

Protektiver Effekt von NO an der alveolo-epithelialen Barriere bei oxidativem Streß

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Tobias Tenenbaum

aus Offenbach am Main

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Disputation:

Meiner Tochter Hannah gewidmet

1	Vorwort	1
2	Einleitung und Fragestellung	1
2.1	Physiologische Funktion der Epithelzelle	1
2.1.1	Aufbau des Lungenepithels	1
2.1.2	Aufbau der alveolo-epithelialen Barrierefunktion und der epithelialen Polarität	2
2.1.3	Epitheliale Signal-Transduktionswege im Rahmen der Zellaktivierung bei oxidativem Streß	4
2.2	Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere durch drei unterschiedliche Mechanismen	8
2.2.1	Der Einfluß von oxidativem Streß durch Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) an der epithelialen Barriere	8
2.2.2	Der Einfluß des Polykations Protamin an der epithelialen Barriere	12
2.2.3	Der Einfluß des Porenbildners E. coli Hämolyisin A (ECH) an der epithelialen Barriere	13
2.3	Reaktionen des Alveolarepithels auf oxidativen Streß	14
2.4	Antioxidative Verteidigungsmechanismen des Alveolarepithels	15
2.4.1	Katalase	15
2.4.2	Glutathion-Redoxsystem	16
2.4.3	Superoxid-Dismutase	17
2.5	Ionentransport im Alveolarepithel	18
2.6	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) für das Alveolarepithel	19
2.7	Fragestellung	23

3	Material und Methoden	25
3.1	Material für die Isolierung von Alveolarepithelzellen Typ II aus Rattenlungen	25
3.1.1	Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial	25
3.1.2	Enzyme und Sera	26
3.1.3	Pharmaka und Agenzien	27
3.1.4	Instrumente und Geräte	27
3.1.5	Versuchstiere und Tierhaltung	29
3.2	Isolierung von Alveolarepithelzellen Typ II aus Rattenlungen	30
3.2.1	Isolierungsmethode nach Dobbs, Gonzales und Williams	30
3.2.2	Identifizierung und Vitalitätstest der Alveolarepithelzellen Typ II	32
3.3	Barrieremessung mit ³H-Mannitol bei Alveolarepithelzellen Typ II	33
3.3.1	Versuchsvorbereitungen - Kultivierung der Zellen und Widerstandsmessung mit dem Endohm ^R	33
3.3.2	Erhöhung der parazellulären Permeabilität und die Möglichkeit der Messung	34
3.3.3	NO-Begasung von Alveolarepithelzellen Typ II	35
3.4	Messung des Ionenstroms (I_{sc}) und der Leitfähigkeit (G_t) bei Alveolarepithelzellen Typ II	37
3.4.1	Ussing-Kammer	37
3.4.2	Elektrische Messungen	38
3.4.3	Mikrocomputer-gestützte Voltage/Current Clamp-Einrichtung unter Windows	40
3.5	Statistische Auswertung	41

4	Ergebnisse	42
4.1	Übersicht	42
4.2	Störung der epithelialen Permeabilität durch H ₂ O ₂ , Protamin und ECH	44
4.3	Protektiver Effekt von Stickstoffmonoxid auf die epitheliale Barriere	47
4.4	Die Rolle des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) für die epitheliale Schrankenfunktion	50
4.4.1	Die Rolle des zyklischen Guanylatzyklase-Inhibitors 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3,-a)quinoxalin-1-one (ODQ)	50
4.4.2	Die Rolle des cGMP-Analogons 8-bromo-cGMP	50
4.4.3	Die Rolle der Phosphodiesterase-Inhibitoren Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Zaprinast	51
4.5	Vergleich der apikalen versus basolateralen NO-Applikation bei oxidativem Streß am Alveolarepithel	54
4.5.1	Effekt der apikalen SNAP-Applikation bei oxidativem Streß am Alveolarepithel	54
4.5.2	Effekt der basolateralen SNAP-Applikation bei oxidativem Streß am Alveolarepithel	54
4.6	Die Wirkung von NO als Antioxidans	56
4.7	cGMP-Produktion im Alveolarepithel unter Applikation von NO-Donatoren und Phosphodiesterase-Inhibitoren	58
4.8	Der Einfluß von oxidativem Streß auf den Ionenstrom und die Leitfähigkeit im Alveolarepithel	59
4.8.1	Grundlagenversuche mit Amilorid und Ouabain	59
4.8.2	H ₂ O ₂ und SNAP	59
4.8.3	H ₂ O ₂ und Spermine NONOate	60
4.8.4	H ₂ O ₂ und 8-bromo-cGMP	60

5	Diskussion	67
5.1	Oxidativer Streß in der inflammatorisch aktiven Alveole	69
5.1.1	Die pathogenetische Relevanz von H ₂ O ₂ im Alveolarepithel und dessen Einfluß auf die alveolo-epitheliale Barriere	69
5.2	Die postulierte Rolle von Stickstoffmonoxid im Alveolarepithel	71
5.2.1	Protektiver Effekt von Stickstoffmonoxid auf die alveolo-epitheliale Barriere	71
5.2.2	Unterschiedliche Wirkung von NO an Epithel- und Endothelzellen – die Rolle von cGMP	77
5.2.3	Diskussion des Unterschiedes von apikaler und basolateraler NO-Applikation	79
5.3	Vergleich der Wirksamkeit von Aktivatoren der Guanylatzyklase und der Adenylatzyklase beim Schutz vor oxidativem Streß auf das Alveolarepithel	81
5.4	Diskussion des Einflusses von H₂O₂ und NO auf den alveolo-epithelialen Ionenstrom und die Leitfähigkeit	83
5.5	NO und das ARDS - Charakterisierung der klinischen Bedeutung von NO bei oxidativem Streß und Sepsis	87
6	Zusammenfassung	89

7	Literaturverzeichnis	91
8	Publikationsverzeichnis	101
9	Lebenslauf	
10	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis:

- ARDS Adult Respiratory Distress Syndrome
- ATP Adenosintriphosphat
- cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat
- cGMP zyklisches Guanosinmonophosphat
- cpm counts per minute
- Da Dalton
- ECH Escherichia coli Hämolysin A
- EDRF endothelial derived relaxing factor
- FCS fötales Kälberserum
- GSH Glutathion
- GSH-Px Glutathion-Peroxidase
- Gt Leitfähigkeit
- H₂O₂ Wasserstoffperoxid
- HE hämolysierende Einheit
- HlyA Escherichia coli Hämolysin A
- IBMX Isobutylmethylxanthin
- ICAM intracellular adhesion molecule
- iNOS induzierbare NO-Synthetase
- Isc Short-circuit-current (Kurzschlußstrom)
- LPS Lipopolysaccharid
- M mol/l; z.B in M, mM, µM oder nM
- MDCK Madin Darby Canine Kidney
- MW Molekulargewicht
- NO Stickstoffmonoxid

- ONOO⁻ Peroxynitrit
- ODQ 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3,-a)quinoxalin-1-one
- O₂⁻ Superoxidanion
- OH[•] Hydroxylradikal
- Pd Potentialdifferenz
- PDE Phosphodiesterase
- PKA Proteinkinase A
- PKG Proteinkinase G
- PMN Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
- PGE₁ Prostaglandin E₁
- PGI₂ Prostazyklin
- RIA Radioimmunoassay
- ROS reaktive Sauerstoffmetaboliten
- SIN-1 3-Morpholino-sydnomin-hydrochlorid
- SNAP S-Nitroso-N-N-acetylpenicillamin
- Spermine NONOate C₁₀H₂₆N₆O₂
- SOD Superoxid-Dismutase
- Typ I/II-Zelle/n Alveolarepithelzelle/n Typ I/II
- VCAM vascular cell adhesion molecule

