der Entzündungsvermittler im Kreislauf spielt eine große Rolle beim systemischen Organversagen und Schock (55).

Wie mechanische Belastung die Zellen beeinflusst und wie dieses Signal intrazellulär umgewandelt wird, ist noch nicht beschrieben worden. Aber von den verschiedenen vorgeschlagenen Mechanismen erfahren das Modell der Stretch-aktivierten Ionenkanäle und das Extrazellulär-Integrin-Cytoskellett-Model die meiste Beachtung. Stretch steigert die Aktivität der Ionenkanäle der Lungenzellen. Ca^{2+} ist das am meisten beschriebene Ion, das ein stretchbedingtes intrazellulares Signal vermittelt.

20%-ige Dehnung von glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien bei Ratten-Zellen führt zu einer Zunahme des Calciumeinstroms und Calciumsausstroms (79). Zellen sind miteinander durch die Integrine verbunden, diese Integrine haben wiederum Kontakt mit dem Cytoskelett. Dieser Aufbau schafft eine strukturelle Beziehung zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zellinneren, weiterhin ermöglicht es eine strukturelle Signalübertragung vom Extrazellulärraum über die Zelloberfläche in das Zellinnere. Wenn die Integrine mit einer Micropipette gedrückt werden, führt dies zu einer Umorientierung der Cytoskelettfilamente. D.h. mechanischer Stress führt zu einer Änderung der Cytoskeletalstarre und diese Veränderung kann z.B. dazu führen, dass in den Zellen bestimmte Regulatorproteine beeinflusst werden (80, 81, 82).

2.5.2 Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme des Ca^{2+}

Es ist gezeigt worden, dass z.B. 11-17 %-ige Dehnungen von Ratten Typ-II Zellen nach 20 Sekunden eine Steigerung der intrazellularen Calciumkonzentration

bewirken (50). Die c-AMP-Werte zeigten bei Stretch keine gravierenden Unterschiede (50).

2.5.3 Mechanische Dehnung führt zur Zellproliferation

Eine andere Studie bewies, dass Stretch bei fetalen Rattenlungenzellen Proliferationen zeigte, die stärkste (3H) Thymidin Incorporation in die DNA erfolgte bei 1 %-igem FCS-Medium und bei den Zeiten 12, 24 und 48 Stunden nach Stretch (51, 53, 62). Auch humane Lungen-Fibroblasten der Zell-Linie IMR-90 zeigten ein Wachstum (63, 64). Es wird postuliert, dass mechanischer Stress bei fetalen Rattenlungenzellen eine Zunahme der Gene und Proteinexpression von PDGF ß-Rezeptor bewirkt (PDGF: Plated derived growth factor, von Thrombozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildeter Wachstumsfaktor; ist beteiligt an der Zell-Proliferation, Wundheilung und Entstehung der Atherosklerose) (65). Denn die Blockade dieser Rezeptoren mit Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitor unterdrückt die durch mechanischen Stress erzeugte Zell-Proliferation (65).

2.5.4 Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme der mRNA-Konzentrationen von SP-C

Surfactantbildung und Sekretion sind wichtige Hauptaufgaben von Typ-II Zellen. Es ist beschrieben worden, dass mechanische Ventilation die Surfactantbildung beeinflusst (56, 57, 58, 59). Wirtz und Dobbs (112) stretchten 30 Minuten lang Typ-II Zellen, dies führte neben der Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen zu einer Zunahme der Phospholipid-Freisetzung (50, 66). In einem anderen Versuch ist gezeigt worden, dass cyclischer Stretch bei fetalen Rattenlungenzellen eine Zunahme der mRNA Konzentrationen von SP-C, aber nicht von SP-A bewirkt hat (67). Somit steigt die Tendenz eines distalen Alveolis-Kollapses, somit sinkt der Gasaustausch, was in der Intensivmedizin zu einer Erhöhung des Beatmungsdruckes führt. Auf diese Weise entsteht ein Teufelskreis:

Lungenschädigung verschiedener Genese, die damit verbundene Gasaustauschstörung (Hypoxie) ? künstliche Beatmung ? weitere Lungenschäden durch die künstliche Beatmung und Verschlechterung des Gasaustausches (Barotrauma) ? Erweiterung der künstlichen Beatmung ? ARDS, MSOF.

2.5.5 Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme der mRNA Levels von Typ IV Collagen, Tropoplastin und Fibronectin

Cyclischer Stretch induziert bei fetalen Lungenzellen eine Zunahme der mRNA Levels von Typ IV Collagen und Tropoplastin. Es verhindert aber die Ansammlung von a_1(I)-Procollagen und Biglycan mRNAs (68, 67). Die Genexpression und Aktivität der Matrixmetalloproteinase und ihres Inhibitors (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1) waren vom Stretch unbeeinflusst (68). Stretch führt auch zu einer Zunahme der Fibronectinproduktion, aber gleichzeitig zu einer Unterdrückung der Fibronectin Protein Synthese und Sekretion. Somit wird die Blutgerinnung nach unten reguliert (69, 70, 71).

2.6 Mechanische Beatmung am Beispiel von ARDS

Die Erstbeschreibung des ARDS erfolgte durch Ashbaugh (1967). Das akute Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) ist eine Funktionsstörung der Gasaustauschstrecke der Lunge (Kapillare – Interstitium – Alveole), welche durch unterschiedliche Faktoren bei vorher Lungengesunden ohne spezielle Prädisposition ausgelöst werden kann und in der Regel begleitet wird von Störungen der pulmonalen Vasomotion, interstitieller und alveolärer Ödembildung und Atelektasenbildung, wodurch klinisch eine pulmonale Hypertonie und konsekutive Gasaustauschstörungen resultieren.

Die Ätiologie ist entweder durch direkte pulmonale Schädigung, wie z.B. Aspirationspnemonie, Beinahe-Ertrinken (d.h. Ertrinken mit Aspiration), Infektion, Lungenkontusion, Pneumonien (Bakterien, Pilze, Viren, Pneumocystis), Rauchgasinhalation, Reizgasinhalation (Phosgen, Oxide, Chloringas), Inhalation von hyperbarem Sauerstoff oder durch systemische Erkrankungen, wie z.B. Intoxikation (Heroin, Methadon, Salicylate, Paraquat usw.), Massentransfusionen (>Einheiten/24Stunden), Pankreatitis, kardio-pulmonaler Bypass, kardio-pulmonale Reanimation, Sepsis, Polytrauma, Schädel-Hirn-Trauma bedingt (4).

Man unterscheidet zwei Schweregrade:

1. Mittlerer Schweregrad (Acute Lung Injuy, ALI)

- Akuter Beginn
- Oxygenierungsstörungen: $PaO_2/FiO_2 < 300$ mm Hg
- Bilaterale Infiltrate in der Röntgenaufnahme der Lunge (ap)
- Pulmonal-arterieller Verschlussdruck (nicht obligatorisch):
  PCWP <18 mm Hg

2. Hoher Schwerergrad (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)

- Wie ALI außer Oxygenierungsstörungen: PaO_2/FiO_2 <200 mm Hg (3)

Die maschinelle Überdruckbeatmung stellt zurzeit ein unersetzliches Instrument zur Therapie schwerer beatmungspflichtiger Ateminsuffizienzen dar. In der im Jahre 2000 veröffentlichten „Acute respiratory disstress syndrome“ Network

Studie (108) konnte jedoch ein signifikanter Vorteil hinsichtlich der Mortalität und der Beatmungsdauer einer Lungenprotektiven im Vergleich zu einer konventionellen Beatmungsstrategie gezeigt werden. Die lungenprotektive Beatmung hatte hierbei zum Ziel, durch Verwendung eines hohen positiven endexpiratorischen Druckes (PEEP) in Kombination mit niedrigen Atemzugvolumina (AZV, 6-8 ml/kg Körpergewicht) den mechanischen Stress in den ventilierten Lungenarealen zu minimieren. Diese Studie wurde nach Einschluss von 861 Patienten wegen der geringen Mortalität in der Gruppe mit lungenprotektiver Beatmung abgebrochen.

Parameter des Beatmungstraumas sind Störungen der alveolo-kapillären Schranke mit Veränderungen des Gasaustausches durch Auftreten eines interstitiellen und alveolären Lungenödems, Surfactants Dysfunktion, sowie Veränderungen der Hämodynamik und der Medatorprofile im Serum und in der bronchoalveolären Lavage (BAL).

Obwohl die initiale Schädigung des Beatmungstraumas pulmonalen Ursprungs ist, führt bei Patienten, die an ihrer Erkrankung versterben, meist ein Multiorganversagen zum Tode. Ursache hierfür ist der Einfluss des Beatmungstraumas auf lokale und systemische inflammatorische Mediatoren (84, 85, 86). Schädigende Ventilationsstrategien führen zu einer Zunahme von TNF-a, Interleukinen wie IL-1β, IL-6, IL-8 und IL-10, MIP-2 und Interferon-? (72, 74).

Der Einfluss mechanischer Stimuli auf das alveolare Epithel, wie sie unter physiologischen Bedingungen (Atemexkursion), aber auch unter therapeutischer Intervention (Überdruckbeatmung mit mechanischer Dehnung der Alveolarzellen bei respiratorischer Insuffizienz) auftreten können, ist weit reichend. So kann eine Dehnung (Stretch) neben reversiblen differentiellen Veränderungen der Epithelzellen auch durch ein Beatmungstrauma zu irreversiblen Schädigungsmechanismen und Umstrukturierung der Alveolen beitragen, in deren Folge die alveoläre Homöstase verändert ist. Entzündungen können dazu führen, dass Granulozyten von der Lunge über das Herz in den großen Kreislauf gelangen können, schließlich befindet sich ein Drittel aller Granulozyten außerhalb des

Knochenmarks in den Lungen. Die Anwesenheit der Entzündungsvermittler im Kreislauf spielt eine große Rolle beim systemischen Organ-Versagen und Schock (2).

In unserer Arbeit untersuchten wir anhand Typ-II Zellen des Alveolarepithels, die wir aus Rattenlungen isoliert haben, inwieweit sie bei künstlicher Beatmung (gedehnt durch das Flexercell Stretch Gerät) vermehrt die Cytokine MCP-1 und MIP-2 freigesetzt wurden. Diese Versuche wurden in An- und Abwesenheit von LPS (bakterieller Stimulans) durchgeführt. MCP-1 zählt zu den CC-Chemokinen (CC: zwei benachbarte Cysteinen) und ist ein von verschiedenen humanen Zellen sezernierendes Protein mit chemotaktischen Effekten auf die Zellen mononuklärer phagozytärer Systeme und basophiler Granulozyten. Letztere werden nicht nur angelockt, sondern auch sehr effektiv degranuliert. MCP, das CC-Chemokin, binden an die CC-Chemokin-Rezeptoren der Zellen, von denen neun bekannt sind (CCR1-9). Chemokinrezeptoren geben ihre Signale über angekoppelte G-Proteine weiter (7, 8).

Chemokine wie IL-8 und MCP-1 erfüllen zweierlei Funktionen beim Anlocken von Zellen. Erstens steuern Chemokine die Wanderung der Leukozyten entlang eines Chemokinegradienten. Dessen Konzentration nimmt in Richtung auf einen Infektionsherd zu. Das wird durch Bindung der kleinen löslichen Chemokine in der extrazellulären Matrix und auf Oberflächen von Endothelzellen an Proteoglykanen erreicht, sodass die Chemokine an einem stabilen Substrat befestigt sind, auf dem sich die Leukozyten bewegen können (7, 8). Zweitens wirken sie auf Leukozyten ein, die in Entzündungszonen die Endothelzellen entlang „rollen“ und wandeln diese Bewegung in eine stabile Bindung um, in dem sie bei den Adhäsionsmolekülen, die man als Leukozyten-Integrine bezeichnet, eine Konformationsänderung verursachen. Dadurch kann ein Leukozyt die Blutgefäßwand durchqueren, indem er sich zwischen den Endothelzellen hindurchdrückt (Extravasation) (7, 8). Außerdem induzieren die Chemokine die Produktion von CD11c, CD11b und das Leukozyten-Adhäsions-Molekül-1 (15).

2.7 Die Rolle des bakteriellen Endotoxins LPS bei inflammatorischen Prozessen der Lunge

Die klinische Manifestation von fulminanten oder systemischen Infektionen wie Fieber, Hyperkoagulation, Somnolenz, Hypotension, Kachexie und multiples Organversagen werden auch den Auswirkungen von aktivierten Immunzellen (wie z.B. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen) zugeschrieben. Als Prototyp des bakteriellen Stimulus für Inflammation gilt das bakterielle Endotoxin (LPS) (18), ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien.

Die Aktivierung von Immunzellen ist ein natürlicher Schutzmechanismus des Körpers, mit dessen Hilfe Mikroorganismen erkannt und zerstört werden können. Aufgrund seines toxischen und protektiven Potenzials wurde die Wirkungsweise von LPS auf immunaktive Zellen sehr genau untersucht (19).

Der menschliche Organismus ist unter natürlichen Bedingungen in ständigem Kontakt mit LPS-tragenden, gram-negativen Bakterien; bei Inhalation dieser Bakterien kann es zu einer alveolaren Exposition mit LPS kommen, wobei niedrige Dosierungen von LPS nützliche Effekte z.B. bezüglich des Immunsystems und der Steigerung der Abwehrkraft gegenüber Infektionen oder Entartungen zeigen können (20). Andererseits führt die Anwesenheit von hohen LPS Konzentrationen zu dramatischen pathophysiologischen Reaktionen wie Fieber, Leukopenie, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotension, disseminierter intravasaler Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie und Multi-Organversagen. Das resultierende septische-Schock-Syndrom hat eine Letalität von etwa 20-50 %, was zur intensiven Forschung über die molekularen, biochemischen und patophysiologischen Wirkungen des LPS geführt hat.

LPS erzeugt seine biologischen Effekte durch die Stimulation von körpereigenen Zellen wie Epithelzellen, Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten und führt zu einer Produktion und Freisetzung endo- und exogener Mediatoren.

Als für die Lunge relevant beinhalten diese neben MCP-1, MIP-2, Interleukin-1, Interleukin-6, Tumornekrosefaktor alpha (TNF-a), bioaktive Lipide wie den Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) und Thromboxan A2, oxidative Spezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffmonoxid (NO), welche eine Großzahl der Ausprägungen des septischen Krankheitsbildes verursachen (21).

Die grundsätzliche chemische Struktur der Lipopolysaccharide besteht aus einem Lipid- und einem Polysaccharidanteil. Der Polysaccharidanteil beinhaltet die O-spezifischen Kettenbestandteile sowie die Kernbestandteile. Der O-spezifische Kettenbestandteil, aufgebaut aus ca. 50 sich wiederholenden Oligosacchariden, ist charakteristisch und einzigartig für jede Bakterienspezies; er bezeichnet den bakteriologischen Serotyp und stellt ein starkes Antigen dar. Der Kernbestandteil des Polysaccharidanteils ist weniger variabel ausgebildet als der O-spezifische Kettenbestandteil; seine pathophysiologische Rolle ist noch nicht hinreichend geklärt.

Die geringste molekulare Variabilität zeigt generell der Lipidanteil des LPS, hier ist besonders die terminale Lipidregion, das sog. Lipid A, von Interesse. Obwohl nicht alle Strukturmerkmale des LPS bei allen gram-negativen Bakterien ausgeprägt sind, so beinhalten doch alle LPS-Subtypen das Lipid A, das als verantwortlicher Molekülbestandteil der biologischen Wirkung des LPS identifiziert wurde. Es ist belegt, dass isoliertes Lipid A gleichartige Wirkungen wie LPS hervorruft (20).

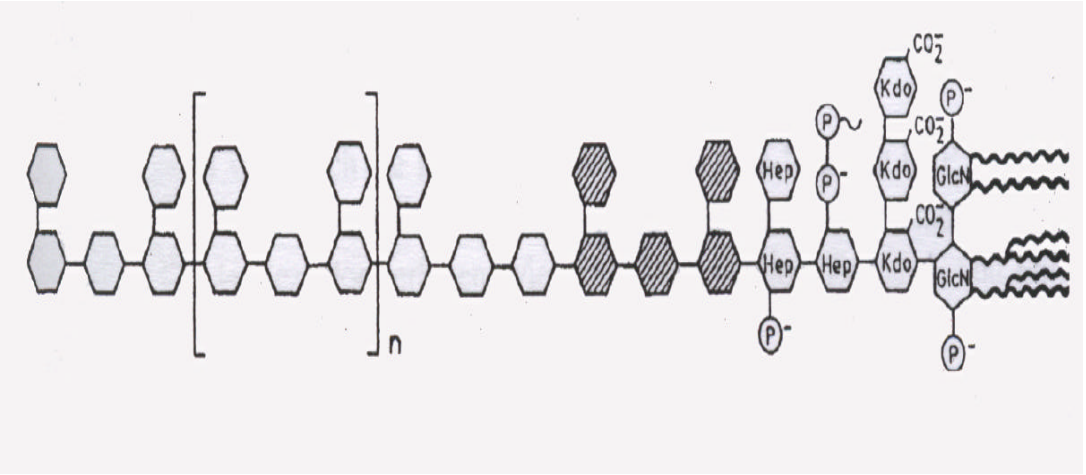


Abb. 3: Struktur des Lipopolysaccharids, LPS. (Charles A. Janeway, Immunologie 5. Auflage, Akademischer Verlag Spektrum, Gustav Fischer)

Aufgrund des amphipathischen Charakters des LPS wurde früher angenommen, dass LPS unspezifisch durch hydrophobe Verschmelzung mit der Zellmembran der Effektorzelle interagiert und dadurch seine Wirkung entfaltet. Inzwischen ist das Konzept der spezifischen Rezeptor-vermittelten Interaktion des LPS mit der Zielzelle allgemein akzeptiert und begründet (21).

Viele Membranproteine binden LPS, z.B. die CD18/11 β-Integrine, doch nur von einem Rezeptortyp, CD-14, ist bislang definitiv gezeigt worden, dass er in den eigentlichen Zellaktivierungsprozess involviert ist. Dieses 55 kDa große Glykoprotein, CD-14, führt zu einer sekretorischen Antwort nach Interaktion mit LPS (21). CD-14 existiert in einer löslichen Serumform (sCD-14) und einer membrangebundenen Form (mCD-14).

Das Ankoppeln von LPS am mCD-14 Rezeptor monozytärer Zellen führt zur Synthese und Freisetzung von Cytokinen. Das Andocken von LPS wird von dem Serumfaktor Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) beeinflusst und moduliert. Dieses 60 kDa Glykoprotein ist in humanem Serum in einer Konzentration von 5-10 mg/ml vorhanden. Während der Akut-Phasen Antwort steigt dieser Level bis auf das 20 fache an (22). LBP bildet mit LPS hochaffine

Komplexe, welche durch CD-14 erkannt werden. Die Relevanz von LBP bei der LPS-vermittelten Wirkung wurde dadurch gezeigt, dass Anti-LBP den Endotoxinschock, ausgelöst durch geringe LPS-Konzentration, bei Mäusen verhindern konnte (23).

Die Gabe von Anti-CD-14 konnte die LPS-Rezeptor-Kopplung und Zytokin-Ausschüttung an Monozyten bei niedriger LPS-Konzentration verhindern; diese Hemmung wurde durch hohe Konzentrationen von LPS aufgehoben, was die Existenz von mCD-14 unabhängigen Rezeptortypen möglich erscheinen lässt. LPS könnte an einem anderen Rezeptor als mCD-14 ankoppeln oder aber internalisiert werden und mit einem intrazellulären Rezeptor interagieren (24). Seit kurzer Zeit ist die Existenz eines so genannten Toll-like-Rezeptors nachgewiesen, der in seiner chemischen Struktur dem IL-1-Rezeptor ähnelt (deshalb auch synonym: IL-1-like-rezeptor). Diesem neu entdeckten Rezeptor wird eine hohe Affinität gegenüber dem LPS zugeschrieben; man vermutet, dass das LPS auch über diese Rezeptorklasse, ebenfalls unter Interaktion mit CD-14, Wirkungen entfalten und Signaltransduktionskaskaden auslösen kann. In dieser Richtung sind aber noch umfangreiche Forschungsarbeiten zu leisten, um die Funktion des Toll-like-Rezeptors abschließend beurteilen zu können (25).

Wie bei mCD-14 kann auch die Bindungskapazität von sCD-14 durch LBP erhöht werden (26), die sCD-14-LPS Komplexe können Zellen, die nicht über einen membrangebundenen CD-14 Rezeptor verfügen, wie glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, zur Ausschüttung von Mediatoren stimulieren (27).

Die Existenz eines Rezeptors, der diese löslichen LPS-sCD 14–Komplexe an mCD-14 negativen Zellen erkennt, wird postuliert, ist aber nicht erwiesen.

Insgesamt ist festzustellen, dass der Wirkungsmechanismus der zellulären Antwort nach LPS-Kontakt noch nicht hinreichend erforscht ist. Aufgrund zahlreicher Besonderheiten, sowohl die unterschiedlichen Zellarten als auch unbekannte Regelkreise intrazellulärer Signaltransduktionswege betreffend, ist die Interaktion von LPS mit biologischen Zellsystemen sehr komplex und variabel.

2.8 Charakterisierung und Funktion von den Chemokinen MCP-1 und MIP-2

Zu den Cytokinen, die in den frühen Phasen einer Beatmung in dem betroffenen Gewebe freigesetzt werden, gehören Vertreter einer Familie von chemotaktisch aktiven Cytokinen, die man als Chemokine (chemoattractant-cytokines) bezeichnet. Chemokine sind Cytokine, die potente chemotaktische Agentien u.a. für T-Zellen, „Natural Killer"-Zellen, Monozyten und Makrophagen sind. Typischerweise sind es kleine, über Disulfidbrücken stabilisierte Polypeptide mit einer Länge von 60-70 Aminosäuren. Nahezu alle Mitglieder enthalten vier konservierte Cystein-Aminosäurereste (C1-C4). Aufgrund der Position der vier konservierten Cysteinreste werden die Chemokine in Gruppen unterteilt (siehe Chemokine Tabelle) CC-, CXC-, CX3C-, C-Chemokine (87).

2.8.1 Physiologische Funktionen des Monozyten-chemotaktischen Protein-1 (MCP-1) im Alveolarepithelzellverband

MCP-1 zählt zu den CC-Chemokinen (CC: zwei benachbarte Cysteinen) und ist ein von verschiedenen humanen Zellen sezernierendes Protein mit chemotaktischen Effekten auf die Zellen mononuklärer phagozytärer Systeme und basophiler Granulozyten. Letztere werden nicht nur angelockt, sondern auch sehr effektiv degranuliert. Das mittels recombinanter Gentechnik hergestellte Molekül hat eine relative Molekülmasse von 8,7 kDa.

MCP, das CC-Chemokin, binden an die CC-Chemokin-Rezeptoren der Zellen, von denen neun bekannt sind (CCR1-9). Chemokinrezeptoren geben ihre Signale über angekoppelte G-Proteine weiter (7, 8). Ein MCP-1 Antagonist ist das um acht Aminosäuren verkürzte humane MCP-1 (hMCP-1 9-76) ein Protein, das aus methylotrophen Hefe Pichia pastoris heterolog exprimiert wurde.

Chemokine wie IL-8 und MCP-1 erfüllen zweierlei Funktionen beim Anlocken von Zellen.

Erstens steuern Chemokine die Wanderung der Leukozyten entlang eines Chemokinegradienten. Dessen Konzentration nimmt in Richtung auf einen Infektionsherd zu. Das wird durch Bindung der kleinen löslichen Chemokine in der extrazellulären Matrix und auf Oberflächen von Endothelzellen an Proteoglykanen erreicht, sodass die Chemokine an einem stabilen Substrat befestigt sind, auf dem sich die Leukozyten bewegen können (7, 8).

Zweitens wirken sie auf Leukozyten ein, die in Entzündungszonen die Endothelzellen entlang „rollen“ und wandeln diese Bewegung in eine stabile Bindung um, indem sie bei den Adhäsionsmolekülen, die man als Leukozytem-Integrine bezeichnet, eine Konformationsänderung verursachen. Dadurch kann ein Leukozyt die Blutgefäßwand durchqueren, indem er sich zwischen den Endothelzellen hindurchdrückt (Extravasation) (7, 8).

Außerdem induzieren die Chemokine die Produktion von CD11c, CD11b und das Leukozyten-Adhäsions-Molekül-1 (15).

Wie oben erwähnt, wird MCP von verschiedenen humanen Zellen produziert, wie z.B Enterozyten, Pankreatozyten oder Typ-II Zellen der Lunge.

Es ist gezeigt worden, dass Enterozyten keine passiven Infektionsopfer sind; sie signalisieren durch die Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen, dass eine Infektion stattgefunden hat. Zu den freigesetzten Substanzen gehören neben dem Chemokin IL-8, einem Chemoattraktor für Neutrophile, auch CC-Chemokine wie MCP-1, MIP-1a und MIP-1ß u.a die allesamt Monocyten, Eosinophile und T-Lymphocyten chemisch anlocken (9-13). Auch die Typ-II Zellen der Lunge sind in der Lage, Entzündungen durch Freisetzung von Chemokinen zu signalisieren, da MCP-1 und MIP-2 die in den allerersten Phasen einer Infektion in dem betroffenen Gewebe freigesetzt werden, wurden sie in unseren Versuchen per ELISA bestimmt.

Tab. 1: Chemokine und ihre Rezeptoren (Immunologie, Charles A. Janeway, Spektrum Lehrbuch 5. Auflage, S 727)

Chemokine und ihre Rezeptoren				
Chemokin	**systematische Bezeichnung**	**Chromosom**	**Zielzellen**	**spezifischer Rezeptor**
+ CXC	**CXCI**			
IL-8	8	4	neutrophile, basophile Zellen, T-Zellen	CXCR1 2
GROa	1	4	neutrophile Zellen	CXCR2» 1
GROß	2	4	neutrophile Zellen	CXCR2
GROy	3	4	neutrophile Zellen	CXCR2
ENA-78	5	4	neutrophile Zellen	CXCR2
LDGF-PBP	7	4	Fibroblasten, neutrophile Zellen	CXCR2
GCP-2	6	4	neutrophile Zellen	CXCR2
CXC				
PF4	4	4	Fibroblasten	unbekannt
Mg	9	4	aktivierte T-Zellen	CXCR3
IP-IO	10	4	aktivierte T-Zellen (T_H1> T_H2)	CXCR3
SDF-1α/β	12	10	CD34'-Knochenmarkzellen, T-Zellen, dendritische Zellen, B-Zellen, naive B-Zellen, aktivierte C04-T-Zellen	CXCR4
BUNZO/STRC33	16	17	T-Zellen, NK-Zellen	CXCR6
i-TAC	11	4	aktivierte T-Zellen	CXCR3
BLC/BCA-1	13	4	naive B-Zellen	CXCR5
CC	**CCL**			
MIP-1α	3	17	Monocyten/Makrophagen, T-Zellen (TH^1> TH2), NK-Zellen, basophile Zellen, unreife dendritische Zellen, Knochenmarkzellen	CCR1, 5
MIP-1β	4	17	Monocyten/Makrophagen, T-Zellen (TH^1> TH2), NK-Zellen, basophile Zellen, unreife dendritische Zellen, Knochenmarkzellen	CCR1, 5
MDC	22	16	unreife dendritische Zellen, lA-NK-Zellen, T-Zellen (TH^2> TH^1), Thymocyten	CCR4
TECK	25	19	Makrophagen, Thymocyten, dendritische Zellen	CCR9
TARC	17	16	unreife dendritische Zellen, lA-NK-Zellen, T-Zellen (TH2 > TH^1), Thymocyten	CCR4
RANTES	5	17	Monocyten/Makrophagen, T-Zellen (T-Gedächtniszellen > T-Zellen; TH1 > TH^2), NK-Zellen, basophile, eosinophile und dendritische Zellen	CCR1, 3,5
HCC-1	14	17	Monocyten	CCR1
HCC-4	16	17	Monocyten	CCR1
DC- CK1	18	17	naive T-Zellen > T-Zellen	unbekannt
MIP-3α	20	2	T-Zellen (T-Gedächtniszellen > T-Zellen), mononucieäre Zellen des peripheren Blutes, Knochenrnarkzellen, dendritische Zellen	CCR6
MIP-3β	19	9	naive T-Zellen, reife dendritische Zellen, B-Zellen	CCR7
MCP-1	2	17	T-Zellen, Monocyten, basophile Zellen	CCR2
MCP-2	8	17	T-Zellen, Monocyten, eosinophile, basophile Zellen	CCR2
MCP-3	7	17	T-Zellen, Monocyten, eosinophile, basophile, dendritische Zellen	CCR2
MCP-4	13	17	T-Zellen, Monocyten, eosinophile, basophile, dendritische Zellen	CCR2, 3
-	12	(11)	eosinophile Zellen, Monocyten, T-Zellen	CCR2
Eotaxin	11	17	eosinophile Zellen	CCR3
Eotaxin-2/MPIF-2	24	?	T-Zellen (?). eosinophile. basophile Zellen	CCR3
1-309	1	17	neutrophile Zellen (nur TCA-3), T-Zellen	CCR8
MIP-5/HCC-2	15	17	T-Zellen, Monocyten, neutrophile Zellen (?), dendritische Zellen	CCR1, 3
MPIF-1	23	17?	Monocyten, T-Zellen (ruhend), neutrophile Zellen (?)	unbekannt
6Ckine	21	9	naive T-Zellen, Mesangiumzellen (?)	CCR7
CTACK	27	9	T-Zellen	CCR1O
MEC	28	5	T-Zellen, eosinophile Zellen	CCR1O, 3
C und CX3C				
Lymphotactin	XCL 1	1 (1)	T-Zellen, NK-Zellen	XCR1
Fractalkin	CX3CL 1	16	T-Zellen, Monocyten, neutrophile Zellen (?)	CX3CR1

2.8.2 Einfluss des Makrophagen-inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2) auf Alveolarepithelzellen

MIP-2, Macrophage inflammatory protein-2, ist in seiner proinflammatorischen und neutrophile Granulozyten aktivierenden Wirkung dem Interleukin-8 ein nahe verwandter Faktor. Das MIP-2 wurde erstmals aus einer Makrophagenzelllinie von Mäusen gewonnen und gereinigt. Es handelt sich dabei um ein 7,9-kDa messendes Peptid, welches, durch Endotoxin induziert, von Entzündungszellen produziert wird. Das MIP-2 zeigt eine dosisabhängige, chemotaktische Wirkung auf polymorphkernige, neutrophile Granulozyten (PMN) (110). Diese Wirkung des MIP-2 ist auch in der Lunge verschiedener Tiermodelle beschrieben worden. So wurde in diesen Modellen, nach intratrachealer Instillation von *Klebsiella pneumonieae*, *Pseudomonas aeruginosa*, LPS oder verschiedener Staubpartikel, eine Erhöhung der messenger RNA (mRNA)- und der Proteinexpression vom MIP-2 festgestellt (111). Folge einer erhöhten MIP-2-Expression ist eine Infiltration des Parenchyms und der interstitiellen Räume der Alveole mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (110). Somit nimmt das MIP-2 bei der Chemotaxis von Entzündungszellen, im Rahmen akuter inflammatorischer Prozesse in der Lunge, ebenso wie das MCP-1, eine zentrale Rolle ein.

3. Fragestellung

Die maschinelle Überdruckbeatmung stellt zurzeit ein unersetzliches Instrument zur Therapie schwerer beatmungspflichtiger Ateminsuffizienzen dar. Obwohl die initiale Schädigung des Beatmungstraumas pulmonalen Ursprungs ist, führt bei Patienten, die an ihrer akuten Erkrankung versterben, meist ein Multiorganversagen zum Tode. Ursache hierfür ist der Einfluss des Beatmungstraumas auf lokale und systemische inflammatorische Mediatoren (84, 85, 86).

Der menschliche Organismus ist unter natürlichen Bedingungen in ständigem Kontakt mit LPS-tragenden, gram-negativen Bakterien; bei Inhalation dieser Bakterien kann es zu einer alveolaren Exposition mit LPS kommen, wobei niedrige Dosierungen von LPS nützliche Effekte z.B. bezüglich des Immunsystems und der Steigerung der Abwehrkraft gegenüber Infektionen oder Entartungen zeigen können (20). Anderseits führt die Anwesenheit von hohen LPS Konzentrationen zu dramatischen pathophysiologischen Reaktionen wie Fieber, Leukopenie, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotension, disseminierter intravasaler Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie und Multi-Organversagen.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage nach dem inflammatorischen Verhalten von Typ-II Zellen bei mechanischen Belastungen. Hierzu untersuchten wir frisch isolierte alveoläre Ratten-Typ II-Zellen und Zellen einer Rattenlungentumorzelllinie (L2), die auf speziellen, mit einem elastischen Boden ausgerüsteten 6er Well-Platten inkubiert wurden. Diese Wells wurden mit Hilfe von computergesteuerten Ventilen bewegt, sodass das Zellmonolayer während der Versuche equibiaxial gedehnt wurde.

Folgende Schwerpunkte wurden untersucht:

- Inwieweit führt Stretch (mechanische Dehnung) zur einer Zellschädigung, verglichen mit ungestretchten Zellen?

- Führt Stretch (mechanische Beatmung) zur erhöhten Chemokinfreisetzung (Entzündungssignale) im Vergleich zur ungestretchten Zellen?

- Wie reagieren die Zellen mit der Chemokinfreisetzung, wenn sie zusätzlich zum Stretch mit LPS behandelt werden. Wird durch mechanische Beatmung die Toleranz für LPS gesenkt?

Als bakterieller Stimulans wurde LPS (Lipopolysaccharide) aus gramnegativen Zellen (Salmonellen) benutzt. Gemessen wurden die Cytokine MCP-1 (Monocten Chemotactant Protein-1) und MIP-2 (Macrophage inflammatory Protein-2) per ELISA.

4. Material und Methoden

4.1 Isolierung von Typ-II Zellen aus Rattenlungen

4.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Spezifisch pathogenfreie männliche Ratten der Art Rattus norvegicus familiaris und Zuchtlinie Spargue-dawley (CD 18) mit einem Gewicht von ca. 160 – 180 g lieferte die Firma Charles River WIGA (Sulzfeld/Main). Sie wurden mit Futter ad liditum versorgt und innerhalb von 48 Stunden nach Lieferung verwendet.

4.1.2 Zellkulturmaterial, Inkubationsmedien, Agenzien

- A549-Zelllinie, ATCC (Atlanta, USA)
- L2-Zelllinie, ATCC (Atlanta, USA)
- Antibiotika (Gentamycin) lyosphilisiert, steril, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Aqua tridestillata im Milli Q Wasseraufbereitungssystem, Millipore (Eschborn, Deutschland) entionisiert und gefiltert.
- D-(+)-Glucose, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- EGTA (Chelator mit erhöhter Calzium-Selektivität), Ethylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N-tetraessigsäure zur Analyse lieferte Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
- Fibronectin, Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), mit Aqua dest. und NaCl gelöst, steril filtriert und die Zellkulturplatten für 45 Minuten bei einer Konzentration von 50µg/ml bei Raumtemperatur beschichtet, bevor man die Platten mit Zellen beschichtete.

- HEPES (Gewebekulturpuffer) N-2-Hydroxyethlpiperazin-N-2-ethansulphonsäure „für Zellkultur getestet“ lieferte Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Immunglobulin, purified rat IgG, Technical Grade Sigma (USA, Canada)
- Isotonische Kochsalzlösung und Ringerlösung, steril und pyrogenfrei, lieferte Braun Melsungen KG (Melsungen, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Pufferbestandteile: Di-Natriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Glucose, Calciumchlorid und Magnesiumsulphat wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) in der Qualität „cell culture tested“ bezogen.
- Tris, Trishydroxyaminomethan p.A., Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Bicarbonat ($NaHCO_3$), Elektrolytkonzentrat 8,4 %ig, Braun (Melsungen, Deutschland)
- DMEM (Dulbeccos modified eagle Medium), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Medium Ham’s F12 K (enthält Pyruvat und Glutamin), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Trypsin EDTA Lösung, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Isobuthyl-methylxanthine (IBMX), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Die zur Zellisolierung aus Rattenlungen verwendeten Pufferlösungen wurden kurz vor der Verwendung aus Stammlösungen hergestellt und setzten sich wie folgt zusammen:

Lösung 1: 140 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 2,6 mM NaH_2PO_4, 10 mM HEPES, 6 mM Glucose, 0,5 mM EGTA, pH: 7,42

Lösung 2: 140 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 2,6 mM NaH_2PO_4, 10 mM HEPES, 6 mM Glucose, 2,2 mM $CaCl_2$, 1,3 mM $MgSO_4$, pH: 7,42

Trispuffer: 50mM Trishydroxy-aminomethan in Aqua dest. gelöst und mit 1 N HCL auf pH 9,5 eingestellt.

DMEM: Dulbecco's modified Eagle Medium (Gibco), 2mM Glutamin 50µg/ml Gentamycin (Gibco), carbonatgepuffert, im Inkubator äqullibriert.

PBS: Phosphate buffered Saline (Gibco) hergestellt aus 10-fach-Konzentrat mit 2 mM Calcium und 1,3 mM Magnesium, eingestellt auf pH: 7,2

4.1.3 Pharmaka und Substanzen zur Isolierung alveolärer Typ-II Zellen

- Liquemin N 25000 (Antikoagulanz) Heparin; Hoffmann La Roche (Grenzach-Whylen, Deutschland)
- Nembutal (Narkotikum) Pentobarbital-Natrium 6 g/ml, Sanefi-CEVA Importgesellschaft (Hannover, Deutschland)
- LPS Lipopolysaccharid von Salmonella Typhimurium, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Anti-CD-14 monoklonale Antikörper MY-4, Coulter Klone
- FCS (Fetales Kälber Serum), hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C, steril filtriert, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- DNAse, Elastase

- Lipid-Farbstoff Phosphin 3R, ICN Flow Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
- Harris Haematoxylin, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Erythrosin B für Vitalitätstest, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Farbstoff 5-carboxy-Fluorescin-diacetat 1 mg/ml für Vitalitätstest, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

4.1.4 Instrumente und Geräte zur Isolierung alveolärer Typ-II Zellen

- CO_2-Inkubator IR 1500, Flow laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Hamilton Präzisionsspritze 100 µl und 50 µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- Hettich Rotanda RP Kühlzentrifuge mit Schwingbecherrotor, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Nylon Filtergewebe, 150 µm, 20 µm, und 10 µm von Reichelt Chemie, (Linz)
- Filter (0,2 µm), Nalgene (Hereford, United Kingdom)
- Petrischalen, bakteriologisch 100 x 15 mm, aus Polystyrol von Falcon (No:1029)
- Zelkulturflaschen
- Pipetten für Zellkultur: Becton & Dickinson, (Heidelberg, Deutschland)
- Polypropylenbecher und Erlenmeyerkolben: 250 ml von Brand KG für Zellkultur

- Präparierbesteck und Scheren zur Gewebszerkleinerung: Aeskulap GmbH
- Präparierbrett: Größe 20x20 cm
- Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB 4a, Flow Labaratories (Meckenheim, Deutschland)
- Trachealtuben aus V2A-Stahl, 2mm: MSZ, Uniklinik Gießen
- Wägezelle, Hottinger Baldwin MeBtechnik (Langen, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanda, Hettich (Tuttlingen, Deutschland**)**
- Zentrifugenröhrchen Falcon „Blue Max“ 50 ml aus Polypropylen mit konischem Boden (No: 2097)
- Neubauer–Kammer

4.1.5 Isolierung von Typ-II Zellen modifiziert nach Dobbs

Zur Vorbereitung der Isolierung wurden die Lösungen 1 und 2 sowie physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Immunglobulin G wurde mit einer Konzentration von 50 µg ml in 15 ml Trispuffer mit pH 9,5 gelöst und filtriert. Es wurden drei bakteriologische 100 mm Petrischalen (Falcon) mit je 5 ml dieser Lösung gefüllt und geschwenkt. Sobald der Boden voll benetzt war, blieben die Platten drei Stunden lang bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde die IgG+Trispuffer–Lösung abgegossen und die Platte fünfmal mit PBS sowie einmal mit DMEM gespült.

Für die Betäubung der Tiere wurde eine Mischung aus 0,35 ml Nembutal, 0,5 ml Kochsalzlösung und 0,05 ml Heparinlösung in einer Insulinspritze (1 ml) aufgezogen. Eine männliche Sprague-Dawley-Ratte mit einem Gewicht unter 180 g (Gewichtsbegrenzung wegen höherer Zellausbeute bei jugendlichen Ratten) wurde durch intraperitoneale Injektion mit 0,7-0,8 ml des Nembutal-Heparin-

Gemisches betäubt. Das Tier schlief nach 2-5 Minuten und durfte auf Schmerzreiz und Kornealreizung nicht mehr reagieren. Es wurde sodann auf dem Rücken liegend auf einem Brett an den Extremitäten fixiert.

Das Fell wurde vom Bauch bis zur Mandibula längs aufgeschnitten. Der Bauchraum wurde eröffnet, die Nierenarterien zerschnitten und das Blut von mehreren Tupfern aufgenommen. Am Hals wurde anschließend die Trachea freigelegt, mit einer feinen Pinzette wurde ein Faden unterlegt und danach wurde sie horizontal zu ¾ eingeschnitten. Ein 2 mm Tubulus mit Lauer-Adapter wurde fest eingebunden. Danach wurde der Thorax längst dem Sternum mit einer Schere geöffnet, das Thymusgewebe wurde entfernt und das Perikard eröffnet.

Das rechte Herz und das Herzohr (linker Vorhof) wurden eingeschnitten. Eine auf das Infusionsbesteck adaptierte Pipettenspitze wurde in den Truncus Pulmonalis vorgeschoben und die Lunge mit warmer Lösung 2 so lange perfundiert, bis das Parenchym makroskopisch weiß und blutleer wurde. Vor Perfusion der Lunge wurde diese mit Hilfe einer auf den Trachealtubus aufgesetzten Spritze zweimal mit je 4 ml Raumluft beatmet. Sodann wurde die Lunge möglichst schonend herauspräpariert und mit der Lösung 2 von außen abgespült, um organische Verunreinigungen zu beseitigen.

Zum Entfernen von Alveolarmakrophagen wurde die Lunge achtmal mit je 6 ml Lösung 1 lavagiert, dazu wurde eine leichtgängige 10 ml-Spritze verwendet. Dann wurde zweimal mit je 8 ml Lösung 2 sowie einmal mit einer Elastase-Trypsin-Lösung (9 mg Elastase EC 134 und 1 mg Trypsin in 40 ml Lösung 2, entsprechend 30 U/ml Orcein-Elastin) lavagiert.

Die Lunge durfte hierbei nicht tropfen. Nach Instillation eines Volumens von etwa 8 ml Elastaselösung wurde die Lunge in die auf 37 °C temperierte Kochsalzlösung gehängt und die restliche Elastaselösung unter einem hydrostatischen Druck von ca. 7 cm Wassersäule über einen Zeitraum von 20 Minuten installiert.

Im weiteren Verlauf wurden größere Bronchien und Nicht-Lungen-Gewebe herrauspräpariert und die Lunge in 4 ml DNase Lösung (2,5 mg/ml) mit zwei bis

drei parallel geführten Scheren in einem Spitzkonischen Kunststoffbecher in Stücke von etwa 1 mm^3 zerkleinert.

Diese Suspension wurde mit Lösung 2 auf 20 ml aufgefüllt und 2 Minuten im Plastik-Erlenmeyerkolben bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Um die enzymatische Gewebeauflösung zu unterbrechen, wurden dann 10 ml steril filtriertes FCS (fetales Kälberserum) hinzugefügt und weitere 2 Minuten geschwenkt. Das resultierte Gemisch aus Lungenstücken und freien Zellen wurde durch mehrere Filterlagen aus Mull sowie durch 100 µm, 20 µm, 10 µm Nylongaze aufgetrennt. Das Filtrat wurde mit Lösung 2 in einem Falcon-Röhrchen auf ein Gesamtvolumen von 50 ml eingestellt; anschließend wurde 10 Minuten lang bei 130 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Sedimentierte Zellen wurden in DMEM (mit 10 µg/ml DNase I-Zusatz) resuspendiert und auf eine Zellzahl von $2{,}5x10^6$ Zellen/ml eingestellt. Zum Entfernen von Alveolarmakrophagen und Granulozyten wurden je 10 ml dieser Suspension auf die vorbereiteten, mit IgG beschichteten Petrischalen gegeben und 1,5 Stunden lang bei 37 °C in 10 % CO_2 inkubiert. Danach wurde jede Petrischale mehrfach vorsichtig geschwenkt und mit Hilfe einer 10 ml Pipette wiederholt aufgenommen und abgegeben, um nicht haftende Zellen zu resuspendieren. Die Typ-II Zellen befanden sich nach diesem Schritt im Überstand, während Nicht-Typ-II Zellen an der IgG-Plastik-Matrix adhärierten, was im Lichtmikroskop überprüft wurde. Die Zellsuspension wurde in sterile Zentrifugenröhrchen übertragen und wiederum 10 Min lang bei 130 *g* zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in DMEM mit 10 % FCS resuspendiert und auf dem verwendeten Zellkultursystem über Nacht im Inkubator mit 10 % CO_2 kultiviert. Routinemäßig wurden für eine Zellisolierung die Lungen von zwei bis drei Ratten entnommen und parallel nach diesem Protokoll aufgearbeitet.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung isolierter Typ-II Zellen

Eine einfach und schnell durchführbare Identifizierung der Typ-II Zellen konnte durch Inkubation mit dem Lipid-Farbstoff Phosphin 3R (ICN Flow Biochemicals, Mannheim, Deutschland) durchgeführt werden. Dazu wurden einige Milliliter der verdünnten Zellsuspension mit 10 µg/ml einer Stammlösung des Farbstoffes in Aceton (10 µg/ml) versetzt und nach zwei Minuten mit einer Cytospin-Zentrifuge direkt auf Objektträger sedimentiert. Nach Eindecken mit PBS konnten die Typ-II Zellen im Fluoreszenzmikroskop unter Blaulicht-Erregung durch das goldgelbe Aufleuchten der für sie charakteristischen Lamellarkörper erkannt werden. Phagozytierte Lipide und Vesikel in Makrophagen erschienen dagegen in einem grün-gelben, gut unterscheidbaren Farbton. Andere Zellen färbten sich nur schwach und diffus. Zum Vergleich wurden Ausstriche der Zellpräparation der modifizierten Papanicolaoufärbung unterworfen (139).