1. Vorwort

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde in der Zeit von April 1997 bis September 1998 in dem Laborbereich der Klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ unter der Betreuung von Herrn Dr. F. Rose in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger am Zentrum für Innere Medizin durchgeführt. Für die Durchführung der Experimente wurden zunächst Methoden zur Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion der Lunge in dem Labor neu etabliert. Das Thema der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Stickstoffmonoxid bei oxidativem Streß durch Wasserstoffperoxid auf das Alveolarepithel. Außerdem wurden Experimente zur Aufklärung der Mechanismen der NO-Wirkung durchgeführt. Hierbei wurde insbesondere untersucht, ob die durch NO erzielten Effekte durch antioxidative Mechanismen oder durch die Bildung von cGMP bedingt sind. Diese Daten haben Eingang in die Publikation mit dem Titel „Apical but not basolateral endotoxin preincubation protects alveolar epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier function - role of nitric oxide synthesis“ gefunden und wurden im *Journal of Immunology* eingereicht und wurden im *Journal of Immunology* veröffentlicht (siehe Publikationsverzeichnis).

2. Einleitung

2.1 Die physiologische Funktion der Alveolarepithelzelle

2.1.1 Aufbau des Lungenepithels

Das Lungenepithel besteht aus kuboidalen Alveolarepithelzellen Typ II (Typ II-Zellen) und squamösen Alveolarepithelzellen Typ I (Typ I-Zellen). Die Alveolarepithelzellen Typ II sezernieren den Surfactant, ein lecithinhaltiges Phospholipid, das als grenzflächenaktive Substanz die Alveolaroberflächenspannung verringert und so Atelektasen verhindert. Aufgrund ihres lichtmikroskopischen Erscheinungsbildes wurden die Typ II-Zellen ursprünglich granuläre Pneumozyten genannt. Sie sind wegen ihrer Lokalisation in der Alveole auch unter dem Namen „große Alveolarzelle“ oder „corner cell“ zu finden (1,2).

Die Typ II-Zellen machen ungefähr 90-95% der alveolären Epithelzellen und 15% aller Lungenzellen aus. Aufgrund ihrer kuboidalen Form bedecken sie aber nur ca. 5% der

Alveolaroberfläche. Alveolarepithelzellen Typ I hingegen sind sehr große, flache Zellen, die ca. 95% der Alveolaroberfläche auskleiden und 5-10% des Lungenparenchyms ausmachen. Das dünne und attenuierte Zytoplasma der Typ I-Zelle ermöglicht durch Verkürzung der Diffusionsstrecke vom Alveolarraum zum Blut den Gasaustausch (1,2).

Die Alveolarepithelzelle Typ II hat für das Alveolarepithel die Funktion einer Stammzelle. Sie ist für die Regeneration des Alveolarepithels und Reparationsvorgänge in der Alveole verantwortlich. Außerdem hat sie die Fähigkeit zu proliferieren und sich in die Typ I-Zelle auszudifferenzieren. In vitro-Kulturen von Typ II-Zellen zeigen, daß sie im Verlauf abflachen und die Zahl der Lamellarkörperchen abnimmt. Der Gehalt an Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol, Sufactantprotein-A sowie der spezifischen mRNA, die zur Synthese dieser Substanzen führt, nimmt signifikant ab. Die Biosynthese neutraler Lipide nimmt jedoch zu. Eine Veränderung der Oberflächenstruktur, des Gehaltes von Epithel-charakterisierenden Enzymen (wie z.B der alkalischen Phosphatase) und der Cytokeratine (z.B. Cytokeratin 18 und 19) ist ebenfalls zu beobachten. Die Differenzierung von Typ II-Zellen in Typ I-Zellen wird durch Faktoren wie die extrazellulären Matrix und den Keratinozyten-Wachstumsfaktor in vitro und in vivo beeinflusst. Eine Redifferenzierung von Typ I- in Typ II-Zellen ist ebenso in vitro und in vivo möglich (2-5).

2.1.2 Aufbau der alveolo-epithelialen Barrierefunktion und der epithelialen Polarität

Die Alveolarepithelzelle Typ II erfüllt eine wichtige Barrierefunktion. Durch den transepithelialen Na^+ -Transport von der apikalen zur basolateralen Seite wird die Flüssigkeit in den Alveolen minimiert (1). Transportierende Epithelien formen Permeabilitätsbarrieren zwischen zwei Kompartimenten im Körper (z.B. Alveole und Interstitium) und transportieren vektoriell Ionen und Proteine. Dies erfordert eine besondere strukturelle und funktionelle Organisation der Zellen: 1.) unterscheiden sich die apikale und die basolaterale Plasmamembran strukturell und funktionell. Jede Membran enthält spezifische Proteine, die den Ionen- und Flüssigkeitstransport durch das Epithel regulieren (z.B. Na^+ - K^+ -Kanal, Na^+ -K-ATPase); 2.) sind spezielle Zelladhäsionskomplexe und Zytoskelettorganisationen erforderlich, um den Zell-Zell-Kontakt und die Zellverbindung zur extrazellulären Matrix aufrecht zu erhalten; 3.) werden Unterschiede in der Verteilung von Membranproteinen zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembrandomäne durch spezifische Mechanismen des zellulären Proteintransports wie dem Golgi-Apparat (*trans*-Golgi network) und

Endosomen reguliert (6-10). Substanzen können durch aktiven oder passiven Transport entweder auf transzellulärem oder parazellulärem Weg durch die Epithelzelle gelangen (11). Nicht-elektrolytische, lipidlösliche Moleküle können teilweise einfach die Zellmembranen permeieren. Permeabilitätsstudien beschreiben eine positive Korrelation zwischen zunehmender Lipidlöslichkeit und der verbesserten Fähigkeit, den epithelialen Zellrasen zu durchqueren. Elektrolyte und hydrophile Nichtelektrolyte passieren das Epithel eher auf parazellulärem Weg, z.B. durch Poren. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen der Diffusionsrate und dem Molekulargewicht (11-14).

Für das Alveolarepithel spielen einige weitere Faktoren bei Ausbildung der Polarität an apikaler und basolateraler Membran eine Rolle. So werden neusynthetisierte Surfactantkomponenten (Lipide und Proteine) aus Lamellarkörperchen apikal, Fibrinogen hingegen zu 80% basolateral sezerniert. Dieser Prozeß wird mit lokalen Schäden, Entzündungsprozessen und Reparaturmechanismen assoziiert (15). Für bovines Serum-Albumin, Transferrin und Immunglobulin G konnte ein bevorzugter Proteintransport von apikal nach basolateral gezeigt werden. Für Cytochrom c und G-CSF herrschen für die apikal-basolaterale und basolateral-apikale Flußrichtung symmetrische Flußbedingungen vor (16). Bei Alveolarepithelzellen von Kaninchen ist die Kinetik des apikalen Guanidin-Uptake im Vergleich zum basolateralen kinetisch unterschiedlich, was auf einen Carrier-vermittelten organischen Kationentransport hinweist (17). Ebenso ist der Elektrolyt- und Flüssigkeitstransport im Alveolarepithel asymmetrisch polarisiert (18).

Die Alveolarepithelzellen Typ II werden durch einen interzellulären junctionalen Komplex miteinander verbunden und bilden so die epitheliale Barriere. Dieser Komplex besteht aus vier Hauptkomponenten: 1.) den zonulae occludentes (tight junctions), 2.) den zonulae adherentes (Gürteldesmosomen), 3.) den maculae adherentes (Fleckdesmosomen) und 4.) den Nexus (gap junctions). Die tight junctions bestimmen wesentlich den parazellulären Stofftransport durch den Alveolarraum. Sie haben zudem kleine Zwischenverbindungen, die als Verankerungen des apikalen Zytoskeletts mit Aktin und anderen filamentösen Proteinen angereichert sind. Unterschiede in der Struktur und der Zusammensetzung der tight junctions verändern den parazellulären Shunt. Dadurch, daß die tight junctions den parazellulären Fluß begrenzen, sind sie essentiell für die Aufrechterhaltung der epithelialen und endothelialen Barriere. Sie stellen jedoch keine absolute Barriere dar, sondern sind semipermeabel, erlauben somit die Passage nur bestimmter Moleküle. Die Barrierefunktion kann durch physiologische

und pathologische Stimuli verändert werden. Es gibt zahlreiche Signalmoleküle, von denen angenommen wird, daß sie die tight junction Funktion regulieren. Hierzu zählen: Tyrosinkinase, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Ca^{2+} , Proteinkinase C (PKC), heterotrimere G-Proteine und die Phospholipase C. Ein häufiges Ziel dieser Moleküle sind Aktin und der perijunktionale Aktin-Myosin-Ring, der unter dem apikalen tight junction Komplex liegt. Es gibt Hinweise darauf, daß perijunktionale Aktin-Filament-Kontraktionen und der daraus resultierende zentrifugale Zug auf die tight junction-Membranen die tight-junction Permeabilität regulieren. Die Desmosomen bilden charakteristischerweise Verdichtungen im Interzellularraum und Haftplatten aus. Beides dient vor allem der Zellhaftung. Die Nexus (gap junctions) sind auf den interzellulären Fluß von Ionen und anderer kleiner Moleküle zwischen den Typ I- und Typ II-Zellen spezialisiert (11-13,19-24).

2.1.3 Epitheliale Signal-Transduktionswege im Rahmen der Zellaktivierung bei oxidativem Streß

In dieser Arbeit wurde neben Stickstoffmonoxid (NO) auch H_2O_2 als Stimulans eingesetzt. Es sollte der Einfluß von NO auf die alveolo-epitheliale Barriere bei oxidativem Streß untersucht werden. Beide Stimuli haben aber auch die Funktion eines second messengers. Des weiteren wurden Forskolin und Ilomedin, beides Stimulanzien der Adenylatzyklase, eingesetzt und deren Einfluß auf oxidativen Streß im Vergleich zu NO untersucht.

NO wird von zahlreichen Säugetierzellen gebildet und freigesetzt. NO entsteht aus der schrittweise ablaufenden Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin. Diese Reaktion wird durch eine Reihe von Enzymen bewerkstelligt, z.B. durch die NO-Synthetasen. NO selbst aktiviert unter anderem die zyklische Guanylatzyklase, erhöht dadurch den intrazellulären cGMP-Level in der Zielzelle und initiiert als Botenstoff zelluläre Funktionen (z.B. Öffnung von Membrankanälen). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß NO bei der akuten und chronischen Inflammation, beim „systemic inflammatory response syndrome“ und der Sepsis eine Rolle spielt. In den vorliegenden Experimenten wurde NO durch exogen applizierte NO-Donatoren (SNAP, Spermine NONOate) freigesetzt (25,26). Ausführlich wird auf NO und seine Funktion im Kapitel 2.7 eingegangen.

Die Bedeutung des cGMP als second messenger wurde in dieser Arbeit für die Alveolarepithelzellen Typ II besonders untersucht. cGMP wird durch die Guanylatzyklase

gebildet, die Teil des Rezeptormoleküls sein oder als lösliche Guanylatzyklase an einen aktivierten Rezeptor binden kann. cGMP wirkt über sogenannte G-Kinasen. Ein Substrat der G-Kinase ist die Ca^{2+} -ATPase in der Zellmembran und in Organellen. Sie pumpt Ca^{2+} aus dem Zytosol und senkt damit die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Über cGMP wirken neben Stickstoffmonoxid auch Atriopeptin (atrialer natriuretischer Faktor) (27-29) (Abbildung 1).

cAMP stellt einen weiteren wichtigen second messenger dar. Ein stimulierendes G-Protein aktiviert die membranständige Adenylatzyklase und wandelt Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat um. Die Adenylatzyklase kann aber über ein inhibierendes G-Protein gehemmt werden. cAMP aktiviert bestimmte Proteinkinasen (A-Kinasen), die Enzyme und Transportproteine durch Phosphorylierung aktivieren oder inaktivieren können. cAMP kann auch die Synthese von Enzymen und Transportproteinen stimulieren. Phosphodiesterasen spalten und inaktivieren es schließlich. Phosphatasen dephosphorylieren Substrate von Proteinkinasen und beenden die first messenger-Wirkung, wenn kein neues cAMP gebildet wird (27,30) (Abbildung 1).

H_2O_2 kann als Auslöser von oxidativem Streß fungieren und wurde aufgrund dieser Eigenschaft in dieser Arbeit als Stimulans eingesetzt. H_2O_2 und Superoxidanionen als Vertreter reaktiver Sauerstoffmetaboliten (reactive oxygen species/ ROS) sind aber auch ein integraler Bestandteil bei der Signalvermittlung an membranösen Rezeptoren und können im Rahmen der Signaltransduktion als second messenger Bedeutung haben. H_2O_2 kann beispielsweise spezifische Sulfhydrylgruppen (-SH) oxidieren und so Cystein-Sulfensäure (CysS-OH) oder Disulfidreste produzieren. Zahlreiche Serin/Threonin-Kinasen, wie die cAMP-abhängige Kinase (PKA), cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), Akt-Kinase, S6-Kinase und Proteinkinase C (PKC), enthalten Cys-SH-Reste. Möglicherweise bewirkt die Oxidation der Cys-SH-Reste eine veränderte Aktivität dieser Kinasen. Die intrazelluläre Bildung von cAMP und cGMP kann so zum Beispiel beeinträchtigt werden. Außerdem wird eine Regulation der Kinase-Untereinheiten durch reversible und modulierte Oxidation der Cys-SH-Reste diskutiert. In Säugetierzellen konnte außerdem gezeigt werden, daß eine Vielzahl externer Stimuli die intrazelluläre Konzentration von ROS erhöht und eine Blockade dieser Reaktion die Signalkaskade hemmt (31-33). Die möglichen Effekte von H_2O_2 und reaktiven Sauerstoffmetaboliten auf die parazelluläre Permeabilität sind in Abbildung 2 dargestellt und werden im folgenden Kapitel erörtert.

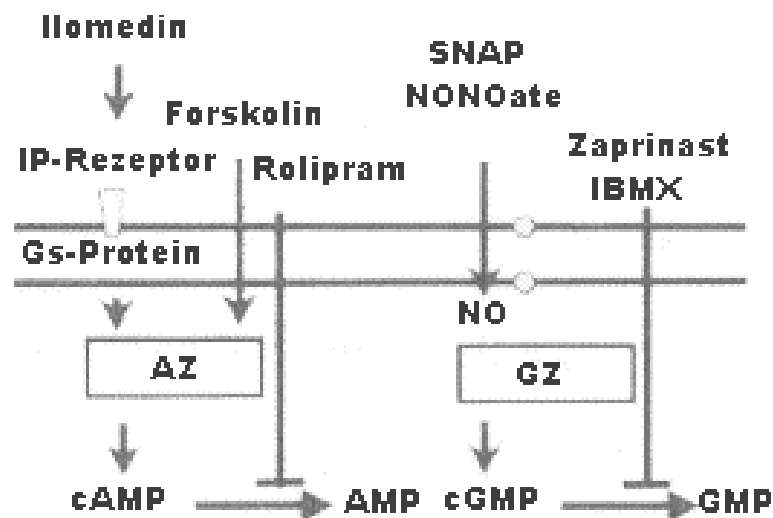


Abbildung 1: Schematische Darstellung der postulierten Signaltransduktionswege der eingesetzten Stimuli.