Die Phospholipide werden dabei sauer oxydiert und bilden einen im alkalischen Milieu blau-schwarzen Farbkomplex mit Hämatein.

4.2.1 Durchführung der Identifizierung/Charakterisierung

1. Zellsuspension im Cytospin auf Objektträger sedimentieren und eine Stunde trocknen;
2. 2,5 Minuten in Harris Haematoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubieren;
3. zweimal in Aqua dest. tauchen, um Farblösung abzuspülen;
4. 2 Minuten in 0,03 %iger $LiCO_3$ -Lösung inkubieren;
5. einmal in Aqua dest. abspülen;
6. Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe führen;

7. kurz in Xylol tauchen und mit Entellan (Merck) eindecken.

Zudem wurden die Lammelarkörper kultivierter Typ-II Zellen mit der Tanninsäure-Polychromfärbung nach Mason et al. (100) dargestellt.

Durchführung:

1. dreimaliges Waschen der Kulturschalen mit PBS
2. Fixation mit 1,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH: 7,3 30 Minuten bei 4 °C
3. zweimaliges Waschen mit 3,4 % Saccharose in 0,1 M Cacodylatpuffer pH: 7,3
4. Postfixation mit 1 % Osmiumtetroxyd in 0,1 M Cacodylat pH: 7,3 90 Minuten bei 4 °C
5. dreimaliges Waschen mit 3,4 % Saccharose in 0,1 M Cacodylatpuffer pH: 7,3
6. Färbung mit 1 % Tanninsäure mit 0,1 M cacoylat pH: 6,8 bei 4 °C 16 h
7. zweimaliges Waschen mit 0,1 Cacodylat pH: 7,0, zweimaliges Waschen mit Aqua dest.
8. Gegenfärbung mit Polychromblau 19 Sekunden; Polychromrot 10 Sekunden
9. Waschen mit Aqua dest. Lagerung in 0,1 % Natriumacid

4.2.2 Vitalitätstests

Eine mit geringem Aufwand durchführbare Technik der Vitalitätsbestimmung beruht auf der Beobachtung, dass die Oberflächenmembran lebender Zellen die Fähigkeit besitzt, spezielle Substanzen auszuschließen, während avitale Zellen diese zum Zellinneren durchtreten lassen. Eine solche Substanz ist das Erythrosin B (2,5 mg in 100 ml PBS; Merck, Darmstadt), welche den Zellen im Verhältnis 1:100 zugemischt und 5 Minuten lang inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und Fluoreszenz-mikroskopisch unter Grünlichtanregung betrachtet. Die Zahl der leuchtenden und damit toten Zellen wurde sodann ermittelt und in Relation zu den vitalen, nichtleuchtenden Zellen gesetzt.

Alternativ dazu kann als optischer Vitalitätstest der Farbstoff 5-Carboxy-Fluorescin-diacetat den Zellen zugesetzt werden. Diese nicht-fluoreszierende Substanz ist membranpermeabel und wird durch intrazelluläre Esterasen zum fluoreszierenden, nicht membranabhängigen 5-Carboxy-Fluorescin hydrolisiert. Vitale Zellen leuchten daher unter Blaulichtanregung im Fluoreszenz-Mikroskop. Zur Vitalitätsbestimmung wurde eine Stammlösung von Farbstoff 5-Carboxy-Fluorescin-diacetat (1 mg/ml) 1:1000 verdünnt auf die Zellen gegeben. Nach einer 15-minutigen Inkubation wurden die Zellen gewaschen und die Anzahl der leuchtenden Zellen im Vergleich zu den nicht leuchtenden Zellen ermittelt.

Weiterhin konnte zur Bestimmung der Membranintaktheit der cytosolische Zellmarker Lactatdehydrogenase LDH aus dem Zellüberstand photometrisch bestimmt und quantifiziert werden.

4.2.3 Kultur der Alveolaren Epithelzellen

Im Anschluss an die Isolierung der Typ-II Zellen wurden diese unter dem Mikroskop mit Hilfe der Neubauer-Kammer gezählt und je 2 Millionen Zellen in 2 ml Kulturmedium in die Wells aufgebracht. Als Kulturmedium wurde DMEM-

Medium in oben genannter Zusammensetzung mit einem FCS Anteil von 10 % benutzt.

Die Zellkulturschalen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 19 %-iger CO_2-Atmosphäre inkubiert. 24 Stunden nach Aufbringen der Zellen wurde das Kulturschalensystem vorsichtig so geschüttelt, dass sich die in Lösung befindlichen bzw. noch nicht adhärenten Zellen gleichmäßig verteilten. 48 Stunden nach Isolation wurden die Mediumanteile durch frisches Kulturmedium ausgetauscht. Das alte Medium wurde mit der Pasteur-Pipette entfernt und mit Hilfe der Eppendorf-Pipette durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die wurde im Abstand von zwei Tagen wiederholt. Ab dem zweiten Tag nach Isolation wurden vor dem Versuchsbeginn die Kulturmedien erneut, diesmal aber durch ein Kulturmedium mit einprozentigem FCS-Anteil ersetzt.

4.2.4 Lactatdehydrogenase (LDH)- Messung

Die LDH-Freisetzung wurde als Marker für einen zytotoxischen Zellschaden der Epithelzellen nach der “optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie photometrisch bei einer Absorption von 405 nm gemessen. Die Enzymfreisetzung wurde dabei als Aktivität (U/l) gegenüber der maximalen Enzymaktivität, die bei Inkubation mit 10 µg/ml Mellitin (Bienengift) freigesetzt wurde, gemessen.

4.3 L2-Zellen

4.3.1 Herstellen von Kulturmedien

L2-Zellen Nährmedien wurden hergestellt aus 90 ml F12 K (mit Glutamin) + 10 ml 10 %-iger FCS (Fetales Kälber Serum) + 40 µl Gentamycin.

Typ-II Zellen Nährmedien wurden aus 88 ml DMEM (Dulbeco´s Modified Eagels Medium) + 10 ml FCS + 2 ml Glutamin + 100 µl Gentamycin hergestellt.

Die Kulturmedien wurden mit 10 %-igem FCS und die Versuchsmedien mit 1%-igem FCS hergestellt.

4.3.2 Auftauen von L2-Zellen

Die L2-Zellen liegen in Kryoröhrchen in jeweils 1 ml DMSO im Stickstoffbehälter.

Unter Kontrolle wurden die L2-Zellen aufgetaut, da unter aufgetauter Form das DMSO die Zellen schädigen würde. Im gefrorenen Zustand verhindert es jedoch die Verklumpung der Zellen.

Nach dem vorsichtigen Auftauen wurden 7,5 ml 10 %-iges Nährmedium im Falconröhrchen hinzugefügt, um die schädigende Wirkung von DMSO zu reduzieren und die Zellen mit Nährmedien zu versorgen. Diese Lösung wurde bei 1200 Umdrehung, 5 Minuten, bei 22°C, mit 30 Sekunden Anstiegszeit und 1 Minute Abstiegszeit zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pasteur-Pipette abgesaugt und verworfen, da es DMSO-haltig war. Auf das Pellet im Falconröhrchen kam erneut 10 %-iges Nährmedium, je 2,5 ml Lösung mit den Zellen kamen in eine Petrischale, die zusätzlich noch mit 7,5 ml 10 %-igem FCS-Nährmedium aufgefüllt wurden. Die Petrischalen wurden hin und her geschwenkt und bei 37 °C in den Brutschrank gelegt.

4.3.3 Splitten von L2-Zellen

Da sich die Zellen nach wenigen Tagen so geteilt haben, dass sie einen konfluenten Zellrasen in der Petrischale gebildet haben, wurden sie gesplittet (diese subkultivierten Zellen konnten dann in zwei Tagen, wenn sie wieder einen vollständigen Zellrasen gebildet hatten, in Versuchen eingesetzt werden). Dazu wurde das verbrauchte Nährmedium mit der Pasteur-Pippete abgesaugt. Die Zellen wurden dann mit 8 ml F 12 K Medium zweimal gewaschen. Anschließend wurde mit 8 ml temperierter Trypsin-EDTA Lösung für 30-60 Sekunden im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle, ob sich der Zellmonolayer vom Schalenboden losgelöst hat. Die Trypsin-EDTA Lösungen mit den losgelösten Zellen, nachdem die Zellen durch mehrmaligem Spülen losgelöst wurden, wurde dann in ein Falconröhrchen pipettiert, wo sich schon 1 ml temperierter FCS befand.

Die Lösung wurde bei 1200 Umdrehungen, 5 Minuten, bei 22 °C, Aufstiegszeit 30 Sekunden, Abstiegszeit 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pasteur-Pipette abgesaugt und bis 10 ml mit 10 %-igem FCS-Nährmedium aufgefüllt. In der Neubauerkammer wurden die Zellen gezählt. Dazu wurde 10 µl Zelllösung auf die Neubauerkammer pipettiert und abgezählt.

Diese Zahl wurde dann mit 2,5 und 10 000 (Nährmedium) multipliziert. Je nachdem, was für Versuche man in zwei Tagen plante, wurden sie in der gleichen Zellzahl, in den Wells der 6-er Platte gegeben und zu 2 ml mit Nährmedium aufgefüllt.

4.3.4 Einfrieren von L2-Zellen

Die Medien, die zum Einfrieren der L2-Zellen gebraucht wurden, setzten sich wie folgt zusammen: Medium 1 bestand zu 9 ml aus 10 %-igem Nährmedium und 1ml 0,2 mM Hepes.

Medium 2 bestand zu 4 ml Medium 1 und 1 ml DMSO, das steril abgefiltert wurde. Die Medien wurden vor Gebrauch ins Eis gelegt.

Der Überstand der Pellets aus einer 100-er Petrischale, die nach dem Zentrifugieren entstand, wurde mit der Pasteur-Pipette abgesaugt. Das Pellet wurde mit 0,5 ml Medium 1 resuspendiert und folgend mit 0,5 ml Medium 2 resuspendiert. Die 1 ml Lösungen wurden in spezielle Kryoröhrchen gefüllt. Diese Kryoröhrchen wurden 5 Minuten in Eis (~ +4 °C), 2-3 Stunden in das Gefrierfach (~-20 °C), 1-2 Tage in -80 °C Fach aufbewahrt, um dann anschließend in den Stickstoffbehälter (~ -170 °C) gelegt zu werden.

4.4 Die Bestimmung von MCP-1 aus den Zellüberständen

Die Bestimmung des in den Überstand freigesetzten MCP-1 wurde mit ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent-Assay) bestimmt.

4.4.1 Lösungen, Antikörper, Materialien für das MCP-1 ELISA:

- Maxisorp- Platten 96'Well
- IKA-Schüttler, IKA Werke GmbH (Staufen, Deutschland)
- Photometer
- Monoclonal, purified anti-rat MCP, 500 mg/ml (2,5 µg/ml), Pharmingen, Cat. no. 24011 DO
- Biotinylated anti-rat MCP-1, 0,5 mg/ml (1 µg/ml), Pharmingen Cat. no. 24022 D
- Waschpuffer: 0,05 % Tween in 20 mM Tris, pH:7,3

- Diluent: 0,1 % BSA, 0,05 % Tween in Tris-NaCl (20 mM Tris base + 150 mM NaCl), pH: 7,3
- Blockierungs-Lösung: 1 % BSA, 5 % Saccharose, 0,05 % NaN_3 in PBS
- HRP-Srept-Avidin: 2,5 µl auf 10 ml Diluent (1: 4000)
- ABTS: 14 mg ABTS auf 21 ml Substratpuffer, nur kurz vorher wurde 14 µl H_2O_2 zugegeben und die Falconflasche und die Platte in Alufolie gewickelt, da es hitzelabil ist.
- Substratpuffer: 8,2 g Na-Acetat-Trihydrat

  6,9 NaH_2 PO_4 x H_2O

  1000 ml Aqua dest.

  pH: 4,2

4.4.2 Durchführung der Messung

Die Bestimmung von MCP-1 dauerte ca. 12 Stunden und wurde in mehreren Schritten durchgeführt.

1. Coating: Die Platte wird mit Antikörpern, die gegen MCP-1 gerichtet sind, beschichtet.

   Hierbei wurden 50 µl „capture“-Antikörper mit 10 ml PBS bei pH: 7,4 verdünnt und je 100 µl (2,5 µg/ml) in jedes Well gegeben. Über Nacht wurde es abgedeckt bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit aus dem Wells ausgeschüttet und auf Papier ausgeklopft, um dann mit dem Waschpuffer gefüllt zu werden. Dies wurde dreimal wiederholt.

2. Blockieren: Die beschichteten Antikörper-Zwischenräume werden blockiert.

300 ml Blockierungspuffer wurden in jedes Well pipettiert und mindestens eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Infolgedessen wurden die Platten, wie oben beschrieben, dreimal gewaschen.

3. Inkubation der Proben: In die ersten 10 Wells wurde die verdünnte Standardreihe mit den Konzentrationen von 5000, 3333, 2000, 1000, 800, 500, 250, 125, 62,5 und 0 pg/ml hineingegeben. Die Proben wurden mit Diluentpuffer in verschiedenen Konzentrationen verdünnt und je 100 µl der Proben in die Wells zugegeben. Die Platten wurden auf dem Schüttler 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, danach dreimal gewaschen.

4. Inkubation des biotinylierten Antikörpers: Die Antikörperverdünnung mit der Konzentration 1 µg/ml wurde jeweils als 100 µl in die Wells gegeben und auf dem Schüttler bei Raumtemperatur ca. 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten dreimal gewaschen.

5. HRP-Inkubation: HRP-Streptavidin wurde 1:4000 verdünnt und je 100 µl in die Wells gegeben und bei Raumtemperatur bei 20 Minuten inkubiert, um anschließend wieder dreimal gewaschen zu werden.

6. Substrat-Inkubation: ABTS wurde wie oben beschrieben nach Anleitung angesetzt und 200 µl in die jeweilige Well gegeben. Die Inkubation erfolgte ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur.

7. Messung am Photometer: Die Platten wurden im Photometer bei 450 nm gemessen.

4.5 Messung von MIP-2 aus den Zellüberständen

Die Messung von MIP-2 aus dem Überstand der Zellen erfolgte über ein kommerzielles Assay-System von Cytoscreen™ (Cytoscreen™ Immunoassay Kit, Catalog # KRC 1022/KRC 1020-SB, Rat MIP-2)

4.5.1 Lösungen, Antikörper und Materialien für das MIP-2 ELISA

- raMIP-2 antibody-Coated Wells, 96 Wells per Plate.
- Plate Covers, adhesive strips.
- Wash Buffer Concentrate (25x), 100 ml per bottle.
- standard diluent Buffer. Contains 15 mM sodium azide; 25 ml per bottle.
- ra MIP-2 standard, recombinant raMIP-2.
- raMIP Biotin Conjugate, (Biotin-labeled anti-MIP-2). Contains 15 mM sodium azide; 6 ml per bottle.
- Streptavidin-Peroxidase (HRP) (100x) concentrate. Contains 3,3 mM thymol; 0,125ml per vial.
- Streptavidin-Peroxidase (HRP) Diluent. Contains 3,3 mM thymol; 25 ml per bottle.
- Stabilized Chromogen, Tetramethylbenzidine (TMB); 25 ml per bottle.
- Stop solution; 25 ml per bottle.

4.5.2 Durchführung der Messung

Da die mitgelieferten Platten schon mit dem Antikörper gegen MIP-2 beschichtet waren, begannen wir, direkt in die Wells der Platten die Standardreihe und unsere verdünnten Proben zu geben. Die Standartreihe erhielt folgende Konzentrationen: 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 pg/ml.

Hinzu kam je 50 µl Biotin-Ak in jedes Well, dies wurde durch leichtes Antippen an der Seite der Platte gemischt, abgedeckt und bei Raumtemperatur 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit der Waschlösung, die 1: 24 verdünnt wurde, 4-mal gewaschen, um anschließend pro Well 100 µl Sreptavidin-working Solution zu geben, dies wurde wiederum gemischt wie oben. Abgedeckt bei Raumtemperatur wurde die Platte 30 Minuten inkubiert.

Nachdem wir die Platten 4-mal erneut gewaschen haben, fügten wir je 100 µl Chromogen in den Wells. Die Proben wurden langsam blau. Die Platte wurde in grüne Tücher gewickelt und im Dunkeln ca. 20-30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Färbung gestoppt, indem 100 µl Stopp-Solution in die Wells gegeben wurde. Die blaue Färbung schlug in gelbe um.

Innerhalb 2 Stunden wurden die Platten im Photometer bei 450 nm gemessen.

4.6 Das Stretchgerät

4.6.1 Beschreibung des Stretchgerätes

Mit der Flexercell-Strain-Unit der amerikanischen Firma Flexcell International kann man durch mechanischen Reiz (Tension or Compression) die Zellen in Kultur unter Stress setzen.

Sie induziert eine biochemische Veränderung als Antwort auf einen angewendeten mechanischen Zug in Zellen u.a. von Muskeln, Knorpeln, Lungen, Herz, Haut und Knochen. Spezielle Sechs-Well-Schalen mit einem elastischen Boden werden auf eine Halterung (Basisplatte) im CO_2-Brutschrank gelegt. Mit computergesteuerten Ventilen wird der elastische Plattenboden mit Vakuum oder Druckluft bewegt.

4.6.2 FX-3000™ Flexercell® Strain Bestandteile

1. FX-3000™ Flex Central® System Controller mit Pentium 1 166 MHz CPU, 2 GB Festplatte, eine 1,44 MB Diskettenlaufwerk, 16 MB Arbeitsspeicher und Flexercell® Hardware.

2. 101 Key Tastatur

3. Maus

5. FlexSoft (Flexercell FX-3000 Software), Microsoft DOS und Microsoft Windows 3.11 installiert.

6. Hilfszubehör, wie z.B. Schrauben usw.

7. Flexercell Vakuum Basisplatte, Dichtungsring und Deckel für die elastischen Kultur-Platten

8. Flexercell System Drying Filter Vorrichtung

9. Einführende und Rausführende Vakuum-Schläuche

10. Wasserauffangbehälter, Water trap- p/n 150300

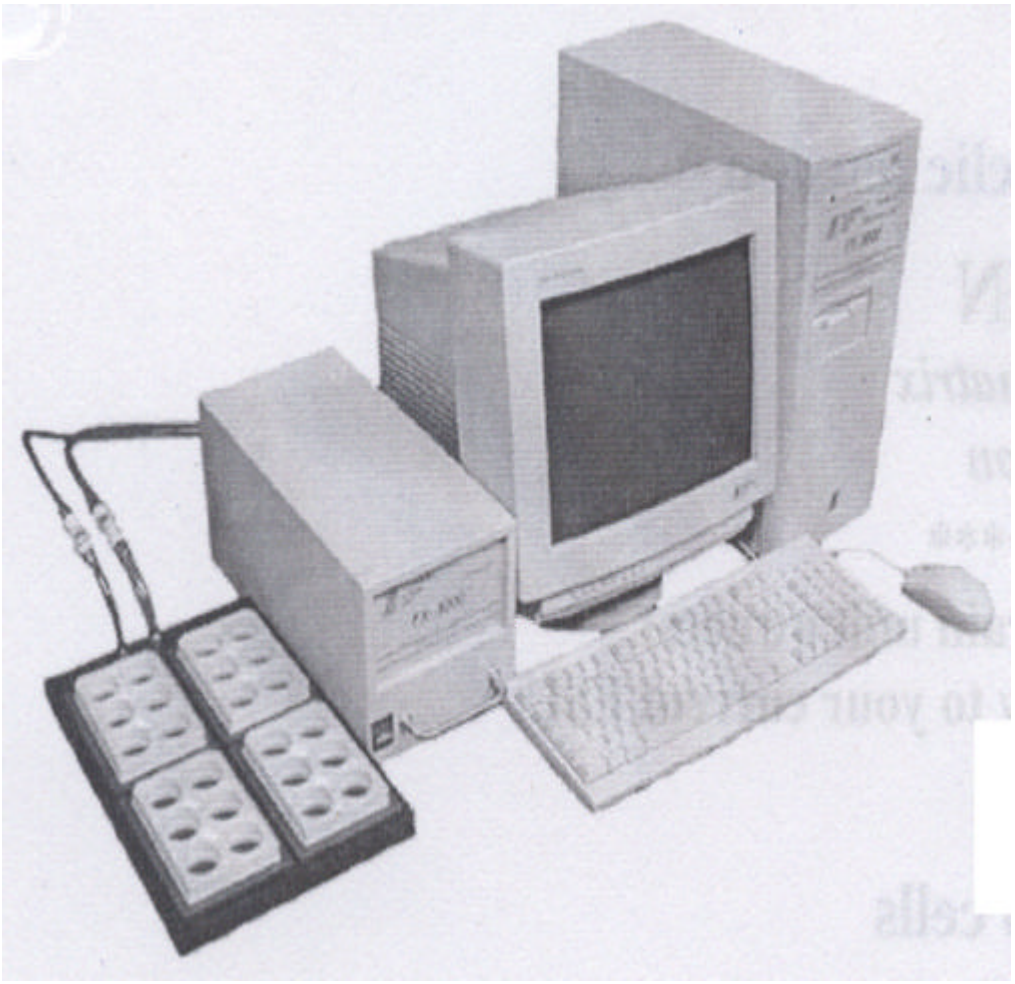


Abb. 4: Die Darstellung des Stretchgerätes (Flexercell International Corporation, FX- 3000™, Flexercell® Strain Unit v.3.2. Users Manual, S 22) Basisplatte mit den 4 speziellen 6-er Well Kultur Platten, Vakuum Pumpe, Monitor, Tastatur, Maus, Rechner.

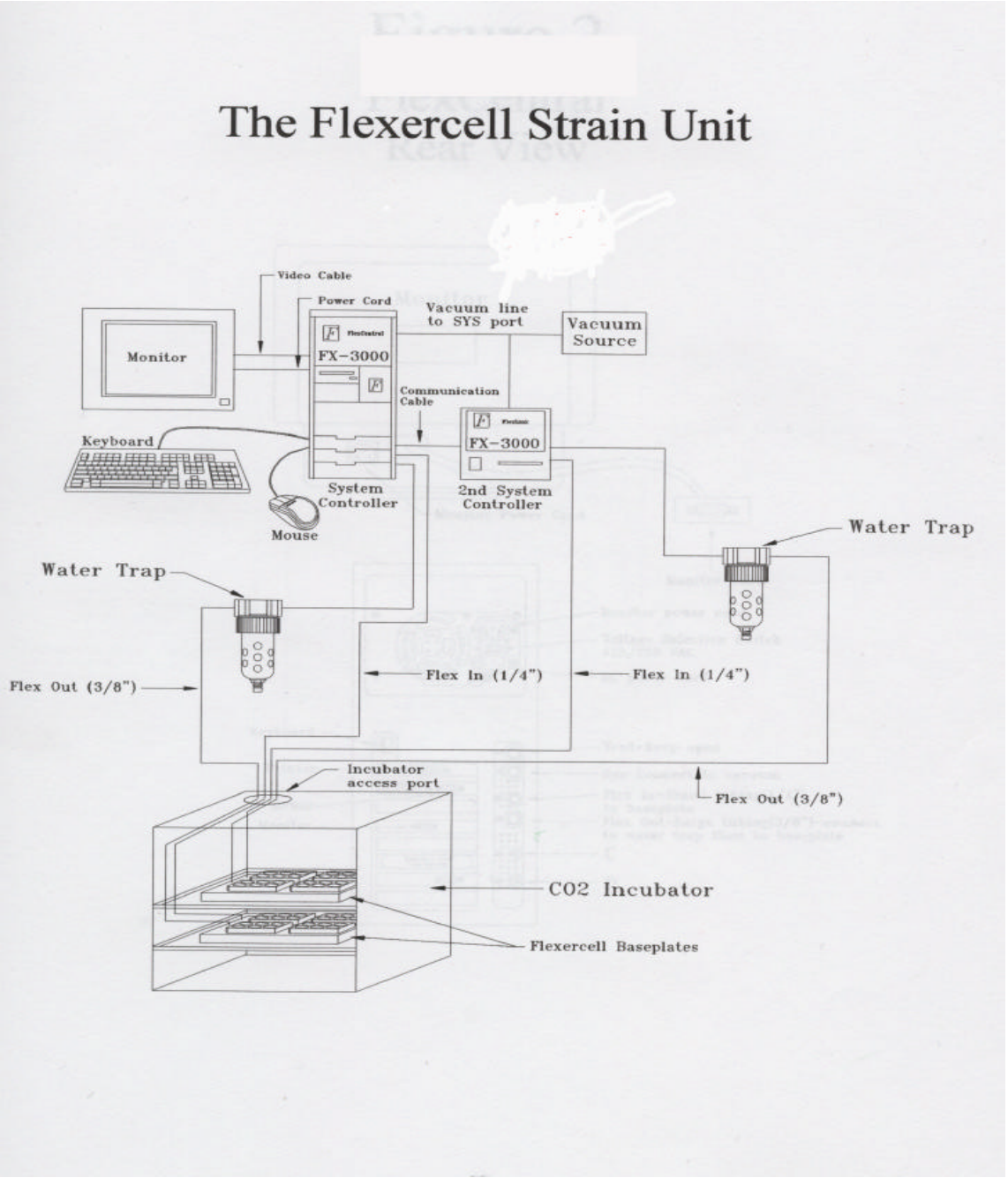


Abb. 5: Schematische Darstellung der Bestandteile des Stretchgerätes (Flexercell International Corporation, FX- 3000™, Flexercell® Strain Unit v.3.2. Users Manual, S 22).

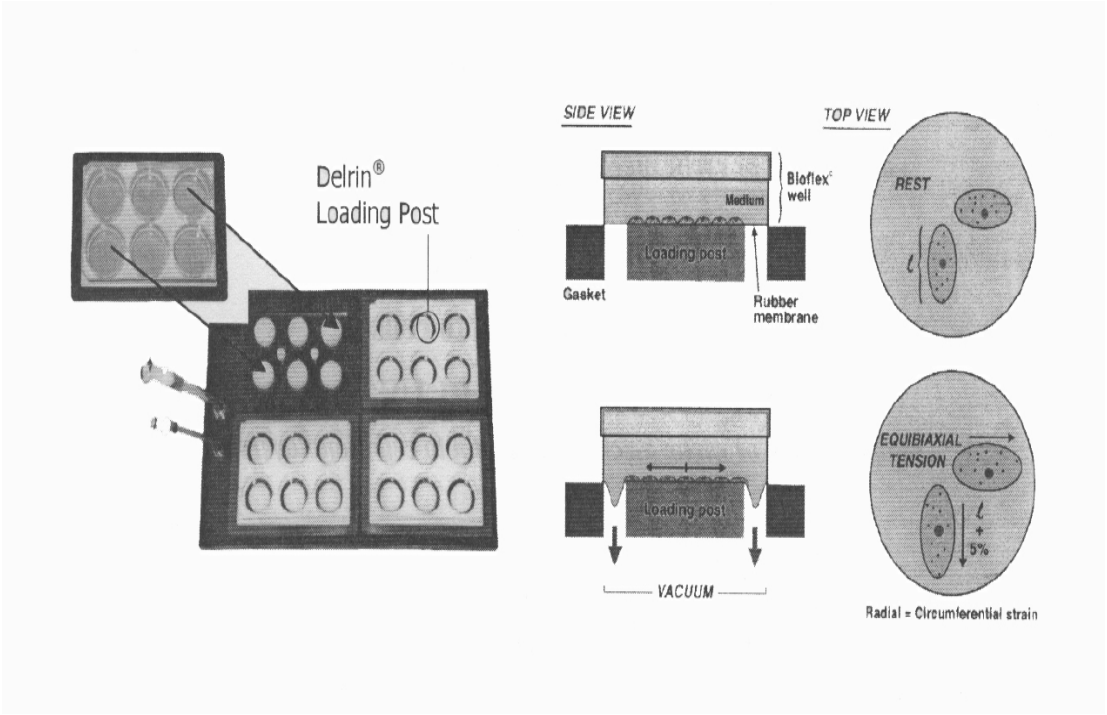


Abb. 6: Darstellung der Basisplatte mit den Speziellen 6-er Well Platten (Flexercell International Corporation, FX- 3000^{TM}, Flexercell® Strain Unit v.3.2. Users Manual, S 22). Der elastische Plattenboden wird mit Vakuum oder Druckluft bewegt. Auf diese Weise werden Zellen während des Wachstums unter lebensverwandten Stress ausgesetzt.

4.7 Statistische Auswertungen der dargestellten Ergebnisse

Die Erfassung und die deskriptive und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Microsoft EXCEL. Deskriptiv wurden die Daten mit Hilfe von Säulendiagramm, Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Die vergleichende statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS für Windows Version 11. durchgeführt. Der Einfluss des Stretches getrennt nach Stimmulationsart bei 24h-Wert wird mit Hilfe des t-Testes für abhängige Stichproben beurteilt.

Eine Wechselwirkung von Stimulation und Stretch bzw. ein additiver Effekt der Zugabe von LPS auf die Zytokinfreisetzung wird mit Hilfe der 2-faktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen getestet.

Die Datenanalyse hat explorativen Charakter, Kriterium für die Beibehaltung bzw. Ablehnung der jeweiligen Nullhypothesen ist die berechnete Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art „p“, die im Ergebnissteil jeweils angegeben wird.

5. Ergebnisse

Die Versuche ergaben folgende Ergebnisse:

Die nach den Versuchen durchgeführte LDH-Messung an den beiden Zellarten zeigte, dass die Stretchintensität, die wir ausgewählt hatten, nicht zu einer höheren Zellschädigung führt als nicht gestretchte Zellen.

Stretch d.h. mechanischer Stress, führt bei Typ-II Zellen und L2-Zellen zu einer Erhöhung der Chemokinfreisetzung nach 24 Stunden und zwar von MCP-1 und MIP-2.

Bei Inkubationen mit LPS haben die gestretchten Typ-II Zellen und L2-Zellen im Vergleich zu den nicht gestretchten Zellen eine höhere Cytokinausschüttung aufgewiesen. Die aus Ratten isolierte Typ-II Zellen und die L2-Zellen aus einer Tumorzellienie ergaben ähnliche Ergebnisse.

5.1 Stretchversuche führen nicht zu einer erhöhten Zellschädigung bei L2-Zellen

Die LDH-Freisetzung wurde als Marker für einen zytotoxischen Zellschaden der Epithelzellen nach der „optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie“ photometrisch bei einer Absorption von 340 nm gemessen. Die Enzymfreisetzung wurde dabei als Aktivität (U/l) der jeweiligen Probe im Vergleich zur Kontrolle (Zellen ohne Behandlung) ausgedrückt.

Die gewählten Stretchintensitäten und die Zeitdauer haben keinen erwähnenswerten Effekt auf die Zellschädigung gezeigt (Abb. 7). Die LDH-Werte der L2-Zellen sind nach 2 Stunden und 24 Stunden mit oder ohne Stretch im gleichen Level. Man sieht eine deutliche Zunahme der LDH-Freisetzung, wenn man den Zellmonolayer Mellitin hinzufügt: es kommt zu einer Zellschädigung mit vermehrter LDH-Freisetzung.

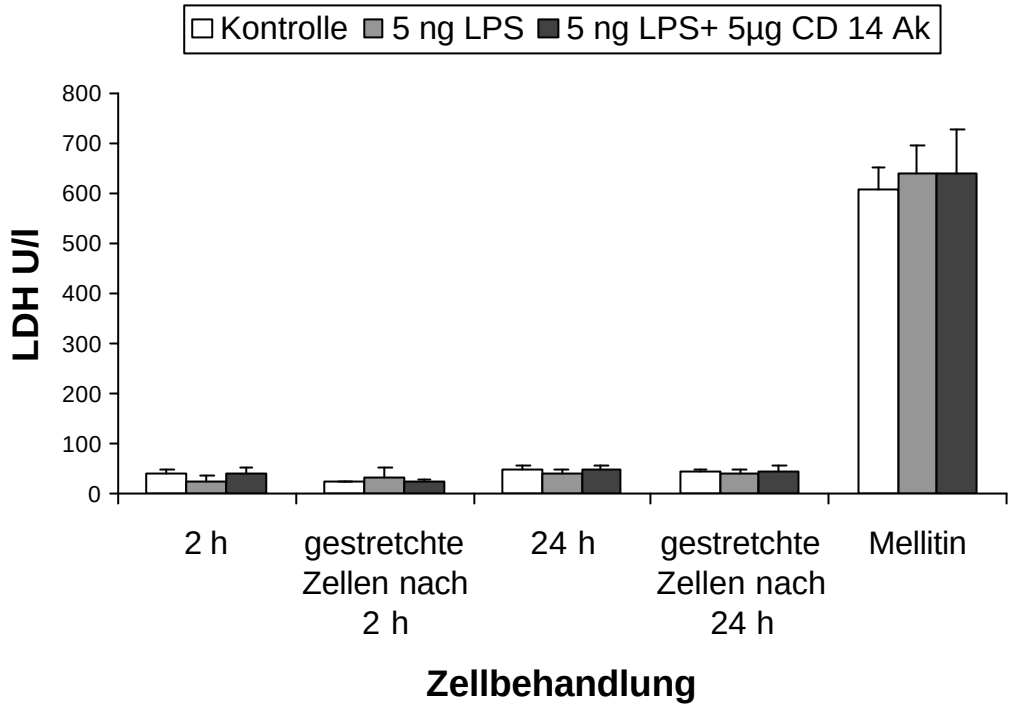


Abb. 7: L2-Zellen, Zytotoxische Wirkung in Abhängigkeit von Stretch (n = 10) *LDH-Werte bei verschiedenen Zellbehandlungen zur Bestimmung der Zellschädigung. Die LDH-Freisetzung wurde als Marker für einen zytotoxischen Zellschaden der Ephithelzellen nach der „optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie photometrisch bei einer Absorption von 340 nm gemessen. Die Enzymfreisetzung wurde dabei als Aktivität (U/l) der jeweiligen Probe im Vergleich zur Kontrolle (Zellen ohne Behandlung) ausgedrückt. Dabei wurden 750 µl LDH-Lösung + 12,5 µl Probenlösung zusammengegeben und gemessen. Die Proben entstammen aus den Überständen der Zellen mit den jeweiligen oben genannten Zellbehandlungen. Melittin, ein Peptid, Hauptbestandteil des Bienengiftes, wurde kurz vorher in der Konzentration von 100 µg/ml auf die Zellen gegeben, bevor der Überstand entnommen wurde.*

5.2 Stretchversuche führen nicht zu einer erhöhten Zellschädigung bei Typ-II Zellen

Die LDH-Freisetzung wurde als Marker für einen zytotoxischen Zellschaden der Epithelzellen nach der “optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie“ photometrisch bei einer Absorption von 340 nm gemessen. Die Enzymfreisetzung wurde dabei als Aktivität (U/l) ausgedrückt. Dabei wurden 750 µl LDH-Lösung + 12,5 µl Probenlösung zusammengegeben und gemessen. Die Proben entstammen den Überständen der Zellen mit den jeweiligen Zellbehandlungen.

Melittin, ein Peptid, der Hauptbestandteil des Bienengiftes, wurde kurz vorher in der Konzentration von 100 µg/ml auf die Zellen gegeben, bevor der Überstand entnommen wurde.

Die gewählten Stretchintensitäten und die Zeitdauer haben keinen erwähnenswerten Effekt auf die Zellschädigung. Die LDH-Werte der Typ-II Zellen sind nach 2 Stunden und 24 Stunden mit oder ohne Stretch im gleichen Level. Man sieht eine deutliche Zunahme der LDH-Freisetzung, wenn man dem Zellmonolayer Mellitin hinzufügt: es kommt zu einer Zellschädigung mit vermehrter LDH Freisetzung.

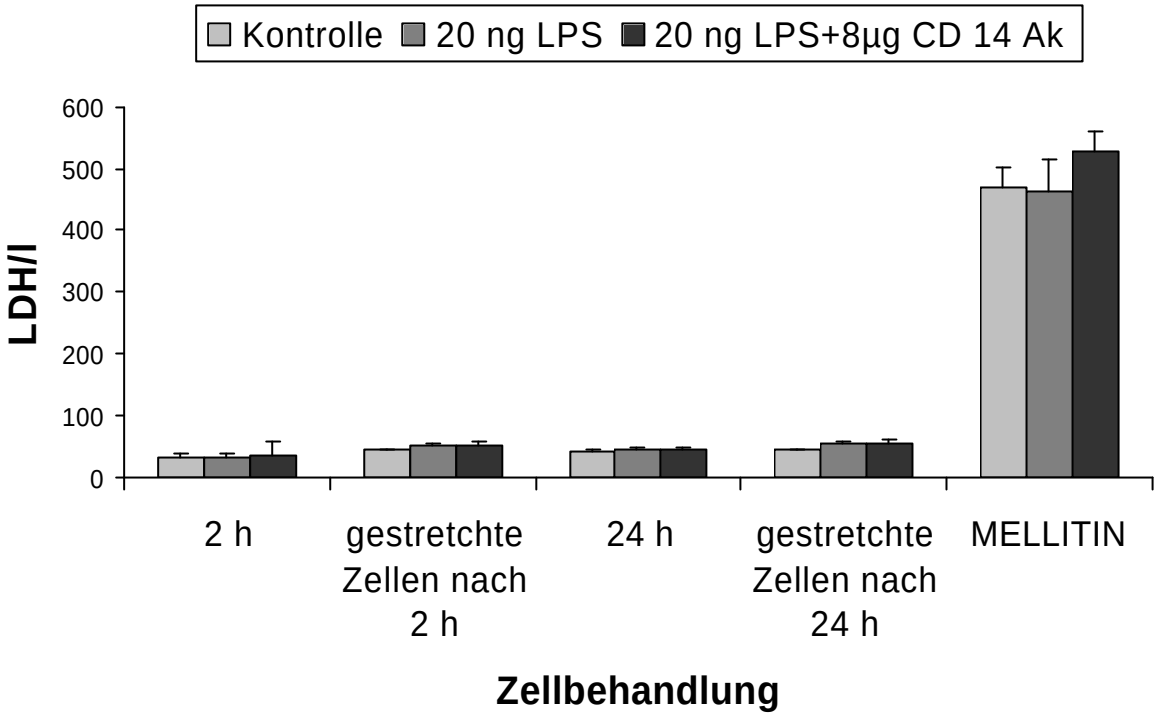


Abb. 8: **Typ-II Zellen, LDH-Werte bei verschiedenen Zellbehandlungen (n = 4)**

Die LDH-Werte bei verschiedenen Zellbehandlungen, zur Bestimmung der Zellschädigung. Die LDH-Freisetzung wurde als Marker für einen zytotoxischen Zellschaden der Epithelzellen nach der „optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie“ photometrisch bei einer Absorption von 340 nm gemessen. Die Enzymfreisetzung wurde dabei als Aktivität (U/l) der jeweiligen Probe im Vergleich zur Kontrolle (Zellen ohne Behandlung) ausgedrückt. Dabei wurden 750 µl LDH-Lösung + 12,5 µl Probenlösung zusammengegeben und gemessen. Die Proben entstammen aus den Überständen der Typ-II Zellen mit den jeweiligen, oben genannten Zellbehandlungen. Melittin, ein Peptid, der Hauptbestandteil des Bienengiftes, wurde kurz vorher in der Konzentration von 100 µg/ml auf die Zellen gegeben, bevor der Überstand entnommen wurde.

5.3 LPS abhängige Freisetzung von MCP-1 bei L2-Zellen

In diesem Versuch sollte dargestellt werden, inwieweit sich zeit- und dosisabhängige LPS auf die Freisetzung von MCP-1 bei L2-Zellen auswirkt.

Ca. 1 Million L2-Zellen pro Well wurden 24 Stunden lang inkubiert und anschließend mit verschiedenen LPS-Konzentrationen von 0/0,1/1/5/10/50 ng/ml inkubiert; in verschiedenen Zeitabständen von 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden die MCP-Werte aus den Überständen gemessen (Abb. 9)

Bei 0 ng/ml LPS sieht man zeitunabhängig keine Steigerung des MCP-1 Wertes.

LPS-Konzentrationen von 5/10/50 ng/ml führten zeit- und dosisabhängig zu einer Erhöhung der MCP-1 Werte.

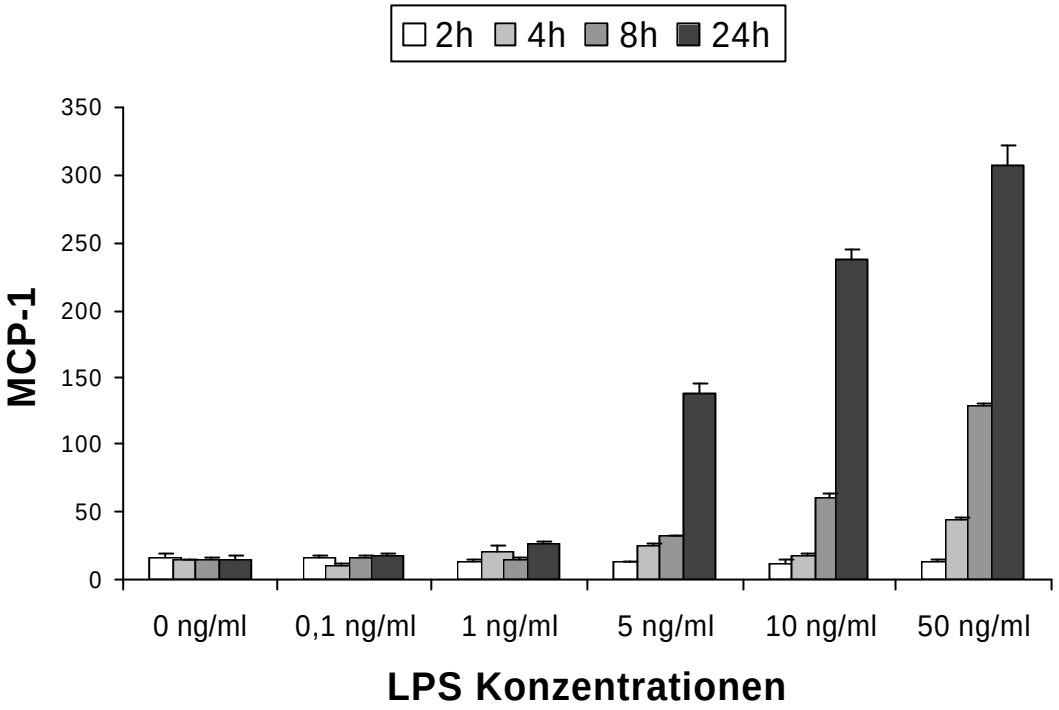


Abb. 9: Zeit-Dosis-Kurve der LPS-abhängigen Freisetzung von MCP-1 bei L2-Zellen (n = 4)

Zeit-Dosis-Kurve von L2-Zellen mit verschiedenen LPS-Konzentrationen, gemessen wurde in verschiedenen Zeitabständen das Chemokin MCP-1. Ca. 1 Million L2-Zellen pro Well wurden 24 Stunden lang inkubiert und anschließend mit verschiedenen LPS-Konzentrationen von 0/0,1/1/5/10/50 ng/ml inkubiert; in verschiedenen Zeitabständen von 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden die MCP-Werte aus den Überständen gemessen.

5.4 Stretch führt zu einer Erhöhung der MCP-1 Freisetzung bei L2-Zellen

In diesem Versuch wollten wir ausfindig machen, ob sich Stretch auf die Cytokinfreisetzung auswirkt. Pro Well wurden ca. 1 Million L2-Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht. Nach 2 Stunden und 24 Stunden wurde jeweils aus dem Wells der Überstand entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen (Abb. 10). Bei dem Kontrollwert sieht man keinen signifikanten Unterschied, bei der Freisetzung von MCP-1 zwischen gestretchten und ungestretchten Zellen. In den 24 Stunden-Wert zeigt sich eine deutliche Zunahme der MCP-1 Freisetzung bei den gestretchten Zellen.