NO wird durch SNAP und Spermine NONOate freigesetzt und stimuliert die Guanylatzyklase (GZ) und folglich die cGMP-Bildung. Der cGMP-Abbau wird von den Phosphodiesterase-Inhibitoren Zaprinast und IBMX gehemmt. Ilomedin/Iloprost stimuliert Rezeptor-vermittelt (IP-Rezeptor) und Forskolin direkt die Adenylatzyklase (AZ) und folglich die cAMP-Bildung. Der cAMP-Abbau wird durch den Phosphodiesterase-Inhibitor Rolipram gehemmt.

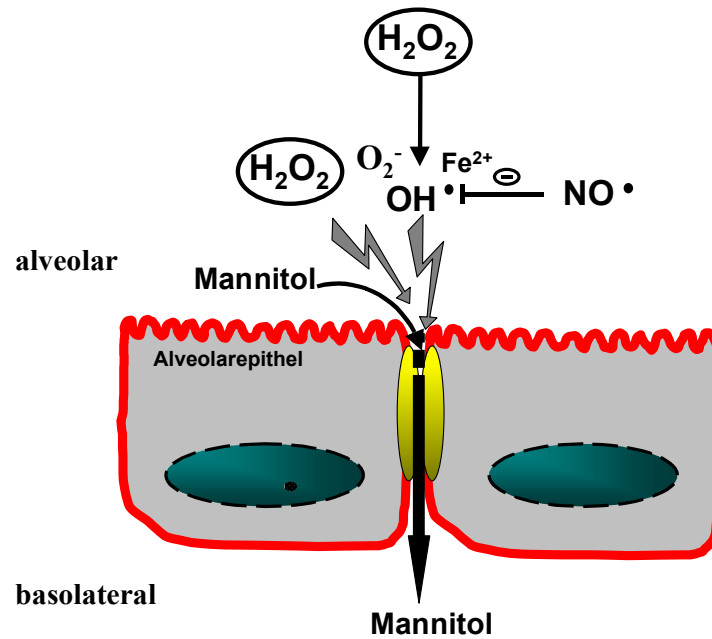


Abbildung 2: Oxidativer Streß auf das Alveolarepithel. Mögliches Ziel von H_2O_2 und reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS) sind die tight junctions. Als Folge dieser Reaktion kann es zur Erhöhung des parazellulären Mannitolflusses kommen. Die Einflußmöglichkeit von NO auf oxidativen Stress durch H_2O_2 und andere reaktive Sauerstoffmetaboliten wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

2.2 Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere durch drei unterschiedliche Mechanismen

Die Funktion des Epithels kann durch unterschiedliche Mechanismen beeinträchtigt werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluß von NO bei der Schädigung der epithelialen Barriere untersucht. Als Modell für die alveolo-epitheliale Barrierschädigung dienten hier Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das per se, aber auch durch seine Metaboliten OH^\cdot , $O_2^{\cdot-}$ und OH^- oxidativen Streß verursacht, das porenbildende bakterielle Exotoxin von Escherichia coli Hämolysin A (ECH) und Protamin, das als Polykation die Zellmembraneigenschaften durch Veränderung der Zellpolarität beeinflusst. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Stoffe näher charakterisiert werden.

2.2.1 Der Einfluß von oxidativem Streß durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) an der epithelialen Barriere

Normalerweise befindet sich die Lunge durch zahlreiche protektive intra- und extrazelluläre Verteidigungssysteme, die toxischen Oxidantien (entstehend durch normale Zellfunktionen oder Prooxidantien) entgegenwirken, in einem abgestimmten Gleichgewicht. Die Vielfältigkeit dieser Systeme und ihre sich überlappenden spezifischen Aktivitäten machen die Notwendigkeit einer strengen Kontrolle der Redoxbalance für die Aufrechterhaltung der pulmonalen zellulären Funktion deutlich. Ein Ungleichgewicht, entweder durch verstärkten oxidativen Streß oder durch den Verlust antioxidativer Ressourcen, kann die physiologische Funktion der epithelialen Barriere beeinträchtigen. Oxidativer Streß kommt im Lungenparenchym z.B. durch Inhalation anorganischer Stäube, Gasinhalation, Rauchen und die Ischämie-Reperfusion zustande (34-37).

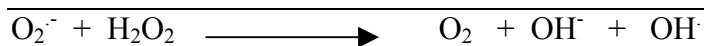
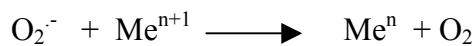
Im Rahmen der Inflammation in der Lunge oder dem Alveolarraum kann es zur Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten (PMN) und Makrophagen kommen. In diesen Zellen kommt es unter erhöhtem Sauerstoffverbrauch und erhöhtem Glukosemetabolismus zum „respiratory burst“. Das membranassoziierte NADP(H)/NAD(H)-System scheint hierbei für den hohen Sauerstoffverbrauch verantwortlich zu sein. In Verbindung mit dem erhöhten Sauerstoffverbrauch sezernieren PMN und Makrophagen Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid. Proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor und IL-6 fördern diesen Prozeß. Bekannt ist, daß PMN in vitro toxisch auf Alveolarepithelien wirken

und die Permeabilität von Typ II-Zellen erhöhen. Mehr als 90 % des von PMN beim „respiratory burst“ verbrauchten Sauerstoffs geht in die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung ein. Das meiste des während der Phagozytose freigesetzten H_2O_2 entstammt der Dismutation von $O_2^{\cdot-}$: Dabei reagieren zwei Moleküle $O_2^{\cdot-}$ miteinander, eines wird oxidiert, das andere reduziert. Dies führt zur Bildung von H_2O_2 und Sauerstoff. Man unterscheidet eine spontane und eine katalysierte Dismutation durch die Superoxid-Dismutase (SOD) (38,39).

Weitere reaktive Sauerstoffmetaboliten, die bei der Aktivierung phagozytischer Zellen entstehen, sind das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), das einwertige Sauerstoffmolekül (1O_2) und die Hypochlorsäure (HOCl). Die Entstehung von OH^{\cdot} wird auf die modifizierte Haber-Weiss Reaktion, auch Fenton-Reaktion genannt, zurückgeführt. Bei der Fenton-Reaktion reagiert das $O_2^{\cdot-}$ erst mit einem Spurenmetall, meistens Eisen, reduziert es und läßt Sauerstoff entstehen. Die reduzierte Form des Metalls reagiert dann mit dem H_2O_2 , regeneriert das initial oxidierte Metall und bildet OH^{\cdot} und OH^{\cdot} (40-42) .

Modifizierte Haber-Weiss Reaktion

Fenton-Reaktion



Die klassische Haber-Weiss Reaktion involviert die direkte Reduktion von H_2O_2 durch $O_2^{\cdot-}$ mit der Bildung von OH^{\cdot} , O_2 und OH^{\cdot} . Diese Reaktion läuft unter physiologischen Bedingungen sehr langsam ab und stellt kaum signifikante Mengen an Hydroxylradikalen bereit (40-42).