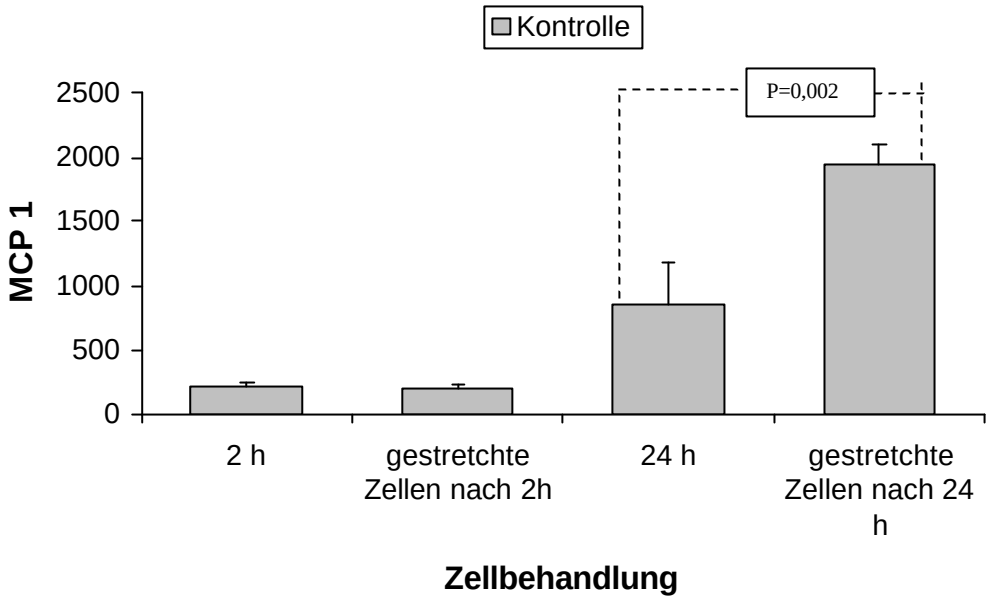


Abb. 10: L2-Zellen, MCP-1 Freisetzung bei Stretch (n = 4)

MCP-1 Freisetzung von L2-Zellen mit und ohne Stretch. Pro Well wurden ca. 1 Million L2-Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht. Nach 2 Stunden und 24 Stunden wurde jeweils aus den Wells der Überstand entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen.

5.5 Stretch führt zu einer Erhöhung der MCP-1 Freisetzung bei Typ-II Zellen

In diesem Versuch wollten wir herausfinden, ob sich Stretch auch auf die Cytokinfreisetzung von Typ-II Zellen auswirkt.

Pro Well wurden ca. 5 Millionen Typ-II Zellen über 48 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurde jeweils aus dem Wells der Überstand entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die LDH-Werte (Abb. 8) und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen (Abb. 11).

Man erkennt, dass in den ersten Stunden des mechanischen Stresses keine Unterschiede in der MCP-1 Freisetzung zu sehen ist.

Bei den 24 Stunden-Wert ist eine deutliche Zunahme des MCP-1 Wertes bei Stretch zu sehen.

Wir entschieden uns deshalb, für die weiteren Versuche den 2 Stunden-Wert und den 24 Stunden-Wert zu messen.

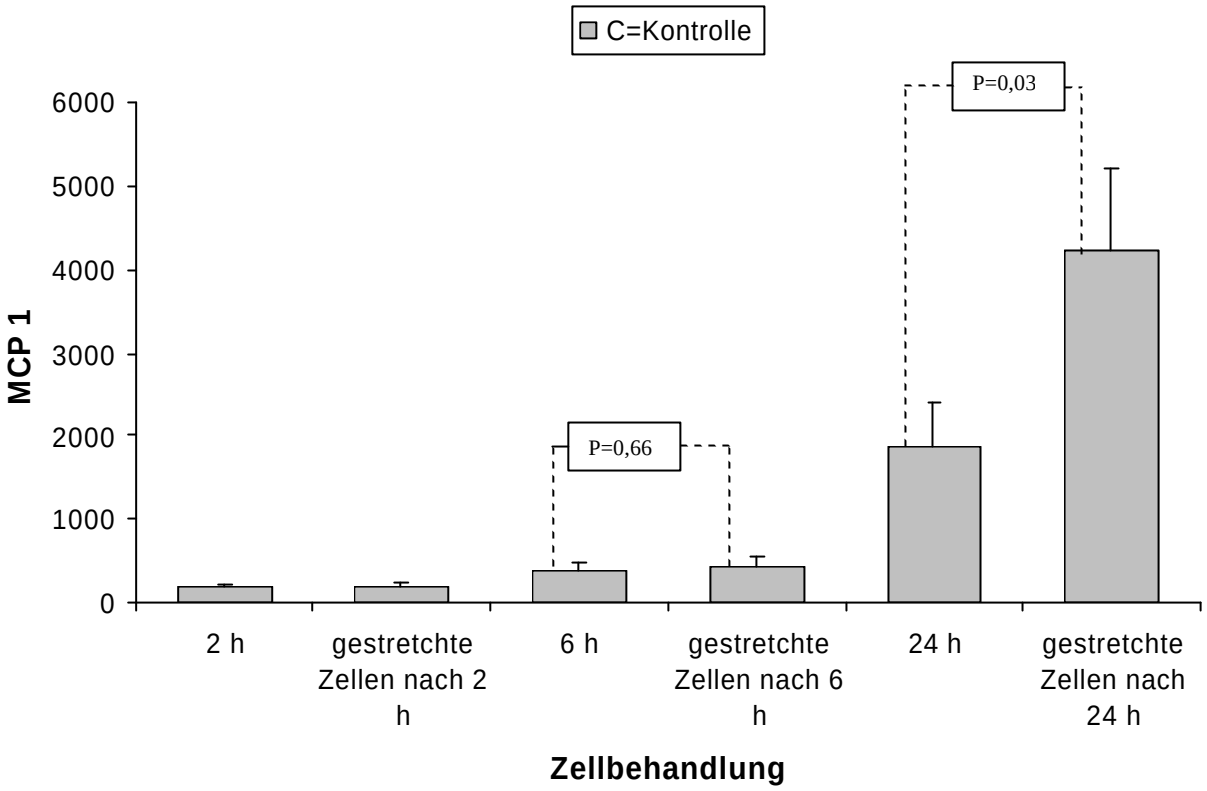


Abb. 11: MCP-1 Freisetzung mit Stretch sowie ohne Stretch bei Typ-II Zellen (n = 4).

MCP-1 Freisetzung von Typ-II Zellen mit und ohne Stretch. Pro Well wurden ca. 5 Millionen Typ-II Zellen über 48 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 12 %, 12-mal die Minute gestretcht. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen.

5.6 Stretch mit LPS führt zu einer höheren Freisetzung von MCP-1 bei L2-Zellen

Die Fragestellung lautete: Da sich Stretch auf die L2-Zellen durch Erhöhung der MCP-1 Freisetzung auswirkt, wie wirkt sich die MCP-1-Freisetzung von L2-Zellen in Kombination mit Stretch und LPS, einem Stimulus für eine Inflammation, z.B. bei beatmeten Patienten in der Intensivmedizin, die eine Infektion der Lunge haben bzw. bekommen.

Pro Well wurden ca. 1 Million L2-Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht und in die jeweiligen Wells wurde LPS in einer Konzentration von 5 ng/ml hinzugegeben. Nach 2 Stunden und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte (Abb. 7) und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen (Abb. 12).

Auch hier sieht man bei den 2 Stunden-Werten keinen signifikanten Unterschied bei der MCP-1 Freisetzung der L2-Zellen. Bei den 24 Stunden Werten maß man bei den ungestretchten Zellen mit LPS-Kontamination, wie erwartet, eine Erhöhung der MCP-1 Freisetzung. Bei den gestretchten Zellen sieht man aber eine deutlich vermehrte Freisetzung der MCP-1 Werte.

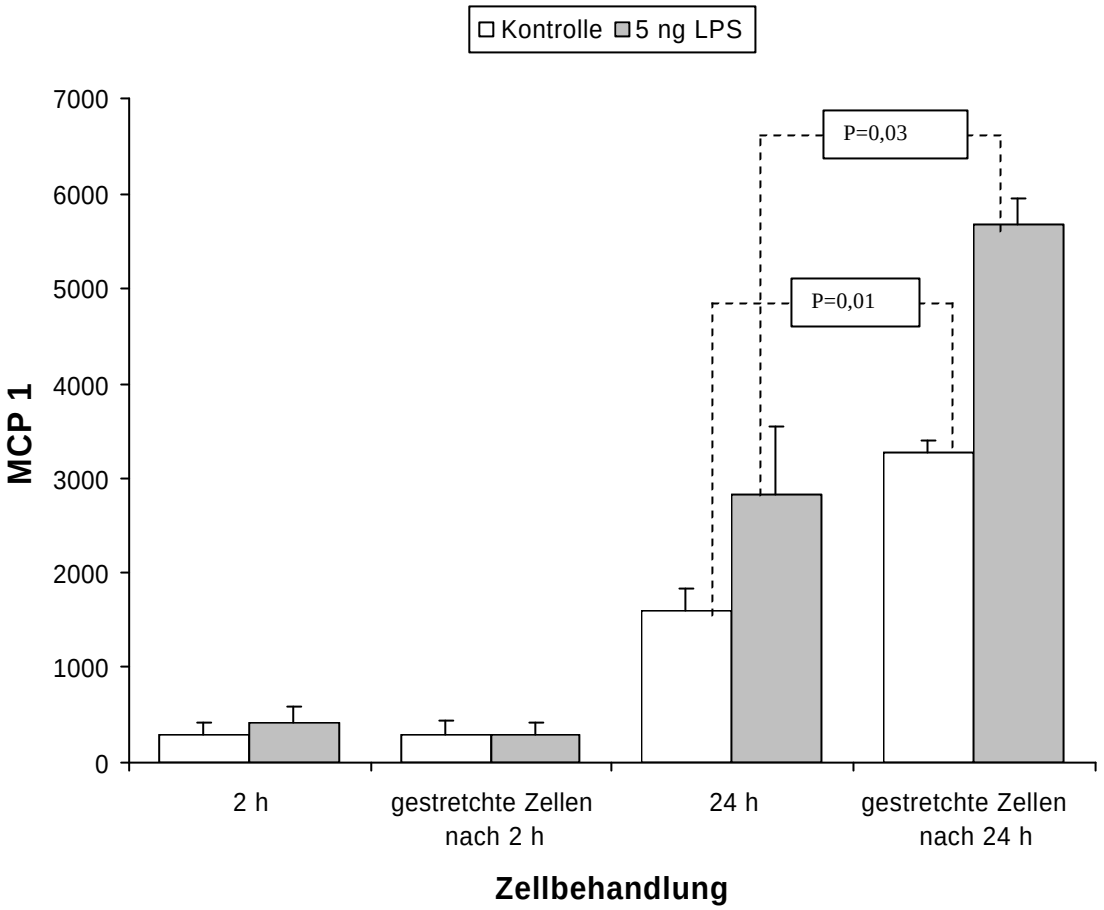


Abb. 12: L2-Zellen, Freisetzung von MCP-1 in Anwesenheit von LPS sowie mit und ohne Stretch (n = 3)

MCP-1 Freisetzung von L2-Zellen in Anwesenheit von LPS und mit und ohne Stretch. Pro Well wurden ca. 1 Million L2-Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht und in die jeweiligen Wells wurde LPS, ein Stimulus für eine Inflammation in einer Konzentration von 5 ng/ml hinzugegeben. Nach 2 Stunden und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen.

5.7 Stretch mit LPS führt zu einer höheren Freisetzung von MCP-1 bei Typ-II Zellen

Die Fragestellung lautete: Da sich Stretch auf die Typ-Zellen durch Erhöhung der MCP-1 Freisetzung auswirkt, wie wirkt sich die MCP-1-Freisetzung von Typ-II Zellen in Kombination mit Stretch und LPS, einem Stimulus für eine Inflammation, z.B. bei beatmeten Patienten in der Intensivmedizin, die eine Infektion der Lunge haben bzw. bekommen, aus?

Pro Well wurden ca. 5 Million Typ-II Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 12 %, 12-mal die Minute gestretcht und in die jeweiligen Wells wurde LPS in einer Konzentration von 5 ng/ml hinzugegeben. Nach 2 Stunden und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen (Abb. 13).

Auch hier sieht man bei den 2 Stunden-Werten keinen signifikanten Unterschied bei der MCP-1 Freisetzung der Typ-Zellen. Bei den 24 Stunden maß man bei den ungestretchten Zellen mit LPS-Kontamination, wie erwartet, eine Erhöhung der MCP-1 Freisetzung. Bei den gestretchten Zellen sieht man aber eine deutlich vermehrte Freisetzung der MCP-1 Werte.

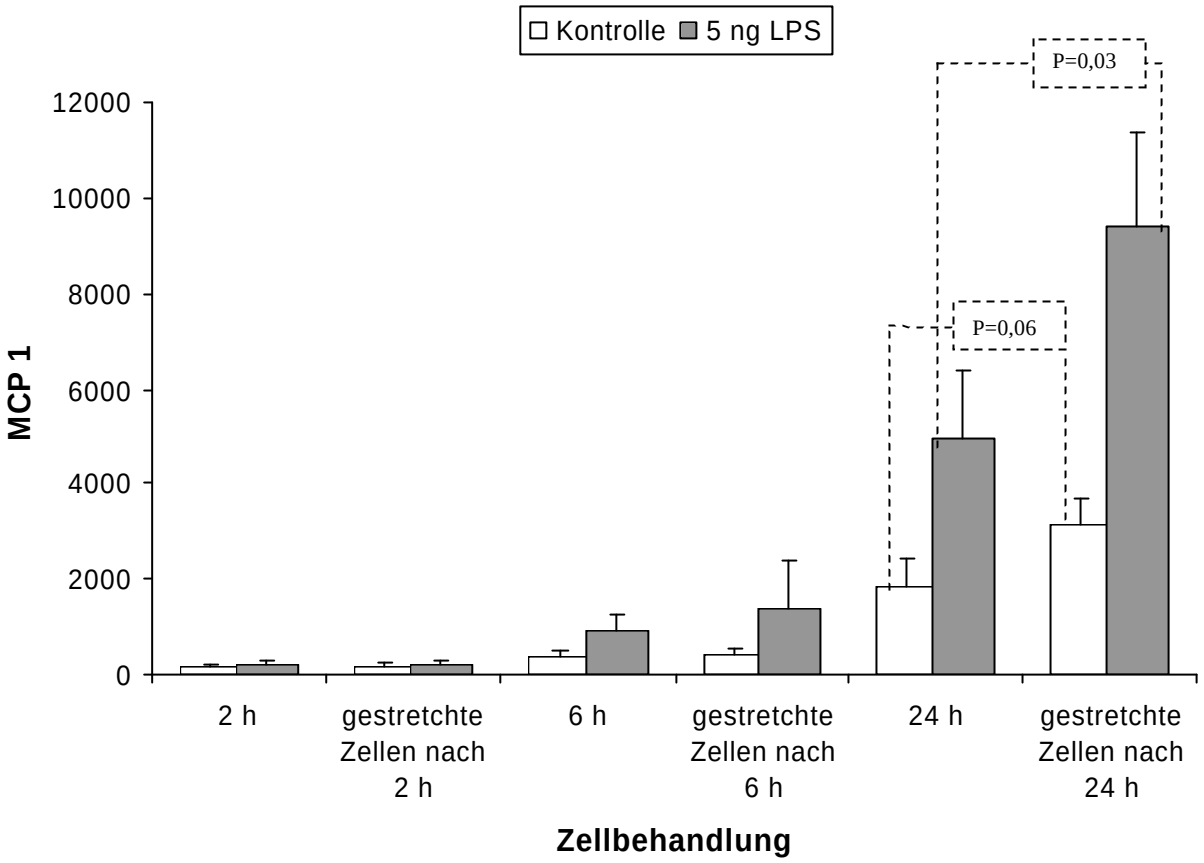


Abb. 13: Typ-II Zellen, Freisetzung von MCP-1 in Anwesenheit von LPS sowie mit und ohne Stretch (n = 4)

MCP-1 Freisetzung von Typ-II Zellen in Anwesenheit von LPS und mit und ohne Stretch. Pro Well wurden ca. 5 Millionen Typ-II Zellen über 48 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 12 %, 12-mal die Minute gestretcht und in die jeweiligen Wells wurde LPS in einer Konzentration von 5 ng/ml hinzugegeben. Nach 2 Stunden und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin, Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen.

5.8 Anti CD-14-Ak führt nicht zu einem vollständigen Rückgang der Cytokinfreisetzung bei L2-Zellen

Das 55 kDa große Glykoprotein CD-14 führt zu einer sekretorischen Antwort nach Interaktion mit LPS. CD-14 existiert in einer löslichen Serumform (sCD-14) und einer membrangebundenen Form (mCD-14).

Das Ankoppeln von LPS an den mCD-14 Rezeptoren monozytärer Zellen führt zur Synthese und Freisetzung von Cytokinen. Das Andocken von LPS wird von dem Serumfaktor Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (LBP) beeinflusst und moduliert. Dieses 60 kDa Glykoprotein ist in humanem Serum in einer Konzentration von 5-10 mg/ml vorhanden. Während der Akut-Phasen Antwort steigt dieser Level bis auf das 20-fache an (22). LBP bildet mit LPS hochaffine Komplexe, welche durch CD-14 erkannt werden. Die Relevanz von LBP bei der LPS-vermittelten Wirkung wurde dadurch gezeigt, dass Anti-LBP den Endotoxinschock, ausgelöst durch geringe LPS-Konzentration, bei Mäusen verhindern konnte (23).

Die Gabe von Anti-CD-14 konnte die LPS-Rezeptor-Kopplung und Zytokinausschüttung an Monozyten bei niedriger LPS-Konzentration verhindern, diese Hemmung wurde durch hohe Konzentrationen von LPS aufgehoben, was die Existenz von mCD-14 unabhängigen Rezeptortypen möglich erscheinen lässt; LPS könnte an einem anderen Rezeptor als mCD-14 ankoppeln oder aber internalisiert werden und mit einem intrazelluläreren Rezeptor interagieren (24). Seit kurzer Zeit ist die Existenz eines so genannten Toll-like-Rezeptor nachgewiesen, der in seiner chemischen Struktur dem IL-1-Rezeptor ähnelt (deshalb auch synonym: IL-1-like-Rezeptor). Diesem neu entdeckten Rezeptor wird eine hohe Affinität gegenüber dem LPS zugeschrieben; man vermutet, dass das LPS auch über diese Rezeptorklasse, ebenfalls unter Interaktion mit CD-14, Wirkungen entfalten und Signaltransduktionskaskaden auslösen kann. In dieser Richtung sind aber noch umfangreiche Forschungsarbeiten zu leisten, um die Funktion des Toll-like-Rezeptors abschließend beurteilen zu können (25).

Wie bei mCD-14 kann auch die Bindungskapazität von sCD-14 durch LBP erhöht werden (26), die sCD-14-LPS Komplexe können Zellen, die nicht über einen membrangebundenen CD-14 Rezeptor verfügen, wie glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Ephithelzellen, zur Ausschüttung von Mediatoren stimulieren (27).

Die Existenz eines Rezeptors, der diese löslichen LPS-sCD-14–Komplexe an mCD-14 negativen Zellen erkennt, wird postuliert, ist aber nicht erwiesen.

Insgesamt ist festzustellen, dass der Wirkungsmechanismus der zellulären Antwort nach LPS-Kontakt noch nicht hinreichend und abschließend erforscht ist. Aufgrund zahlreicher Besonderheiten, sowohl die unterschiedlichen Zellarten als auch unbekannte Regelkreise intrazellulärer Signaltransduktionswege betreffend, ist die Interaktion von LPS mit biologischen Zellsystemen sehr komplex und variabel und damit schwer definitiv nachvollziehbar.

In unserem Versuch konnten wir die Wirkung von LPS auf die Cytokinfreisetzung der Zellen *in vitro* mit CD-14-Ak nicht vollständig unterdrücken.

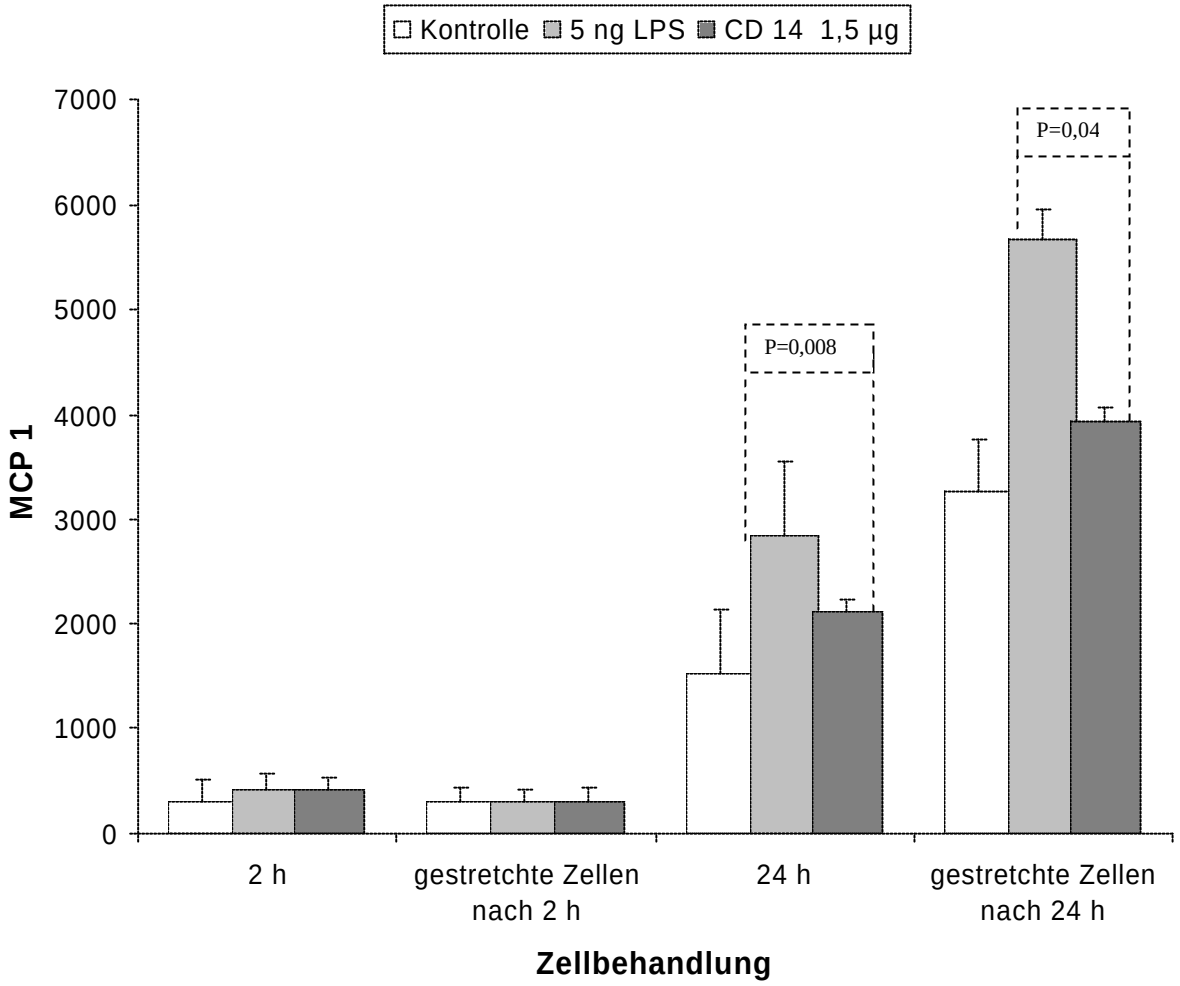


Abb. 14: L2-Zellen, MCP-1 Freisetzung bei Stretch, sowie mit LPS und CD-14-Ak (n = 3)

L2-Zellen, MCP-1 Freisetzung bei Stretch, sowie mit LPS und CD-14-Ak. Pro Well wurden ca. 1 Million L2-Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht und in die jeweiligen Wells wurde LPS in einer Konzentration von 5 ng/ml hinzugegeben. In den jeweiligen Wells kamen zu dem LPS noch 1,5 µg CD-14-Ak. Nach 2 und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen.