Klassische Haber-Weiss Reaktion



Der genaue Mechanismus, wie die vom Sauerstoff abstammenden freien Radikale und ihre Metaboliten die Zelle und die Barriere schädigen, ist nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden die Zellyse, die Lipidperoxidation, die Aktivierung der Guanylatzyklase und die Inhibition und Abkopplung zellulärer Membranenzyme. Die intensive Reaktivität und Zytotoxizität von $\text{OH}\cdot$ verglichen mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 implizieren, daß es ein äußerst bedeutendes schädigendes Molekül unter den freien Radikalen ist. Die Limitierung der Metallverfügbarkeit zur Vermeidung der $\text{OH}\cdot$ -Bildung scheint dabei eine primäre antioxidative Strategie der Zelle zu sein. Laktoferrin beispielsweise (ein Eisen-bindendes Protein) kann die $\text{OH}\cdot$ -Produktion in vitro erhöhen, wahrscheinlich durch seine katalytische Fähigkeit, Eisen für die Reduktion von H_2O_2 durch $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu Verfügung zu stellen. Deshalb können lysosomale Granula zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen beitragen. Daß Laktoferrin auch in die extrazelluläre Matrix nach der Aktivierung von PMN abgegeben wird, könnte eine entscheidende Ursache für die Potenzierung des Zell- und Gewebeschadens durch $\text{OH}\cdot$ sein. Ein zweiter Mechanismus für die $\text{OH}\cdot$ -Bildung kann die Reaktion von $\text{OH}\cdot$ mit Hydroxyperoxiden bei der Lipidperoxidation von sein. Diese Quelle von $\text{OH}\cdot$ ist jedoch abhängig von der Oxidation von Lipiden zu Lipidperoxiden, die wiederum mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ reagieren. Dieser Prozeß der $\text{OH}\cdot$ -Radikalproduktion könnte nach initialer Lipidperoxidation ein Verstärkungsmechanismus für die kontinuierliche Produktion von $\text{OH}\cdot$ sein. Welcher dieser beiden Mechanismen in vivo mehr zutrifft, ist unklar (35,43-45).

Es sind bereits zahlreiche Effekte von H_2O_2 an Alveolarepithelzellen bekannt. Subletale H_2O_2 -Konzentrationen vermindern die Surfactant-Phosphatidylcholin-Biosynthese und führen unabhängig davon zu einer intrazellulären Verminderung von Adenosintriphosphat (ATP) (46). Subletaler oxidativer Streß hemmt bei Typ II-Zellen nicht nur die Rezeptor-vermittelte Surfactantproduktion, sondern verhindert auch die Rezeptor-vermittelte Stimulation der second messenger (47). Bei frisch isolierten Typ II-Zellen sinkt der intrazelluläre ATP-Gehalt bei 100 μM H_2O_2 -Applikation um 50% (48). Es wird dabei das die Phospholipidbiosynthese regulierende Enzym Phosphorylcholin-Cytidyltransferase gehemmt. Bei H_2O_2 -Applikation kommt es zur Ca^{2+} -abhängigen und -unabhängigen Hydrolyse von Phosphatidylcholin sowie bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen zur Zellyse. Es besteht des weiteren ein Zusammenhang zwischen Zellyse und der Aktivität der Phospholipase. Eine erhöhte Phospholipase-Aktivität kann eine erhöhte Zellyse durch direkten Angriff an Membranlipiden oder durch Ansammlung detergentienartiger, katabolischer Produkte zur Folge haben (32,49). Auch DNA-Schäden können unter dem Einfluß von H_2O_2 entstehen (50). Kang et al. diskutieren,

daß die DNA-Schädigung durch $\text{OH}\cdot$ -Bildung vermittelt wird. Die schädigenden Hydroxylradikale werden demnach von dem Cu,Zn-Superoxid-Dismutase- und Wasserstoffperoxid-System gebildet. (51). Durch die Superoxidproduktion bei Mycobakterien und Pseudomonaden können die Aconitaseaktivität, der Energiehaushalt und andere Zellfunktionen beeinträchtigt werden (52). Im Trachealepithel induziert H_2O_2 über die Ceramidbildung die Apoptose (53). Diese Tatsachen unterstreichen den bedeutenden Einfluß von H_2O_2 auf die Zellfunktionen.

2.2.2 Der Einfluß des Polykations Protamin an der epithelialen Barriere

PMN schädigen andere Zellen durch ihre Sauerstoffmetaboliten, Enzyme (z.B. Proteasen) sowie Effekte von Komponenten mit positiver Ladung. Kationische Sekretionsprodukte der Neutrophilen Granulozyten, wie die Protease Kathepsin G und Defensine, erhöhen die Permeabilität kultivierter Epithelzellen aufgrund ihrer positiven Ladung. Das „eosinophil cationic protein“ und das „eosinophil major basic protein“ sind durch einen ladungsbedingten Effekt potentiell zytotoxisch, und dieser wird durch saure Polyamino­säuren inhibiert. Polykationen wie Protamin wurden bisher genutzt, um solche toxischen Ladungseffekte zu reproduzieren.

Die Polykationen reagieren mit den Anionen der Zellmembran. Der permeabilisierende Effekt läßt sich komplett durch Polyanionen wie Heparin oder Albumin, welche bei physiologischem pH als Anionen vorkommen, inhibieren. Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß bei Protamin-Applikation Veränderungen an den tight junctions mit Erweiterung der Interzellularspalten entstehen. Des weiteren kommt es zu Inhomogenitäten in der peripheren Aktinstruktur und zu Veränderungen in der Verteilung des tight junction-Proteins ZO-1 (54-56).

Protamin erhöht die Permeabilität epithelialer Monolayer, schädigt Endothelzellen, erhöht die mikrovaskuläre Permeabilität und produziert ein pulmonales Ödem bei Hinzugabe zu plasmafreiem Perfusat isolierter Lungen. Die kationischen Ladungen haben unterschiedliche Effekte auf das Alveolarepithel. Polykationen, die in den Alveolarraum appliziert werden, verursachen unmittelbar eine erhöhte alveoläre parazelluläre Permeabilität. Die Fähigkeit des Epithels, Na^+ zu transportieren, bleibt jedoch unverändert. Die alveoläre Flüssigkeitsresorption bleibt ebenfalls unbeeinträchtigt. Bei vaskulärer Applikation kommt es auch zu zytotoxischen Effekten (54-57).

2.2.3 Der Einfluß des Porenbildners E. coli Hämolysin A (ECH) an der epithelialen Barriere

In dieser Arbeit wurde das proteinerge Exotoxin E. coli Hämolysin A mit seinen membranpermeabilisierenden Eigenschaften verwendet, um dessen Einfluß auf die epitheliale Barriere zu untersuchen. Aufgrund der Wirkung von ECH, die sowohl auf artifiziellen Lipidbilayern als auch an intakten Membranen lebender Granulozyten, Erythrozyten und Endothelzellen demonstriert werden konnte, wurde eine funktionelle Zuordnung des ECH zu der Gruppe der Porenbildner vorgeschlagen (Porendurchmesser 1-2 nm) (58,59).

ECH wird bei 50% der Escherichia coli-Isolate Gram-negativer bakterieller extraintestinaler Infektionen des Menschen gefunden. Dieses Toxin scheint hierbei der dominierende Virulenzfaktor zu sein, denn über 50% der E.coli-Stämme, die extraintestinale Infektionen verursachen, geben das ECH in den Überstand ab, wohingegen die Inzidenz von E.-coli-Isolaten aus menschlichem Stuhl mit 5-10% relativ niedrig ist (60,61).