5.9 Anti CD-14-Ak führt nicht zu einem vollständigen Rückgang der Cytokinfreisetzung bei Typ-II Zellen

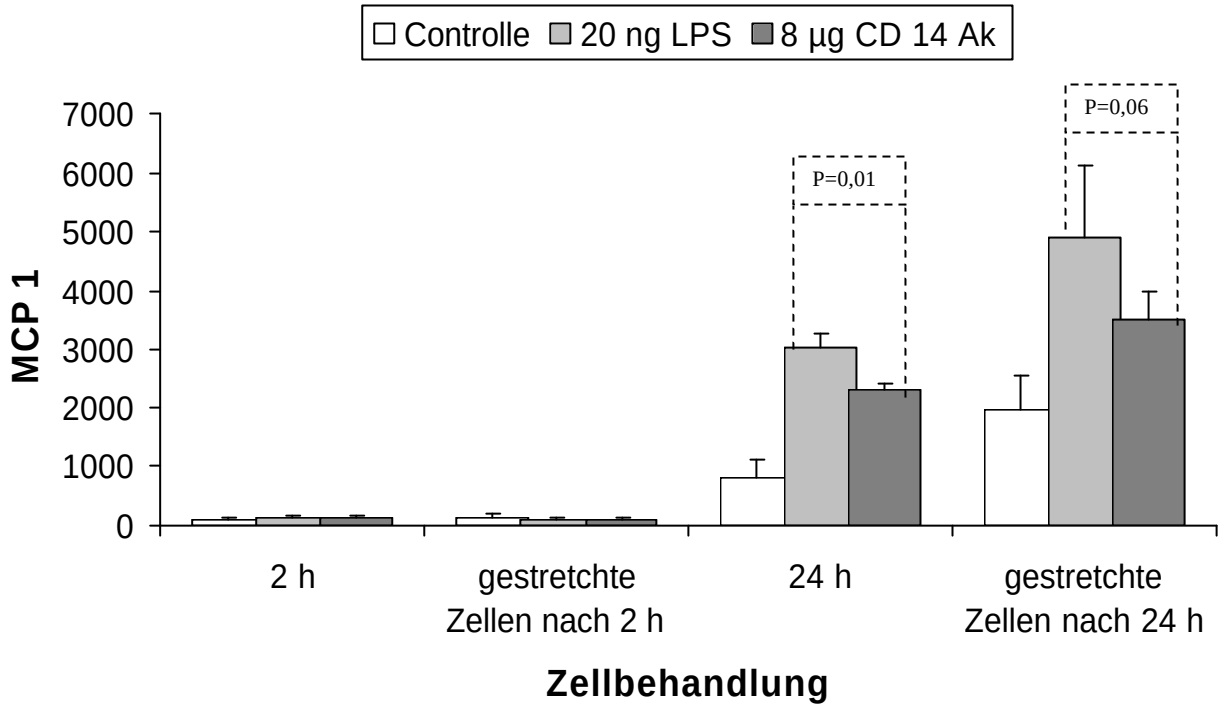


Abb. 15: Typ-II Zellen, MCP-1 Freisetzung in Anwesenheit von LPS und CD 14-Ak sowie mit und ohne Stretch (n = 4)

Pro Well wurden ca. 5 mill Typ-II Zellen über 48 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 12 %, 12-mal die Minute gestretcht und in die jeweiligen Wells wurde LPS in einer Konzentration von 20 ng/ml hinzugegeben. In den jeweiligen Wells kamen zu dem LPS noch 8 µg CD-14-Ak. Nach 2 und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen.

5.10 TNF-Ak führt nicht zu einem vollständigen Rückgang der Cytokinfreisetzung bei L2-Zellen

1975 wurde das erste Mitglied des TNF Systems, das TNF-a isoliert. Neben den zytotoxischen Eigenschaften besitzt TNF-a vor allem proinflammatorische Aktivität. (141). Die zugehörigen Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 binden neben TNF-a auch LTa-Homotrimere. Beide TNF-Rezeptoren werden werden ubiquitär exprimiert. Einzige Ausnahme sind Erytrozyten. Die zytotoxische Wirkung von TNF-a auf Tumorzellen *in vitro* sowie die Induktion hämorrhagischer Nekrosen in transplantierten Tumoren im Tierversuch weckte zunächst die Hoffnung, eine neue Tumortherapie gefunden zu haben. Die hohe Toxizität auch für gesunde Gewebe, die ubiqutäre Expression der zugehörigen Rezeptoren sowie vielfältige andere biologische Effekte ließen bald erkennen, dass TNF-a die zunächst geweckten Erwartungen nicht erfüllen würde. Stattdessen wurde TNF-a aufgrund seiner Wirkungen auf das Endothel mit der Pathogenesse des endotoxischen Schocks in Verbindung gebracht. TNF-a bewirkt hier die Freisetzung von Platelet Aggregating Factor (PAF), Adhäsionsmolekülen sowie diversen Zytokinen.

Direkte Folgen davon sind eine erhöhte Gefäßpermeabilität, antikoagulierende Aktivität und Leukozytenadhäsionen (140, 142).

In diesem Versuch konnten wir zeigen, dass durch Zugabe von TNF-a-Ak die MCP-1 Ausschüttung bei gestretchten sowie bei nicht gestretchten Zellen, *in vitro* nicht vollständig unterdrückt werden konnte (Abb. 16).

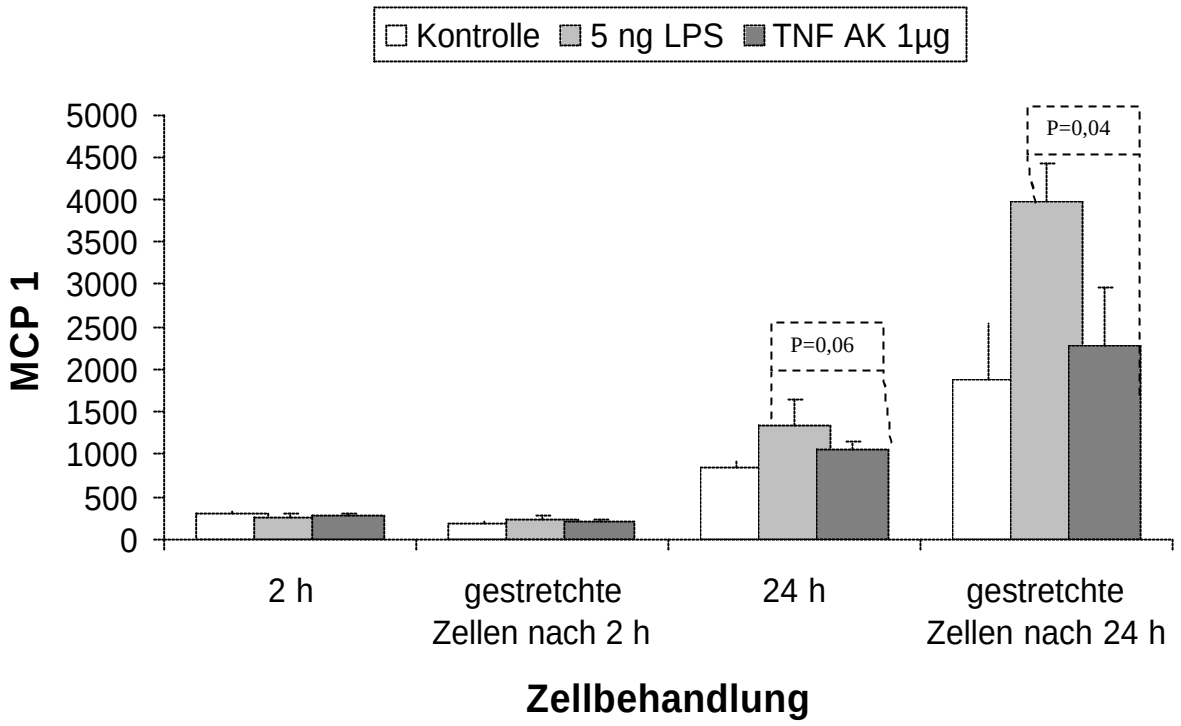


Abb. 16: L2-Zellen, MCP-1 Freisetzung bei Stretch, sowie mit LPS und TNF-Ak (n = 3)

MCP-1 Freisetzung von L2-Zellen in Anwesenheit von LPS und TNF-Ak mit und ohne Stretch. Pro Well wurden ca. 1 Million L2-Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht und in die jeweiligen Wells wurde LPS in einer Konzentration von 5 ng/ml hinzugegeben. In die jeweiligen Wells kamen zu dem LPS noch 1 µg/ml TNF-Ak. Nach 2 und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:20 per ELISA die MCP-1 Werte gemessen (n = 3).

5.11 Stretch führt bei L2-Zellen zu einer Erhöhung der MIP-2 Freisetzung

MIP-2 ist in seiner proinflammatorischen und neutrophile Granulozyten aktivierenden Wirkung dem Interleukin-8 nahe verwandtem Faktor.

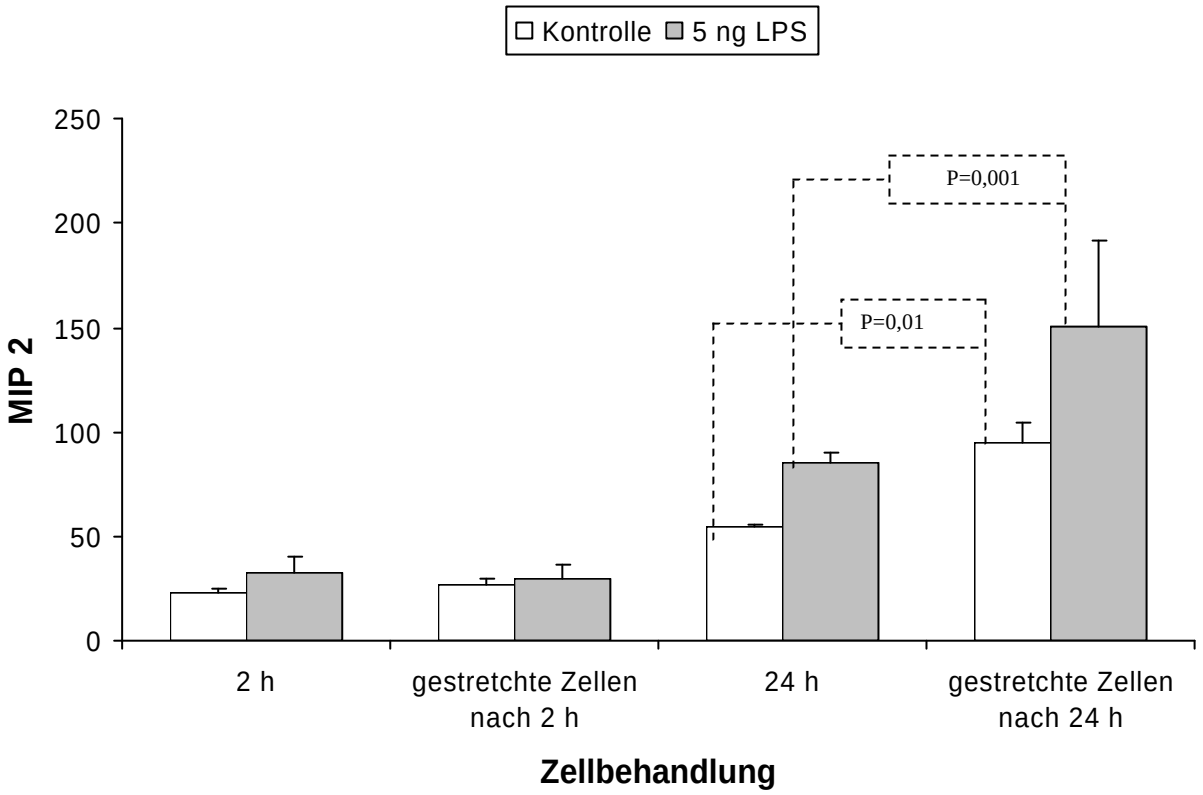


Abb. 17: L2-Zellen, MIP-2 Freisetzung mit sowie ohne Stretch (n = 8)

MIP-2 Freisetzung von L2-Zellen mit und ohne Stretch. Pro Well wurden ca. 1 Million L2-Zellen über 24 Stunden inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 17 %, 12-mal die Minute gestretcht. Nach 2 und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin Werte und per kommerzieller ELISA die MIP-2 Werte gemessen.

5.12 Stretch führt bei Typ-II Zellen zu einer Erhöhung der MIP-2 Freisetzung

MIP-2 ist in seiner proinflammatorischen und neutrophile Granulozyten aktivierenden Wirkung ein dem Interleukin-8 nahe verwandtem Faktor.

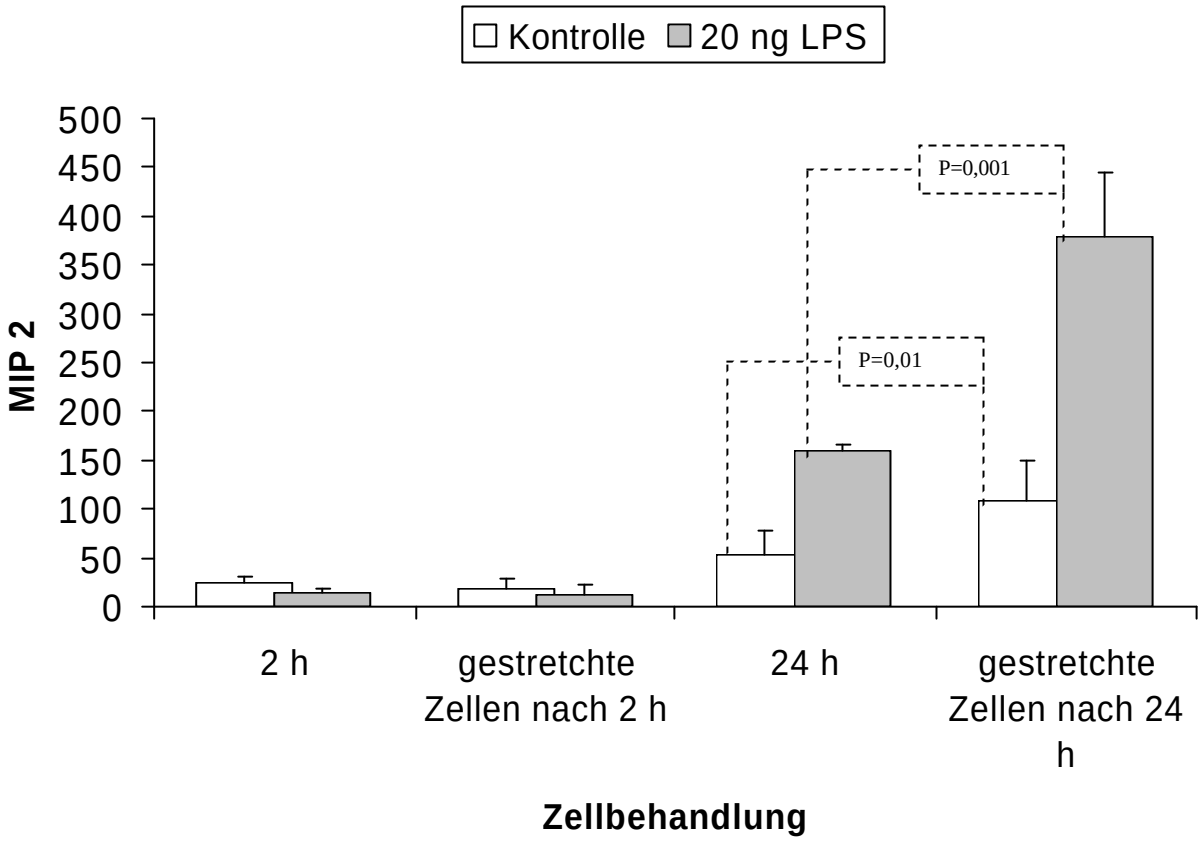


Abb. 18: Typ-II Zellen, MIP-2 Freisetzung mit und ohne Stretch (n = 5)

Pro Well wurden ca. 5 Millionen Typ-II Zellen über 48 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 12 %, 12-mal die Minute gestretcht. Nach 2 und 24 Stunden wurden jeweils aus den Wells die Überstände entnommen. Mit den Überständen wurden unverdünnt die Mellitin-Werte und bei einer Verdünnung von 1:30 per ELISA die MIP-2 Werte gemessen.

6. Diskussion

6.1 Inflammatorische Cytokin Produktion der Typ-II Zellen bei mechanischer Belastung

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass die gewählten Stretchintensitäten und die Stretchdauer nicht zu einer Zellschädigung im Rahmen der Dehnung führten. In den Versuchen waren sowohl bei L2-Zellen und auch Typ-II Zellen keine höheren LDH-Werte zu messen. Bei Mellitin, einem Peptid, Hauptbestandteil des Bienengiftes, zeigten sich deutlich höhere LDH-Werte.

Nach 24 Stunden Stretch sieht man in unseren Versuchen, dass bei L2-Zellen und auch bei Typ-II Zellen eine deutliche Zunahme der Cytokine MCP-1 und MIP-2 zu sehen ist.

Wurden die Zellen aber vorher mit dem Lipopolysaccharid LPS inkubiert, war ein **additiver Effekt** auf die Cytokinproduktion durch Stretch zu sehen.

Die maschinelle Überdruckbeatmung stellt zurzeit ein unersetzliches Instrument zur Therapie schwerer beatmungspflichtiger Ateminsuffizienzen dar. Obwohl die initiale Schädigung des Beatmungstraumas pulmonalen Ursprungs ist, führt bei Patienten, die an ihrer akuten Erkrankung versterben, meist ein Multiorganversagen zum Tode. Ursache hierfür ist der Einfluss des Beatmungstraumas auf lokale und systemische inflammatorische Mediatoren (84, 85, 86).

Der menschliche Organismus ist unter natürlichen Bedingungen in ständigem Kontakt mit LPS-tragenden, gram-negativen Bakterien; bei Inhalation dieser Bakterien kann es zu einer alveolaren Exposition mit LPS kommen, wobei niedrige Dosierungen von LPS nützliche Effekte z.B. bezüglich des Immunsystems und der Steigerung der Abwehrkraft gegenüber Infektionen oder Entartungen zeigen können (20). Anderseits führt die Anwesenheit von hohen LPS Konzentrationen zu dramatischen pathophysiologischen Reaktionen wie

Fieber, Leukopenie, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotension, disseminierter intravasaler Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie und Multi-Organversagen.

6.2 Effekte von physikalischem Stress in Lungen-Zellen

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die wichtige Bedeutung von mechanischer Belastung der Zellen. In der Intensivmedizin ist nämlich die mechanische Beatmung heutzutage eine unersetzliche Thearapiemaßnahme bei Ateminsuffizienzen.

Aber abnormale physikalische Kräfte tragen dazu bei, dass in den Lungengeweben verschiedene pathologische Vorgänge in Gang gesetzt werden. Um die durch mechanischen Stress hervorgerufenen Krankheiten der Lunge wie z.B. Barotrauma, bedingt durch die intensivmedizinische künstliche Beatmung, Pulmonary Hypertension, Pulmonary Hypoplasia, Asthma, COPD vorzubeugen und zu behandeln, bedarf es noch der intensiveren Forschung. Denn mechanische Stimulation führt zu unbekannten Regelkreisen intrazellulärer Signaltransduktionswege, die noch nicht definitiv nachvollziehbar sind. D.h. wie mechanische Dehnung in intrazelluläre biochemische Signale umgewandelt wird, ist noch unklar. Es gibt verschiedene Theorien.

Das Verständnis darüber, wie und wo diese physikalischen Kräfte in den Zellen wirken, würde uns helfen, Behandlungsmethoden zu entwickeln. Dadurch würde man physikalisch bedingte Schädigungen der Lunge vorbeugen bzw. therapieren. Heute weiß man, dass die mechanische Dehnung in verschiedene Bereiche der Zellen eingreift. Es bedarf noch der intensiven Forschung, um diese Puzzleteile in eine Einheit zusammenzulegen. Bislang wurden mit verschiedenen Zellen unseres Körpers Versuche durchgeführt, die mechanischem Stress ausgesetzt waren, wie z.B. zellulare und molekulare Antworten von Herzmuskelzellen auf Stretch (44), Genregulation durch Stretch von Endothelzellen (45), Mechanotransduktion von Gefäßmuskelzellen (46), Knochenzellen (47) und Endothelialzellen (48, 49).

In Studien wurden folgende Ergebnisse dargestellt, wie Zellen bei Mechanischer Dehnung reagieren:

-Zytokinfreisetzungen bei mechanischer Dehnung

Mechanische Beatmung ist in der Intensivmedizin mittlerweile eine unentbehrliche Therapiemaßnahme bei Atmungsproblemen.

Schädigende Ventilationsstrategien führen zu einer Zunahme von TNF-a, Interleukine wie IL-1β, IL-6 und IL-10, MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein) und Interferon-?. Diese Werte maß man in der Lungenlavage von isolierten Rattenlungen (72).

Bei der human-alveolaren Epithelzelllinie A459 wurden durch die Belastung mit dem Flexercell Stretchgerät IL-8 freigesetzt (74).

Inflammatorische Cytokine, die während der Lungenbeatmung produziert werden, können zur Entwicklung einer akuten Lungenschädigungen (ARDS) und zur Entwicklung von multiplen Organ-Schädigungen, wie z.B. MSOF, führen (73).