Die transmembranöse Porenbildung beeinflusst einerseits das innere Milieu der Zelle, was andererseits zur ATP-Verarmung und zum Zelluntergang führt, ebenso aber bei ausreichenden Reparaturmechanismen (Endozytose) oder subletaler Schädigung Signaltransduktionswege initiieren kann. An dem Modell der isolierten, blutfrei perfundierten Kaninchenlunge induziert ECH in subhämolytischen Konzentrationen einen arteriellen Druckanstieg und die Ausbildung eines massiven Ödems. In vielen verschiedenen tierexperimentellen Versuchsansätzen führte isoliertes ECH zu schweren Krankheitsbildern, die den klinisch beobachteten Verhältnissen entsprechen (62-65).

2.3 Reaktionen des Alveolarepithels auf oxidativen Streß

Der Zusammenbruch der Barrierefunktion des Alveolarepithels kommt bei akuten und chronischen entzündlichen Prozessen der Lunge vor. Dies ist insbesondere beim „adult respiratory distress syndrome“ (ARDS) zu beobachten, bei dem bevorzugt Typ I-Zellen Schädigungen zugefügt werden, die sich elektronenmikroskopisch in Form von Nekrosen und der Ablösung der Basalmembran darstellen. Der Grund für diese erhöhte Anfälligkeit ist bisher jedoch unklar. Ein pathogenetischer Weg der Schädigung ist die Bildung von Oxidantien während des Entzündungsgeschehens (66). In vivo- und in vitro-Studien haben gezeigt, daß Typ II-Zellen eine hohe Katalaseaktivität besitzen, Typ I-Zellen jedoch eine geringe. Die Katalaseaktivität nimmt im Rahmen der Differenzierung von der Typ II-Zelle in die Typ I-Zelle signifikant ab. Dieser relative Mangel an Katalase bedeutet wohl ein größeres Risiko für die Typ I-Zelle, oxidativer Schädigung ausgesetzt zu sein. Andere antioxidative Enzyme wie z.B. die Kupfer/Zink- und Manganhaltige-Dismutase können hier Einfluß nehmen. Der Gehalt von einem oder beiden Enzymen kann während des oxidativen Stresses ansteigen und somit das Ausmaß der zellulären Schädigung begrenzen (35).

Wichtige Veränderungen des Alveolarepithels durch oxidativen Streß:

- Veränderung des Ionenflusses (verminderter Natriumionenfluß, Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase)
- Veränderung der parazellulären Permeabilität
- Aktivierung antioxidativer Verteidigungsmechanismen (Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion)
- Antigenpräsentation gegenüber Lymphozyten (intracellular adhesion molecule (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule (VCAM-1))
- Freisetzung proinflammatorischer Proteine (Zytokine, Wachstumsfaktor, Komplement)

In dem folgenden Kapitel sollen die antioxidativen Verteidigungsmechanismen der Typ II-Zellen erörtert werden.

2.4 Antioxidative Verteidigungsmechanismen des Alveolarepithels

Alveolarepithelzellen besitzen ein ausgefeiltes System zum Schutz vor oxidativem Streß. Die antioxidativen Mechanismen können definiert werden als ein Prozeß, der: 1.) die Formation freier Radikale verhindert; 2.) Oxidantien zu weniger toxischen Produkten konvertiert; 3.) kompartimentierte reaktive Produkte von vitalen Zellstrukturen fernhält oder 4.) molekulare Schäden repariert (35,67-70). Im Folgenden sollen die einzelnen Verteidigungssysteme näher beschrieben werden.

2.4.1 Katalase

Die Katalase ist ein tetramerisches Hämoprotein mit einem Molekulargewicht (MW) von 240000 Dalton (Da), welches in Anwesenheit von H_2O_2 die Dismutationsreaktion



katalysiert. Die Katalase hat eine beachtliche reduzierende Aktivität für kleine Moleküle, wie H_2O_2 und Methyl- oder Ethylhydroxyperoxide. Sie metabolisiert aber keine großmolekularen Peroxide, wie Lipidhydroperoxidprodukte der Lipidperoxidation. Die Katalase ist ein aktives Enzym mit hoher Reaktionskapazität, aber niedriger Substrataffinität. Sie kommt vorwiegend in Peroxisomen vor, die viele Enzyme zur H_2O_2 -Bildung enthalten (35,40,71).

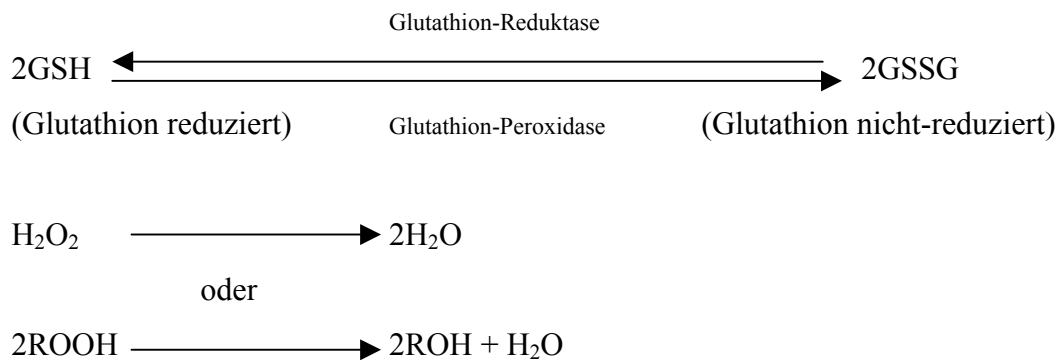
Bei Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II gibt es Unterschiede in der Katalaseaktivität. Die Katalaseaktivität nimmt in vivo und in vitro bei der Typ II-Zelle vom 2. zum 7. Tag hin ab, wobei jedoch keine Unterschiede im Glutathion-abhängigen System festzustellen sind. Histochemisch dargestellte Peroxisomen der Typ II-Zelle und nur wenige der Typ I-Zelle zeigen eine Katalaseaktivität. Dies macht wahrscheinlich, daß, sobald sich eine Typ II-Zelle zur Typ I-Zelle differenziert, letztere anfälliger für H_2O_2 -induzierte Schäden ist (68,69).

Untersuchungen an Alveolarepithelzellen Typ II zeigen, daß die Integrität der alveolärepithelialen Barriere (gemessen anhand des Ionenstroms und der Leitfähigkeit) durch H_2O_2 kompromittiert wird. Die basolaterale Zellmembran scheint dabei gegenüber dem H_2O_2 sensitiver zu sein als die apikale. Ursache dieser Beobachtung ist wahrscheinlich, daß die Katalase an der apikalen Membran lokalisiert ist und H_2O_2 bei der Zellpassage von dieser größtenteils degradiert wird, bevor es wichtige Membrankomponenten erreicht. Basolateral appliziertes H_2O_2 hingegen kann direkt an Membrankomponenten, die basolateral lokalisiert sind (z.B. an der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Adenosintriphosphatase), angreifen (72).

2.4.2 Das Glutathion-Redoxsystem

Das Glutathion-Redoxsystem ergänzt das Katalase-System bei der Reduktion von H_2O_2 , aber übertrifft es in seiner Kapazität, zusätzliche toxische Hydroperoxide zu eliminieren. Große Lipidperoxidmoleküle, die durch Angriffe freier Radikale auf Lipidmembranen entstehen können, und Produkte der Lipoxygenase-katalysierten Reaktionen werden ebenfalls durch das Glutathion-Redoxsystem metabolisiert.

Das Schlüsselenzym des Redoxzyklus für die Reduktion von Hydroperoxiden ist die Glutathion-Peroxidase (GSH-Px). Sie ist ein 85000 Da großes tetramerisches Protein mit vier Selenatomen, die als Selen-Cysteinhälften gebunden sind, und besitzt katalytische Aktivität. GSH-Px benötigt unbedingt Glutathion (GSH, ein Sulfhydryl enthaltendes Tripeptid) als Cosubstrat, wird durch OH^- und O_2^- inaktiviert und katalysiert die Reaktion, die oxidiertes Glutathion bildet (GSSG):



R=Rest

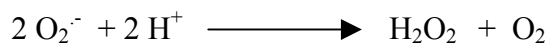
Die GSH-Reduktase ist ein Dimer-Protein (105000 Da), das die Reduktion leichtmolekularer, aber nicht gemischter Disulfide katalysiert:



Für die Regeneration des reduzierten GSH ist die Anwesenheit von NADPH-reduzierenden Äquivalenten notwendig, welche durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Hexose-Monophosphatzyklus gewonnen werden. Die zelluläre Verteilung der GSH-Px ist eng an die GSH-Reduktase gebunden. Beide Enzyme kommen vorwiegend im Zytosol vor, obwohl Mitochondrien ebenfalls GSH-Redoxaktivität besitzen und auch eine GSH-Px im Plasma vorkommt. Hierin liegt wohl auch die größere Bedeutung des GSH-Redoxsystems gegenüber der Katalase, die größtenteils in Peroxisomen vorkommt (35,40,42).

2.4.2 Superoxid-Dismutase (SOD)

Die SOD stellt ein Enzymsystem dar, das spezifisch mit O_2^- als Substrat reagiert und die zweite Abwehrschicht nach der GSH-Px und der Katalase bildet. SOD katalysiert folgende Reaktion:



Der Beitrag der SOD zu den antioxidativen Mechanismen variiert mit den experimentellen Bedingungen. In einigen verstärkt SOD die Lipidperoxidation, während in anderen die Membranschädigung verhindert wird. Diese gegensätzlichen Effekte werden von dem Vorhandensein von freiem Eisen und Katalase mitbestimmt. Kommt Eisen im Überschuss vor, kann SOD die OH-Bildung und den Gewebsschaden durch die Bildung von H_2O_2 , welches in der Haber-Weiss Reaktion mit Fe^{3+} reagiert, verstärken. Falls das Eisen kompartimentiert in der Zelle vorliegt und nicht für die Reaktion verfügbar ist, können die Katalase und Peroxidase das von SOD gebildete H_2O_2 in nicht-toxische Produkte umwandeln. Unter diesen Bedingungen hat SOD protektive antioxidative Effekte, da es O_2^- eliminiert, das sonst Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren und so die OH-Bildung fördern würde. In dem Fall, daß die Katalase das gebildete H_2O_2 insuffizient metabolisiert, kann SOD den Gewebeschaden verstärken.

SOD, Katalase und GSH-Peroxidase können als komplementäre Enzymsysteme angesehen werden, die gemeinsam oxidativen Stress zu begrenzen helfen und sich gegenseitig vor Inaktivierung bewahren. H_2O_2 kann die SOD inaktivieren, und O_2^- kann die Funktion von Katalase und Peroxidase blockieren (35,40,42).

2.5 Ionentransport im Alveolarepithel

In vitro- und in vivo-Studien konnten zeigen, daß das Alveolarepithel ein absorbierendes Epithel ist, welches Na^+ vom Alveolarraum in das Interstitium transportiert. Der Alveolarraum selbst wiederum ist mit einem kleinen Anteil von Alveolarflüssigkeit (epithelial lining fluid) ausgekleidet. Die Reabsorption von isotonischer Flüssigkeit vom Alveolarraum in den pulmonalen Gefäßkreislauf erfolgt gegen einen osmotischen Druckgradienten. Dieser Vorgang ist durch Amilorid und Ouabain hemmbar. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitsbilanz im Alveolarraum, ganz besonders bei pathologischen Prozessen, in denen passive Kräfte beeinträchtigt sind. Amilorid-sensitive Natriumkanäle in der apikalen Membran sind in einer Reihe von Epithelien gefunden worden und stellen eine wichtige Klasse von Proteinen dar, die den Natrium-Transport und die Flüssigkeits-Homöostase aufrechterhalten. Bisher sind zwei verschiedene Natriumkanäle identifiziert worden. Der eine besitzt eine hohe Affinität zu Benzamil und Amilorid, aber eine geringe zu 5-(N-ethyl-N-isopropyl) Amilorid (EIPA). Kanäle der anderen Kategorie haben eine geringere Amiloridaffinität und zudem eine unterschiedliche pharmakologische Sensitivität gegenüber seinen Analoga. An der basolateralen Membran wird das Na^+ aktiv durch eine Ouabain-sensitive $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -Pumpe geschleust (73,74).

Radioaktive Flux- und Ionenstrommessungen bei frisch isolierten und kultivierten Typ II-Zellen, die auf porösen Membranen kultiviert wurden, zeigen nach dem Koefeld-Johnsen- und Ussing-Modell einen Transport von Na^+ . Na^+ durchdringt die apikale Membran entlang dem bevorzugten elektrochemischen Gradienten mit Hilfe von Na^+ -Transportsystemen, z.B. dem Na^+ -D-Glukose-Symport, dem Na^+ -Aminosäure-Cotransport, einem $\text{Na}^+\text{-H}^+$ Antiport, einem Kationenkanal und ebenfalls durch Diffusion (75-78).

Zusätzlich zu den Na^+ -Transportern besitzen Typ II-Zellen zahlreiche Transporter, die den intrazellulären pH regulieren, so den $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ Austauscher, einen $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ Symport und einen $\text{Na}^+\text{-H}^+$ Antiporter (eine H^+ -ATPase), der für den niedrigen pH in der Alveolarflüssigkeit verantwortlich sein soll (79). Beeinflußt werden kann der Na^+ -Transport durch Substanzen, die das intrazelluläre Adenosinmonophosphat via Adenylatzyklase erhöhen: Hier sind beta-adrenerge Agonisten und das Cholera-Toxin zu nennen, sowie das cAMP-Analogen 8-bromo-cAMP. Ähnliche Ergebnisse zeigen Phosphodiesterase-Inhibitoren, welche die Hydrolyse von cAMP verhindern (80,81).

2.6 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) für das Alveolarepithel

Stickstoffmonoxid ist eine freie Radikalspezies, die von einer Vielzahl von Säugetierzellen produziert wird. Im Endothel ist NO als „endothelial derived relaxing factor“ (EDRF) bekannt geworden, wobei man annimmt, daß es nur einen Vertreter von mehreren EDRF repräsentiert. Hier ist es zumindest neben dem Prostazyklin an der Relaxation der glatten Muskelzellen sowie bei Zellabwehrprozessen beteiligt (29,82). Die anti-inflammatorischen Wirkungen des NO erstrecken sich auf eine Hemmung der Lymphozytenproliferation und der Plättchenaggregation sowie die Produktion von Oxidantien durch Phagozyten (83).

NO ist ein autokriner und parakriner zellulärer Mediator und hat eine komplexe biologische Reaktivität (Abbildung 3). Seine physiologischen Effekte hängen von seiner Konzentration, seinem Redoxstatus, der Natur der Zielmoleküle und der Präsenz freier Radikale ab. Veränderungen in seinem Metabolismus kommen dabei unter zahlreichen pathologischen Bedingungen vor. NO wird nicht, wie die meisten bioaktiven Moleküle, gespeichert, muß nicht durch Exozytose aus der Zelle geschleust werden und reagiert nicht mit spezifischen extrazellulären Rezeptoren. Stattdessen wird es ständig in einer gewissen Menge gebildet, was durch externe Stimuli verstärkt werden kann. Es diffundiert frei, bindet an Trägerkomponenten und agiert mit einem intrazellulären Rezeptor, dem Eisen von Hämproteinen. Es hat eine hohe Reaktivität mit entsprechend kurzer Halbwertszeit, einen kleinen molekularen Radius und ist wasserlöslich. NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase und führt zur Bildung von cGMP, das seinerseits via Proteinphosphorylierung durch cGMP-abhängige Kinasen zu einer Vielzahl von NO-assoziierten Effekten führt (84-86).