Bethmann und Kollegen zeigten, dass bei isolierten Mäuselungen, die mit -25 cm H_2O beatmet wurden, gegenüber der physiologischen -10 cm H_2O Beatmung, höhere Werte von TNF-a und IL-6 im Perfusat zu messen waren (60).

Es ist auch herausgefunden worden, dass primär in Kultur gelegte alveolare Epithelzellen, die am ersten Tag gestretcht wurden, prozentual mehr Schädigungen erlitten hatten, als alveolare Ephithelzellen, die am fünften Tag gestretcht wurden (75). In verlängerten Kulturzeiten haben die Typ-II Zellen die Eigenschaft, sich morphologisch in Typ-I Zellen zu verwandeln.

Prostaglandin Synthese: Die Synthese von biologisch aktiven Eicosanoids durch die Epithelzellen der Luftwege tragen zur Regulierung des Tonus der glatten Muskeln in den Luftwegen und zur inflammatorischen Antwort bei. Mit dem Flexercell Stretch Gerät ist gezeigt worden, dass cyclischer Stretch die Synthese

der Prostaglandine nach unten reguliert. Unter anderem von: PGE_2, PGI_2, Thromboxane A_2 von Katzen und humanen Lungenepithel Zellen (76). In anderen Studien ist wiederum gezeigt worden, dass Scheerstress bei fetalen-Rattenlungenzellen eine rapide Freisetzung von Prostacyclinen bewirkt (77, 78). Diese Ergebnisse zeigen, dass verschiedene mechanische Belastungen auch zu unterschiedlichen inflammatorischen Antworten führen.

In den Zellstretchversuchen ist es wichtig, die Zellen so zu behandeln, dass sie weniger der Zelldeformation und dem Zelltod unterliegen. Alveolarschäden nehmen mit der Dehnungsgröße der Zellen und mit der Dehnungsdauer zu (54). Alveolarschäden nehmen mit der zellulären Dichte und je länger sie *in vitro* in Ruhe gelassen werden ab, d.h. Zellen, die *in vitro* erst nach ein paar Tagen gestretcht werden, sind stabiler und unterliegen weniger dem Zelltod (54).

Mechanischer Stress der Lunge, z.B. mechanische Beatmung, wird auch in Zusammenhang gebracht, ARDS zu begünstigen. Die Mortalitätsrate von ARDS ist größer als 50 %, die meisten Patienten sterben jedoch an MSOF (Multiple System Organ Failure) (55). Denn Entzündungen (wie z.B. durch mechanische Ventilation) können hervorrufen, dass Granulozyten von der Lunge (Alveolen) über das Herz in den großen Kreislauf gelangen. Bedingt durch Zunahme der Permeabilität zwischen Alveolen und Kapillaren gelangen verschiedene Mediatoren vom kleinen Kreislauf in den großen Kreislauf. Schließlich befinden sich ein Drittel aller Granulozyten außerhalb des Knochenmarks in den Lungen. Die Anwesenheit der Entzündungsvermittler im Kreislauf spielt eine große Rolle beim systemischen Organversagen und Schock (55).

Wie mechanische Belastung die Zellen beeinflusst und wie dieses Signal intrazellulär umgewandelt wird, ist noch nicht beschrieben worden. Aber von den verschiedenen vorgeschlagenen Mechanismen erfahren das Modell der Stretch-aktivierten Ionenkanäle und das Extrazellulär-Integrin-Cytoskellett-Model die meiste Beachtung. Stretch aktiviert die Aktivität der Ionenkanäle der Lungenzellen. Ca^{2+} ist das am meisten beschriebene Ion, das ein intrazellulares Signal vermittelt, bedingt durch Stretch der Lungenzellen.

20 %-ige Dehnung von glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien bei Ratten-Zellen führt zu einer Zunahme des Calciumeinstroms und Calciumsausstroms (79).

Zellen sind in den Extrazellulärraum durch die Integrine verbunden, diese Integrine haben wiederum Kontakt mit dem Cytoskelett. Dieser Aufbau schafft eine strukturelle Beziehung zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zellinneren, weiterhin ermöglicht es eine strukturelle Signalübertragung vom Extrazellulärraum über die Zelloberfläche in das Zellinnere. Wenn die Integrine mit einer Micropipette gedrückt werden, führt dies zu einer Umorientierung der Cytoskelettfilamente. D.h. mechanischer Stress führt zu einer Änderung der Cytoskeletalstarre und diese Veränderung kann z.B. dazu führen, dass in den Zellen bestimmte Regulatorproteine beeinflusst werden (80, 81, 82, 83).

- Einfluss der mechanischen Dehnung auf den Ca^{2+} Influx und Efflux in Zellen

Physikalische Kräfte wirken auf die Zellmembran und aktivieren oder inaktivieren Ionen-Kanäle. D.h. dass die Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen sich ändert. Eine 20 %-ige statische Dehnung der glatten Muskelzellen der Rattenlungen Gefäße führte zu einer Zunahme des Ca^{2+}-Efflux und Ca^{2+}-Influx (129). Auch eine biaxiale Dehnung der Rinder-Lungen-Arterien Endothelial-zellen führt zu einer erhöhten Permeabilität von Ca^{2+}Ionen (130). Ein cyclisch intermittierendes Stretch induziert eine schnelle Ca^{2+}-Influx bei fetalen Rattenlungenzellen (131). Es ist gezeigt worden, dass z.B: 11-17 %ige Dehnungen von Ratten Typ-II Zellen nach 20 Sekunden eine Steigerung der intrazellularen Calciumkonzentration bewirken (50). Die c-AMP Werte zeigten bei Stretch keine gravierenden Unterschiede (50). Sheerstress führt aber nicht zu einer Ca^{2+} Veränderung in Endothelzellen der Pulmonalarterien, aber zu einer flüchtigen Zunahme der K^+-Zunahme (132, 133).

- Zellproliferationen unter mechanischer Dehnung

Eine andere Studie bewies, dass Stretch bei fetalen Rattenlungenzellen Proliferationen zeigte, die stärkste (3H) Thymidin Incorporation in die DNA erfolgte bei 1 %-igem FCS-Medium und bei den Zeiten 12, 24 und 48 Stunden nach Stretch (51, 53, 62). Auch humane Lungen-Fibroblasten der Zell-Linie IMR-90 zeigten ein Wachstum (63, 64). Es wird postuliert, dass mechanischer Stress bei fetalen Rattenlungenzellen eine Zunahme der Gene und Proteinexpression von PDGF β-Rezeptor bewirkt (PDGF: Plated derived growth factor, von Thrombozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildeter Wachstumsfaktor; ist beteiligt an der Zell-Proliferation, Wundheilung und Entstehung der Atherosklerose) (65). Denn die Blockade dieser Rezeptoren mit Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitor unterdrückt die durch mechanischen Stress erzeugte Zell-Proliferation (65).

- Die mRNA Konzentrationen von SP-C unter der Dehnung

Surfactantbildung und Sekretion ist eine bedeutende Hauptaufgabe von Typ-II Zellen. Es ist beschrieben worden, dass mechanische Ventilation die Surfactantbildung beeinflusst (56, 57, 58, 59). Wirtz und Dobbs stretchten 30 Minuten lang Typ-II Zellen, dies führte neben der Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentrationen zur einer Zunahme der Phospholipid-Freisetzung (50, 66). In einem anderen Versuch ist gezeigt worden, dass cyclischer Stretch bei fetalen Rattenlungenzellen eine Zunahme der mRNA Konzentrationen von SP-C, aber nicht von SP-A bewirkt hat (67). Somit steigt die Tendenz eines distalen Alveolis-Kollapses, somit sinkt der Gasaustausch, was in der Intensivmedizin zu einer Erhöhung des Beatmungsdruckes führt. Auf diese Weise entsteht ein Teufelskreis: Lungenschädigung verschiedener Genese, die damit verbundene Gasaustauschstörung (Hypoxie) ? künstliche Beatmung ? weitere Lungenschäden durch die künstliche Beatmung und Verschlechterung des Gasaustausches (Barotrauma) ? Erweiterung der künstlichen Beatmung ? ARDS, MSOF.

- *Mechanische Dehnung führt zu einer Zunahme der mRNA Levels von Typ-IV Collagen, Tropoplastin und Fibronectin*

Cyclischer Stretch induziert bei fetalen Lungenzellen eine Zunahme der mRNA Levels von Typ IV Collagen und Tropoplastin. Es verhindert aber die Ansammlung von a_1(I)-Procollagen und Biglycan mRNAs (68, 67). Die Genexpression und Aktivität von Matrix Mettaloproteinase und sein Inhibitor (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1) waren vom Stretch unbeeinflusst (68). Stretch führt zu einer Zunahme der Fibronectinproduktion, aber gleichzeitig zu einer Unterdrückung der Fibronectin Protein Synthese und Sekretion. Somit wird die Blutgerinnung nach unten reguliert (69, 70, 71).

6.3 Vorgeschlagene Mechanismen für Mechanorezeptoren

Wie mechanische Kräfte durch die Zellen jetzt genau registriert und in biochemische Signale umgewandelt werden, ist noch nicht definitiv geklärt worden. Man muss auch beachten, dass die verschiedenen Zellarten und die verschiedenen physikalischen Kräfte, die ja nach Organen anders sind, keine Einheit gewährleisten. Hinzu kommt natürlich, dass in den Untersuchungen *in vitro* verschiedene Geräte benutzt werden, um mechanisch die Zellen zu stressen. Unter verschieden vorgeschlagenen Mechanismen erfahren die Stretch-aktivierten-Ionen Kanäle und das ECM-integrin-cytoskeletton pathway die meiste Beachtung.

- *Stretch aktivierte Ionenkanäle:*

Physikalische Kräfte wirken auf die Zellmembran und aktivieren oder inaktivieren Ionen-Kanäle. D.h. das, die Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen sich ändert. Eine 20 %-ige statische Dehnung der glatten Muskelzellen der Rattenlungen-Gefäße führte zu einer Zunahme des Ca^{2+}-Efflux und Ca^{2+}-Influx (129). Auch eine biaxiale Dehnung der Rinder-Lungen-Arterien Endothelial-

zellen führt zu einer erhöhten Permeabilität von Ca^{2+}Ionen (130). Ein cyclisch intermittierendes Stretch induziert eine schnelle Ca^{2+}-Influx bei fetalen Rattenlungenzellen (131). Es ist gezeigt worden, dass z.B: 11-17 %-ige Dehnungen von Ratten Typ-II Zellen nach 20 Sekunden eine Steigerung der intrazellularen Calciumkonzentration bewirken (50). Die c-AMP Werte zeigten bei Stretch keine gravierenden Unterschiede (50). Sheerstress führt aber nicht zu einer Ca^{2+} Veränderung in Endothelzellen der Pulmonal Arterien, aber zu einer flüchtigen Zunahme der K^{+}-Zunahme (132, 133).

- *ECM-Integrin Cytoskelett Pathway*

Zellen sind an die Extrazelluläre Matrix (ECM) (Kollagen, Elastin, Fibrillin, Fibronektine, Laminin) durch Integrine (Adhäsionsproteine) verbunden, diese haben eine Verbindung zum Cytoskelett. Dies führt dazu, dass ein struktureller Kontakt besteht, Signale können vom ECM in die Zellen übertragen werden. Als Integrine mit einer Mikropipette gezogen wurden, sah man, dass sich die Cytoskeletal Filamente neu orientierten, der Nukleolus sich verdreht und der Nukleolus sich neu verteilt entlang der Achse, wo die Dehnung stattgefunden hatte (134). Mechanischer Stress verursacht Veränderungen der Cytoskelettal Starre, Verformungen dieser Starre kann zu Veränderungen der Funktion der Struktur Moleküle, Cytoskelett, Nukleolus und bestimmte Regulator Proteine führen (135, 136, 137). Dieser Autofeedback-Mechanismus könnte ein sehr wichtiger Adaptationsmechanismus sein um sich der Externalen Umgebungssituation anzupassen (138).

6.4 Zukünftige Studien

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass mechanischer Stress allein zu einer deutlichen Erhöhung der Cytokine MCP-1 und MIP-2 bei Typ-II Zellen geführt haben. Bei Stimulation der Zellen mit LPS sah man aber einen additiven Effekt der Cytokinfreisetzung. D.h. die Patienten, die in der Intensivmedizin beatmet werden, reagieren durch eine Infektion viel sensibler auf eine mechanische Belastung und sind damit sensibler, ein Barotrauma, ARDS und das multiple Organversagen entwickeln. In zukünftigen Studien müssten Strategien entwickelt werden, zum Beispiel durch Pharmakaintervention oder veränderte Ventilationsstrategien, damit die Typ-II Zellen der Lunge nicht so sensibel auf Dehung und bakterielle Stimulansien reagieren.

Es bedarf natürlich der weiteren Forschung auf diesem Gebiet, wie zum Beispiel die Interaktion zwischen physikalischen Faktoren (mechanische Dehnung) und anderen Faktoren. Wie reagieren Zellen mit der Cytokinfreisetzung, bei Stretch und Overstretch, Stretch mit verschiedenen Amplituden, Stretch mit verschiedenen Frequenzen. Oder wie reagieren Typ-II Zellen bei Stretch in Anwesenheit von anderen schädigenden Faktoren wie z.B. bakterieller Inkontamination, viraler Inkontaminationen, Hyperoxie, Hypoxie.

Es ist auch wichtig, dass man die vitro-Versuche mit den vivo-Versuchen kombiniert. Zellkulturen haben den Vorteil, dass man eine Zellgruppe unter gut kontrollierten Bedingungen untersuchen kann. Wie auch immer, die Komplexität von Cell-Cell und Zell-Matrix Interaktionen oder die Kommunikation zwischen verschiedenen Zell-Typen kann nicht komplett in Zell-Kulturen simuliert werden. Deshalb ist es wichtig, in der Zukunft Zellkulturvesuche mit Organversuchen zu kombinieren. Zum Beispiel könnte man die Ergebnisse der in vitro-Versuche anhand durch Operationen gewonnenem menschlichen Lungengewebe bestätigen.

7. Literaturverzeichnis

1. Morgenroth, K. (1986):
Das Surfactantsystem der Lunge. Morphologische Grundlagen und Klinische Bedeutung.
Berlin, New York, Walter de Gruyter & Co, ISBN:3110110156

2. Slutsky, A. S. und L. N. Tremblay (1998):
Multiple System Organ Failure.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. **157**:1721-1725

3. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, AWMF (1996):
Leitlinie Intensivmedizin. Akutes Lungenversagen.
AWMF-Leitlinien-Register Nr.: 040/005

4. Macklin, C. C. (1954):
The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes.
Lancet **266**:1099-1104

5. Max, M., U. Kaisers und R. Rossaint (1997):
Perspektiven der maschinellen Beatmung im ARDS.
Schweiz Med. Wochenschreiben **127**:1030-1038

6. Drößler, K. und D. Gemsa (2000):
Wörterbuch der Immunologie.
Spektrum Akademie Verlag, ISBN 3-8274-0897-0

7. De Vries, M. E., L. Ran und D. J. Kelvin (1999):
On the edge: the physiological and phatophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses.
Semin. Immunol. **11**:95-104

8. Scapini, R., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni und M. A. Cassatela (2000):
The neutrophill as a cellular source of the chemikines.
Immunol. Rev. **177**:195-203

9. Holmes, K. V., D. B. Tresnan und B. D. Zelus (1997):
Virus-receptor interactions in the enteric tract. Virus-receptor interaction.
Adv. Exp. Med. Biol. **412**:125-133

10. Jepson, M. A. und M. A. Clark (1998):
Studiying M cels and their role in infection.
Trends Microbiol. **6**:359-365

11. Sansonetti, P. J. und A. Phalipon (1999):
M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogenes: mechanisms of interaction, consequences for the disease process.
Semin. Immunol. **11**:193-203

12. Siebers, A. und B. B. Finlay (1996):
M cells and the phatogenesis of mucosal and systemic infections.
Trends Microbiol. **4**:22-29

13. Vazquez-Torres, A. und F. C. Fang (2000):
Cellular routes of invasion by enterophatogenes.
Curr. Opin. Microbiol. **3**:54-59

14. Brady, M., M. Bhatia, S. Chrismas, M. T. Boyd, J. P. Neoptolemos und J. Slavin (2002):
Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis.
Pancreas **25**:260-269

15. Jiang, Y., D. I. Beller, G. Frendl und D. T. Graves (1992):
Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes.
J. Immunol. **148**:2423-2428

16. Maier, H.
Der murine Chemikinrezeptor CCR2- Herstellung von Null-Mutanten durch homologe rekombination in embryonalen Stammzellen. URN: urn:nbn:de:bsz:93-opus-8761; URL: http://ellib.uni-stuttgart.de/opus/volltexte/2001/876#

17. Holtzmann, M. J. (1991):
Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease.
Am. Rev. Respir. Dis. **143**:188-203

18. Rietschel, E. T. und H. Brade (1992):
Bacterial Endotoxins.
Sci. Am. **267**:54-61

19. Schletter, J., H. Heine, A. Ulmer und E. Rietschel (1995):
Molecular mechanisms of endotoxin activity.
Arch. Mikrobiol. **64**:383-389

20. Galanos, C., O. Lüderitz, E. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto und T. Shiba (1985):
Synthetic and Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities.
Eur. J. Biochem. **148**:1-5

21. Wright, S., R. Ramos, P. Tobias, R. Ulevitch und J. Mathison (1990):
CD-14, a receptor for complexes of lipopolysaccaride (LPS) and LPS binding protein.
Science **249**:1431-1433

22. Tobias, P., K. Soldau, L. Hatlen, R. Schumann, G. Einhorn, J. Matlison und R. Ulevitch (1992):
Lipopolysaccharide binding protein.
J. Biol. Chem. **269**:2241-2244

23. Gallay, P., D. Heumann, D. Le Roy, C. Barras und M. P. Glauser (1994):
Mode of action of antilipopolysaccharide-binding-protein-antibodies for prevention of endotoxemic shock in mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**:7922-7926

24. Schletter, J., H. Heine Ulmer und E. Rietschel (1995):
Molecular mechanisms of endotoxin activity.
Arch. Microbiol. **164**:383-389

25. Kimbrell, D. A. und B. Beutler (2001):
The evulotion and genetics of innate immunity.
Nat. Rev. Genet. **2**:256-267

26. Hailmann, E., H. Lichtenstein, M. Würfel, D. Miller, D. Johnson, M. Kelley, L. Busse, M. Zukowski und S. Wright (1994):
Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD 14.
J. Exp. Med. **179**:269-277

27. Frey, E., D. Miller, T. Jahr, A. Sundan, V. Bazil, T. Espevik, B. Finlay und S. Wright (1992):
Soluable CD-14 participates in the response of cell to lipopolysaccharide.
J. Exp. Med. **176**:1665-1671

28. Nathan, C. F., S. C. Silverstein, L. H. Brukner und C. A. Cohn (1979):
Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. Hydrogen peroxide as a mediator of cytoxity.
J. Exp. Med. **149**:100-113

29. McCord, J. M. und E. D. Day, Jr. (1978):
Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex.
FEBS Lett. **86**:139-142

30. Poss, W., O. Timmonos, I. Farrukh, J. Hoidal und J. Michael (1995):
Inhaled nitric oxide prevents increase in pulmonary vascular permeability caused by hydrogen peroxide.
J. Appl. Physiol. **79**:866-891

31. Isowa, N., A. Xavier, E. Dziak, M. Opas, D. McRitchir, A. Slutsky, S. Keshavjee und M. Liu (1999):
LPS induced depolymerisation of cytoskeleton and its its role in TNF-a production by rat pneumocytes.
Am. J. Physiol. **277**:606-615

32. Clancy, R. M. und S. B. Abrabson (1995):
Nitric oxide: A novel mediator inflammation.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **210**:93-101

33. Rahman, I., A. Bel, B. Mulier, K. Donaldson und W. MacNee (1998):
Differential regulations of gluthatione by oxidants and dexamethasone in alveolar ephithel cells.
Am. J. Physiol. **275**:80-86

34. Crapo, J. D., B. E. Barry, P. Gehr, M. Bachhofen und E. R. Weibel (1982):
Cell number and cell characteristics of the normal human lung.
Am. Rev. Respir. Dis. **125**:332-337

35. Simon, R., J. A. Edwards, M. M. Reza und R. G. Kunkel (1991):
Injury of rat pulmonary epithelial cells H_2O_2: dependence on phenotype and catalase.
Am. J. Physiol. **260**:318-325

36. Schneeberger, E. E. und K. M. McCarty (1986):
Cytochemical localization of Na+-K+-ATPase in rat type II pneumocytes.
J. Appl. Physiol. **60**:1584-1589

37. Lubman, R. L. und E. D. Crandall (1994):
Polarized distribution of Na(+)-H+ antiport activity in rat alveolar epithelial cells.
Am J Physilol, **266**:138-147

38. Bartels, H., H. J. Oestern und G. Voss-Wermbter (1980):
Communicating-occluding junction complexes in the alveolar epithelium.
Am. Rev. Respir. Dis. **121**:1017-1024

39. Mason, R. J. und J. M. Shannon (1997):
Alveolar type II cells. The Lung: Scientific Foundations 2nd edition (Crystal, R.G., West, J.B., et al., eds), Raven Press, Ltd., New York, pp. 543-555.

40. Letsou, G. V., I. Mills und B. E. Sumpio (1989):
The role of Adenylatzyklase in the transduction of pulastile stretch signals to endothelial cells.
Circ. Shock. **27**:328-

41. Hymel, L. und V. Ruiz-Velasco (1994):
Defining the pathway of Stretch-activated Ca^{2+} entry in vascular smooth muscele cells. ASCB subgroup meeting: In vitro mechanical load: How do cells detect, interprete, and respond to mechanical signals? San Fransisco, CA.