NO ist als freies Radikal gering reaktionsfreudig, aber führt bei einer Reaktion mit O_2^- zu reaktiveren und potentiell zytotoxischen Sekundärprodukten. Im Rahmen der Inflammation ist von NO bekannt, daß es mit Sauerstoffradikalen interagiert. NO kann durch Superoxidanionen inaktiviert und durch die Anwesenheit der Superoxid-Dismutase geschützt werden (87-89).

NO kann unter geeigneten Bedingungen Peroxynitrit ($ONOO^-$) bilden. Peroxynitrit wandelt sich in Peroxinitritsäure ($ONOOH$) um, die seine konjugierte Säure darstellt. Deren Folgeprodukte können Hydroxylradikal-artige Moleküle sein. Peroxynitrit und seine

Abbauprodukte werden mit Reaktionen in Verbindung gebracht, die Enzymfunktionen und die Signaltransduktion regulieren: Mit der Nitrosilierung einiger Tyrosinmoleküle, der Hemmung von Enzymen der Atmungskette und der Cytochrom c-Oxidase, der Inaktivierung von Natriumkanälen, der Schädigung von DNA-Basen, der Vermittlung bakterizider und endothelialer Zelltoxizität und der Interaktion mit flüchtigen Metallen (29,84,85). Die meisten dieser Reaktionen tragen zur Zellschädigung bei. In diesen Reaktionen kann ONOO^- eine Vorstufe für andere reaktive Produkte sein, einschließlich NO_2^- - und NO_2^+ -Radikalen, und ein Zwischenprodukt mit OH-ähnlicher Reaktivität darstellen. Deshalb wird oft angenommen, daß die Toxizität von $\text{O}_2^{\cdot-}$ durch die Reaktion mit NO-Radikalen über die Bildung von Peroxynitrit potenziert werden kann. Im Einklang mit dieser Vorstellung konnte gezeigt werden, daß die NO-vermittelte Produktion von Peroxynitrit mit dem oxidativen Prozeß bei der Arteriosklerosebildung und der akuten Lungenschädigung zusammenhängt (90,91).

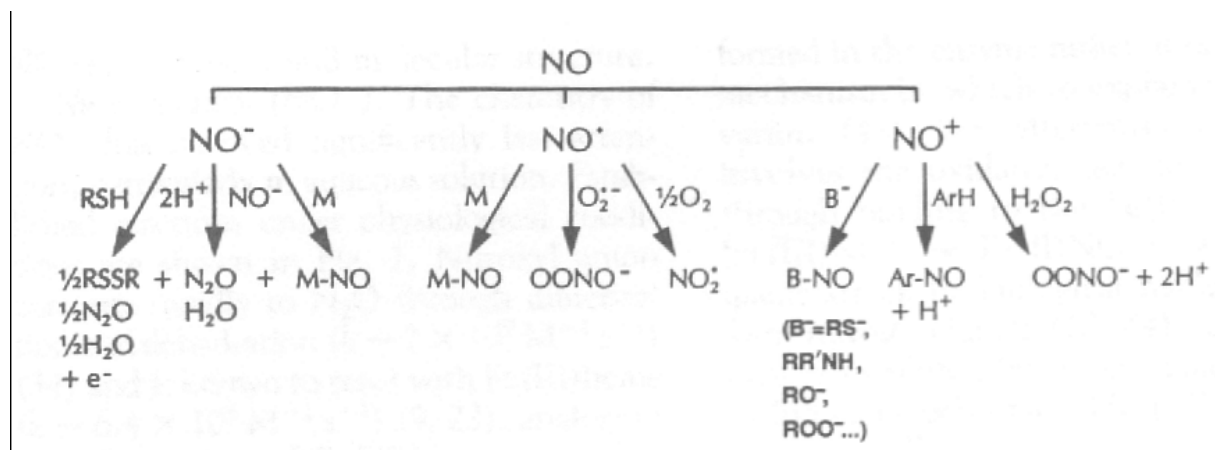


Abbildung 3: Zusammenfassung der Reaktionsprodukte von Stickstoffmonoxid

Reaktionen von NO^{\cdot} finden unter Beteiligung von Sauerstoff, Superoxid und Redoxmetallen (M) statt. NO^- reagiert mit Metallen und Sulfhydrylen. Durch die spontane Dimerisierung von NO^- wird N_2O gebildet. Nitrosationsreaktionen schließen sowohl elektrophile aromatische Substitutionen (Ar) ein als auch den Zusatz von Basen (B^-) wie Peroxid ($\text{R}=\text{Rest}$).

(Stammler et al. Science 1992 (84))

Zelluläre Replikationsprozesse werden bei der Reaktion mit der Ribonukleotid-Reduktase ebenfalls durch NO gehemmt. Die Reaktionen mit spezifischen Enzymen führen letztendlich zur generellen Inhibition der DNA- und Proteinsynthese. Physiologischerweise kann NO seine schädlichen Effekte auf den Blutfluß und die Permeabilität auf mikrozirkulatorischem Level ausüben. Aufgrund der meist niedrigen NO-Gewebkonzentration (<1 μM) entwickelt sich der toxische Effekt gegenüber Häm sowie Eisen-Schwefel oder Thiol enthaltenden Proteinen erst bei supraphysiologischen Konzentrationen von NO und NO-bildenden Agentien (90).

Bei der nichtspezifischen Verteidigung gegen einige pathogene Erreger ist NO eine ebenso notwendige Komponente. Der Reaktionsweg für die Induktion der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) läuft wahrscheinlich über Zytokine, die von Makrophagen und durch Lipopolysaccharide von Gram-negativen Bakterien freigesetzt werden. Diskutiert wird außerdem, daß die iNOS eine Art nichtspezifische Immunität vermittelt, besonders in Organen wie der Lunge und der Leber (28,84).

Erst kürzlich wurde die protektive Rolle von NO bei pathologischen Ereignissen mit einer Überproduktion von ROS beschrieben. So konnte bei zerebrovaskulären, hepatischen, das Splanchnicus-Gebiet betreffenden, renalen, pulmonalen, myokardialen, Inflammations- und Ischämie-Reperfusionen-Modellen gezeigt werden, daß die Stimulation der endogenen NO-Produktion oder die exogene Applikation von NO-Donatoren das Ausmaß des Gewebeschadens auf molekularer und funktioneller Ebene mildert. Interessanterweise wird dieser NO-abhängige protektive Effekt bei einer erhöhten $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Produktion, die für den oxidativen Schaden ätiologische Bedeutung hat, beobachtet (90-92).

Welche Rolle die Signaltransduktion bei der exogenen NO-Applikation in Alveolarepithelzellen Typ II einnimmt, ist bisher ungeklärt. NO reagiert auch mit vielen Proteinen des Alveolarepithels, wobei die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase als zellulärer Signaltransduktionsweg am besten bekannt ist. Die Rolle der cGMP-Bildung nach exogener NO-Applikation bei der Bewältigung des oxidativen Stresses im Alveolarepithel ist auch Thema dieser Arbeit. Unsere Untersuchungen widmeten sich hauptsächlich der exogenen NO-Applikation bei oxidativem Streß auf die alveolo-epitheliale Barriere und sollen einen möglichen Weg für