42. Visconti, L. A., E. H. K. Yen und R. B. Johnson (1991):
The effect of local strain on bone formation in vitro.
J. Dental. Res. **10**:75-78

43. Riley, D. J., D. E. Rannels, R. B. Low, L. Jensen und T. P. Jacobs (1990):
Effects of physical forces on lung structure, function, and metabolism.
Am. Rev. Respir. Dis. **142**:910-914

44. Sandoshima, J. und S. Izumo (1997):
The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.
Annu. Rev. Physiol. **59**:551-571

45. Resnick, N., H. Yahav, L. M. Khachigian, T. Collins, K. R. Anderson, C. F. J. Dewey und M. A. J. Gimbrone (1997):
Endothelial gene regulation by laminar shear stress.
Adv. Exp. Med. Biol. **430**:155-164

46. Osol, G. (1995):
Mechanotransduction by vascular smooth muscele cells.
J. Vasc. Res. **32**:275-292

47. Turner, C. H., Owan und V. Takano (1995):
Mechanotransduction in bone: role of strain rate.
Am. J. Physiol. **269** (Endocrinol Metab, **32**):438-442

48. Davies, P. F. (1995):
Flow mediated endothelial mechanotransduction.
Physiol. Rev. **75**:519-560

49. Davies, P. F., K. A. Barbee, M. V. Volin, A. Robotewskyj, J. Chen, L. Joseph, M. L. Griem, M. N. Wernick, E. Jacobs, D. C. Polacek, N. Depaola und A. I. Barakat (1997):
Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction.
Annu. Rev. Physiol. **59**:527-549

50. Wirtz, H. R. und L. G. Dobbs (1990):
Calcium Mobilization and Exocytosis after one Mechanical Stretch of Lung Epithelial Cells.
Science **250**:1266-1269

51. Liu, M., S. J. M. Skinner, J. Xu; R. N. N. Han, A. K. Tanswell und M. Post (1992):
Stimulation of fetal rat lung cell proliferation in vitro by mechanical stretch.
Am. J. Physiol. **263**:376-383

52. Skinner, S. J. M., C. E. Sommervell und D. M. Olson (1992):
The effects of mechanical stretching on fetal rat lung cell prostacyclinproduction.
Butterworth-Heinemann, Prostaglandins, **43**:413-433

53. Scott, J. E., S. Y. Yang, E. Stanik und J. E. Anderson (1993):
Influence of strain on (3H) thymidine incorporation, surfactant related phospholipid synthesis, and cAMP levels in fetal type II alveolar cells.
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. **8**:258-265

54. Tschumperlin, D. J. und S. S. Margulies (1998):
Equibiaxial deformation-induced injury of alveolar epithelial cells in vitro.
Am. J. Physiol. **275** (Lung Cell Mol Physiol **19**):1173-1183

55. Slutsky, A. S. und N. L. Tremblay (1998):
Multiple System Organ failure. Is mechanical Ventilation a Contributing Factor.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. **157**:1721-1725

56. Greenfield, L. J, P. A. Ebert und D. W. Benson (1964):
Effect of positive pressure ventilation on surface tension properties of lung extracts.
Anestthesiology **25**:312-316

57. Faridy, E. E, S. Permutt und R. L. Riley (1966):
Effect of ventilation on surface forces in excised dogs lungs.
J. Appl. Physiol. **21**:1453-1462

58. Ito Y., R. A. W. Veldhuizen, L. Yao, L. A. McCaig, A. J. Bartlett und J. F. Lewis (1997):
Ventilation strategies affect surfactant aggregate conversion in acute lung injury.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. **155**:493-499

59. Taskar V., J. John, E. Evander, B. Robertson und B. Jonson (1997):
Surfactant dysfunction makes lungs vulnerable to repetitive collapse and reexpansion.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. **155**: 313-320

60. Von Bethmann, A. N., F. Brasch, R. Nusing, K. Vogt, H. D. Volk, K. Müller, A. Wendel und S. Uhlig (1998):
Hyperventilation induces relase of cytokines from perfused mouse lung.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. **157**:263-272

61. Meduri, G. U., G. Köhler, S. Headley, E. Tolley, F. Stentz und A. Postlethwaite (1995):
Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS.
Chest. **108**:1303-1314

62. Harding, R. (1991):
Fetal breathing Movements. In: The Lung: Scientific Foundations, edited by R. G. Crystal und J. B. West. New York, Raven, 1655-1664

63. Liu, M, J. Xu, P. Souza, B. Tanswell und M. Post (1995):
The effect of mechanical strain on fetal rat lung cell proliferation: comparison of two- and three- dimensional culture systems.
In vitro Cell Dev. Biol. Anim. **31**:858-866

64. Xu, J., M. Liu, A. K. Tanswell und M. Post (1998):
Mesenchymal determination of mechanical strain- induced fetal lung cell proliferation.
Am. J. Physiol. **275** (Lung Cell Mol. Physiol. **19**):545-550

65. Liu, M. J., L. S. Buch, A. K. Tanswell und M. Post (1995):
Antisense oligonucleotides for PDGF-B and its receptor inhibit mechanical strain-induced fetal lung cell growth.
Am. J. Physiol. **269** (Lung Cell Mol. Physiol. **13**):178-184

66. Scott, J. E., S. Y. Yang, E. Stanik und J. E. Anderson (1993):
Influence of strain on (3H)thymidine incorporation, surfactant-related phospholipid synthesis, and c-AMP levels in fetal type II alveolar cells.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **8**:258-265

67. Nakamura, T., M. Liu, A. S. Slutsky und M. Post (2000):
Mechanical strain and dexamethasone selectively increase surfactant protein C and tropoelastin gene expression.
Am. J. Physiol. **278**:974-980

68. Xu, J., M. Liu und M. Post (1999):
Differential regulation of extracellular molecules by mechanical strain of fetal lung cells.
Am. J. Physiol. **276** (Lung Cell Mol. Physiol. **20**):728-735

69. Chan, A. K. C., B. Baranowski, L. Berry, M. Liu, B. Rafii, M. Post, H. O´Brodovich, P. Monagle und M. Andrew (1998):
Influence of mechanical stretch on thrombin regulation by fetal mixed lung cells.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **19**:419-425

70. Mouregon, E., J. XU, A. K. Tanswell, M. Liu und M. Post (1999):
Mechanical stretch induced posttranscriptional regulation of fibronectin production in fetal lung cells.
Am. J. Physiol. **277** (Lung Cell Mol. Physiol. **21**):142-149

71. Xu, J., M. Liu, I. Caniggia und M. Post (1996):
Mecanical strain induces constitutive and regulated secretion of gylcosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells.
J. Cell Sci. **109**:1605-1613

72. Tremblay, L., Valenza,S. Ribeiro, J.Li, and A.S. Slutsky (1997):
Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model.
J. Clin. Invest. **99**:944-952

73. Liu, M. und A. S. Slutsky (1997):
Anti-inflammatory therapies: application of molecular biology techniques in intensive care medicine.
Intensive Care Med. **23**:718-731

74. Vlahakis, N. E., M. A. Schröder, A. H. Limper und R. D. Hubmayr (1999):
Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro.
Am. J. Physiol. **277** (Lung Cell Mol. Physiol. **21**):167-173

75. Tschumberlin, D. J. und S. S. Margulies (1998):
Equibiaxial deformation –induced injury of alveolar epithelial cells in vitro.
Am. J. Physiol. **275** (Lung Cell Mol. Physiol. **19**):1173-1183

76. Savla, U., P. H. Sporn und C. M. Waters (1997):
Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoid synthesis.
Am. J. Physiol. **273** (Lung Cell Mol. Physiol. **17**):1013-1019

77. Reeves, J. T., A. van Grondelle, N. F. Voelkel, B. Walker, J. Lindenfeld, S. Worthen und M. Mathias (1983):
Prostacyclin production and lung endothelial cell shear stress.
Prog. Clin. Biol. Res. **136**:125-131

78. Skinner, S. J. M., C. E. Sommervell und D. M. Olson (1992):
The effects of mechanical stretching on fetal rat lung cell prostacyclin production.
Prostaglandins. **43**:413-433

79. Bialecki, R. A., T. J. Kulik und W. S. Colucci (1992):
Stretching increases calcium influx and efflux in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. **263** (Lung Cell Mol. Physiol. **7**):602-606

80. Ingber, D. E. (1991):
Integrins as mechanochemical transducers.
Curr. Opin. Cell Biol. **3**:841-848

81. Ingber, D. E. (1993):
The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering.
Cell **75**:1249-1252

82. Maniotis, A. J., S. Chen und D. E. Ingber (1997):
Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 849-854

83. Wang, N., J. P. Butler und D. E. Ingber (1993):
Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeletton.
Science **260**:1124-1127

84. Slutsky, A. S. und V. M. Ranieri (2000):
Mechanical ventilation: lessons from the ARDSNet trial.
Respir. Res. **1**:73-77

85. Chiumello, D., G. Pristine und A. S. Slutsky (1999):
Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. **160**:109-116

86. Ranieri, V. M., P. M. Suter, C. Tortorella, R. De Tullio, J. M. Dayer, A. Brienza, F. Bruno und A. S. Slutsky (1999):
Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.
JAMA **282**:54-61

87. Zlotnik, A. und O. Yoshie (2000):
Chemokines: a new classification system and their role in immunity.
Immunity **12**:121-127

88. Macklin, C. C. (1954):
The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes.
Lancet **266**:1099-1104

89. Gross, R., P. Schölmerich und W. Gerok (1996):
Die Innere Medizin.
9. Aufl. Schattauer Verlag, Stuttgart, ISBN: 3794516990

90. Weibel, E. R. und C. R. Taylor (1998):
Functional design of the human ´lung for gas exchange. In: Fishman, A.P. (ed). Pulmonary diseases and disorders. Third edition: 21-62. McGraw-Hill, New York

91. Post, M. J. J. Batenburg, B. T. Smith und L. M. Van Golde (1984):
Pool sizes of precursors for phosphatidylcholine formation in adult rat lung type II cells.
Biochim. Biophys. Acta. **795**:552-557

92. Post, M., E. A. Shuurmans, J. J. Batenburg und L. M. Van Golde (1983):
Mechanismen involved in the synthesis of disaturated phosphatidylcholine by alveolar type II cells isolated from adult rat lung.
Biochim. Biophys. Acta. **750**:68-77

93. Burkhard, R. und L. M. Van Golde (1988):
Lipids and lipid metabolisim in the Lung. In: Messaro D, eds. Lung cell biology. New York, Marcel Dekker, pp. 591-653.

94. Crecelius, C. A. und W. J. Longmore (1984):
A study of the molecular species of diacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine and of cholinephosphptransferase and ethanolaminephosphotransferase activites in the type II pneumocytes.
Biochim. Biophys. Acta. **795**:247-256

95. Bleasdale, J. E., N. E. Tyler und J. M. Snyder (1985):
Subcellular site of synthesis of phosphatidylinositol in type II pneumocytes.
Lung **163**:345-359

96. Evans, M. J., L. J. Cabral, R. J. Stephens und G. Freemann (1975):
Transformation of alveolar type II cells to type I cells fallowing exposure to nitrogen dioxide.
Exp. Mol. Pathol. **22**:145-150

97. Fehrenbach, H., M. Kasper, T. Tscherning, T. Pan, D. Schuh, J. M. Shannon, M. Müller und R. J. Masson (1999):
Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis.
Eur. Respir. J. **14**:534-544

98. Shannon, J. M., R. J. Mason und S. D. Jennings (1987):
Functional differentation of alveolar type-II epithelial cells in vitro: effects of cell-shape, cell matrix, and cell-cell interactions.
Biochim. Biophys. Acta. **931**:143-156

99. Krochmal, E. M., S. T. Ballard, J. R. Yankaskas, R. C. Boucher und J. T. Gatzy (1989):
Volume and ion transport by fetal rat alveolar and tracheal epithelial in submersion culture.
Am. J. Physiol. **256** (Renal Fluid Electrolyte Physiol. **25**):397-407

100. Mason, R. J., M. C. Williams, J. H.Widdicombe, M. J. Sanders, J. S. Misfeld, und L. C. Berry, Jr. (1982):
Transepithelial transport by pulmonary Typ II cells in primary culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**:6033-6037

101. Schneeberger, E. und E. McCarthy (1986):
Cytochemical localization of Na^+-K^+- ATPase in rat type II pneumocytes.
J. Appl. Pysiol. **60**:1584-1589

102. Russo, R. M., R. L. Lubman und E. D. Crandall (1992):
Evidence for amilorid-sensitive sodium channels in alveolar epithelial cells.
Am. J. Physiol. **262** (Lung Cell Mol. Physiol. **6**):405-411

103. Cheek, J. M., K. J. Kim und E. D. Crandall (1989):
Thight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport.
Am. J. Physiol. **256** (Cell Physiol. **25**):688-693

104. Cantley, L. C. (1981):
Structure and mechanisme of the Na^+-K^+-ATPase.
Curr. Top. Bionerget. **11**:201-237

105. Shyian, A. W. und R. Levenson (1989):
Antisera specific for the $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$, and ß subnuits of Na^+-K^+-ATP ase: differential expression of α and ß subunits in rat tissue membranes.
Biochemistry. **28**:4531-4535

106. Ridge, K., D. H. Rutschmann, P. Factor, A. I. Katz, A. M. Bertorello und J. I. Sznajder (1997):
Differential expression of Na^+K^+ATPase isoforms in rat alveolar epithelial cells.
Am. J. Physiol. **273** (Lung Cell Mol Physiol, **17**):246-255

107. O Neil, S., E. Lesperance und D. J. Klaas (1984):
Lavage enchances bacterial phagocyosis and intracellular killing by alveolar macrophages.
Am. Rev. Respir. Dis. **130**:225-230

108. Schmidt, R. F. und G. Thews (1995):
Physiologie des Menschen. 26. Auflage, 568-571

109. Rose, F. (2004):
Habilitationsarbeit, Universität Giessen

110. Discroll, K. E., D. G. Hassenbein, B. W. Howard, R. J. Isofort, D. Cody, M. H. Tindal, M. Suchanek und J. M. Carter (1995):
Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen.
J. Leukoc. Biol. **58**:359-364

111. Gupta, S., L. Feng, T. Yoshimura, J. Redick, S. M. Fu und C. E. Rose, Jr. (1996):
Intra-alveolar macrophage inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung.
Respir. Cell Mol. Biol. **15**:656-663

112. Wirtz, H. R. W. und L. G. Dobbs (1990):
Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical strain of lung epithelial cells.
Science **250**: 1266-1269

113. Banes, A. J., J. Gilbert, D. Taylor und O. Monbureau (1985):
A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cycle tension or compression to cells in vitro.
J. Cell. Sci. **75**:35-42

114. Bishop, J. E., J. J. Mitchell, P. M. Absher, L. Baldor, H. A. Geller, J. Woodcock-Mitchell, M. J. Hamblin, P. Vacek und R. B. Low (1993):
Cyclic mechanical deformation stimulates human lung fibroblast proliferation and autocrine growth factor activity.
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **9**:126-133

115. Tschumperlin, D. J. und S. S. Margulies (1998):
Equibiaxial deformation-induced injury of alveolar epithelial cells in vitro.
Am. J. Physiol. **275** (Lung Cell Mol. Physiol. **19**):1173-1183

116. Winston, F. K., E. J. Macarak, S. F. Gorfien und L. E. Thibault (1989):
A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell.
J. Appl. Physiol. **67**:397-405

117. Wirtz, H. R. W. und L. G. Dobbs (1990):
Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical strain of lung epithelial cells.
Science **250**:1266-1269

118. Lee, A. A., T. Delhaas, L. K. Waldman, D. A. MacKenna, F. J. Villarreal und A. D. McCulloch (1996):
An equibiaxial strain system for cultured cells.
Am. J. Physiol. **271** (Cell Physiol. **40**):1400-1408

119. Simpson, L. L., A. K. Tanswell und M. G. Joneja (1985):
Epithelial cell differentiation in organotypic cultures of fetal rat lung.
Am. J. Anat. **172**:31-40

120. Liu, M., S. J. M. Skinner, J. Xu, R. N. N. Han, A. K. Tanswell und M. Post (1992):
Stimulation of fetal rat lung cell proliferation in vitro by mechanical strain.
Am. J. Physiol. **263** (Lung Cell Mol. Physiol. **7**):376-383

121. Liu, M., J. Xu, P. Souza, B. Tanswell, A. K. Tanswell und M. Post (1995):
The effect of mechanical strain on fetal rat lung cell proliferation: comparison of two- and three-dimensional culture systems.
In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. **31**:858-866

122. Simpson, L. L., A. K. Tanswell und M. G. Joneja (1985):
Epithelial cell differentiation in organotypic cultures of fetal rat lung.
Am. J. Anat. **172**:31-40

123. Skinner, S. J. M. (1989):
Fetal breathing movements: a mechanical stimulus for fetal lung cell growth and differentiation.
In: *Advances in Fetal Physiology*, edited by B. M. Johnston, and P. D. Gluckman. Ithaca, NY: Perinatology, p. 133-141

124. Liu, M., S. Montazeri, T. Jedlovsky, R. Van Wert, J. Zhang, R. K. Li und J. Yan (1999):
Bio-Stretch, a computerized cell-strain apparatus for three-dimensional organotypic cultures.
In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. **35**:87-93

125. Tran-Son-Tay, R. (1993):
Techniques for studying the effects of physical forces on mammalian cells and measuring cell mechanical properties.
In: Physical Forces and the Mammalian Cell, edited by J. A. Frangos. San Diego, CA: Academic, p. 1-60

126. Sanderson, M. J. und E. R. Dirksen (1986):
Mechanosensitivity of cultured ciliated cells from the mammalian respiratory tract: implication for the regulation of mucociliary transport.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**:7302-7306

127. Wang, N., J. P. Butler und D. E. Ingber (1993):
Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton.
Science **260**:1124-1127

128. Hubmayr, R. D., S. A. Shore, J. J. Fredberg, E. Planus, R. A. Panettieri, Jr., W. Moller, J. Heyder und N. Wang (1996):
Pharmacological activation changes stiffness of cultured human airway smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. **271** (Cell Physiol. **40**):1660-1668

129. Bialecki, R. A., T. J. Kulik und W. S. Colucci (1992):
Stretching increases calcium influx and efflux in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells.
Am. J. Physiol. **263** (Lung Cell Mol. Physiol. **7**):602-606

130. Winston, F. K., L. E. Thibault und E. J. Macarak (1993):
An analysis of the time-dependent changes in intracellular calcium concentration in endothelial cells in culture induced by mechanical stimulation.
J. Biomech. Eng. **115**:160-168

131. Liu, M., J. Xu, A. K. Tanswell und M. Post (1994):
Inhibition of mechanical strain-induced fetal rat lung cell proliferation by gadolinium, a stretch-activated channel blocker.
J. Cell Physiol. **161**:501-507

132. Alevriadou, B. R., S. G. Eskin, L. V. McIntire und W. P. Schilling (1993):
Effect of shear stress on 86Rb+ efflux from calf pulmonary artery endothelial cells.
Ann. Biomed. Eng. **21**:1-7

133. Tschumperlin, D. J. und S. S. Margulies (1998):
Equibiaxial deformation-induced injury of alveolar epithelial cells in vitro.
Am. J. Physiol. **275** (Lung Cell Mol. Physiol. **19**):1173-1183

134. Maniotis, A. J., C. S. Chen und D. E. Ingber (1997):
Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:849-854

135. Ingber, D. E. (1991):
Integrins as mechanochemical transducers.
Curr. Opin. Cell. Biol. **3**:841-848

136. Ingber, D. E. (1993):
The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering.
Cell. **75**:1249-1252

137. Ingber, D. E. (1997):
Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction.
Annu. Rev. Physiol. **59**:575-599

138. Smith, P. G., R. Garcia und L. Kogerman (1997):
Strain reorganizes focal adhesions and cytoskeleton in cultured airway smooth muscle cells.
Exp. Cell Res. **232**:127-136

139. Kikkawa, Y. und K. Yoneda (1974):
The type II epithelial cell of the lung. I. Method of isolation.
Lab. Invest. **30**:76-84.

140. Vassalli, P. (1992):
The pathophysiology of tumor necrosis factors.
Annu. Rev. Immunol. **10**:411-452

141. Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green und N. Fiore (1975):
An endotoxin-induced factor that causes necrosis of tumors.
Proc.Natl.Acad. Sci. USA **72**:3666-3670

142. Tracey, K. J. und A. Cerami (1993):
TNF, other cytokines and disease.
Annu. Rev. Cell. Biol. **9**:317-343

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

SP-C	Surfactant Protein C
A 549-Zelllinie	humane alveoläre Tumorzelllinie
Anti CD-14	monoklonale Antikörper gegen CD-14
FCS	fetales Kälberserum
L2-Zelllinie	alveoläre Tumorzelllinie der Ratte
LPS	Lipopolysaccharid aus salmonella typhimurium
M	mol/l, Angabe in M, mM oder µM
MCP-1	Monocyten-Chemotaktisches -Protein 1
MIP-2	Macrophage-Inflammatory-Protein 2
IL-8	Interleukin-8
CC-Chemokin	Chemokine mit zwei benachbarten Cysteinen
CD	Cluster of Differentiation. Internationales System für die Bez. von Differenzierungsantigenen. Die Differenzierung erfolgt durch monoklonale Antikörper.
TNF-a	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
MSOF	Multiple System Organ Failure
Il-6	Interleukin-6
BAL	Broncholalveoläre Lavage

8.2 Danksagungen

Vielen Dank gilt in erster Linie an *Professor Dr. med. Dr. rer. nat. F. Grimminger* für die Aufnahme als Doktorand in seine Arbeitsgruppe.

Bei meinem Betreuer Herrn *Dr. med. Frank Rose* möchte ich mich für die kollegiale Art der Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ohne seine Ratschläge, sein Hilfsbereitschaft und Geduld wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Nochmals vielen Dank!

Vielen Dank auch an die einzelnen *Mitarbeiter der Labor Gruppe Grimminger/Seeger*. Mein besonderer Dank gilt *Gabi Dahlem*, die mich in das Zellkultur Labor eingeführt und stets ein Ohr für mich hatte. Bleib weiter so!

Nicht zuletzt vielen Dank an meinen *Ehemann*, Dr med. vet. Ö. Akineden, Tierarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Tierärztlicher Nahrungsmittelkunde der Universität Giessen, der mir mit Tips, Anregungen und guter Laune jerderzeit beiseite stand.

8.3 Lebenslauf

Persönliche und familiäre Daten

Name:	Sevil Aslan-Akineden
Geburtstag- und Ort:	26.04.1973 in der Türkei
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand:	verheiratet mit Dr med.vet. Ömer Akineden.
	Zwei Söhne.

Schulbildung

1979-1983	Grundschule Köln
1983-1992	Käthe-Kollwitz-Gesamtschule Köln
Mai 1992	Abitur
1992-1994	Freiwilliges soziales Jahr in der Paracelsus-Klinik Düsseldorf und Paracelsusklinik Neuss

Berufsusbildung

04/ 1994	Aufnahme des Medizinstudiums an der
	Justus Liebig-Universität Gießen
04/1996	Physikum
08/1997	1. Staatsexamen
04/1999	2.Staatsexamen
05/2001	3.Staatsexamen (Gesamtnote: 2,1)
04/1999-04/2000	Promotionsarbeit
08/2001-01/2003	18 Monate ÄIP (Ärztin im Praktikum) im
	St.Vincenz-Krankenhaus in Limburg/Lahn in der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung bei Herrn Prof. Dr. Matthias Volk
01/2005-	Assistenzärztin im St. Josefs Krankenhaus in Giessen in der der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung.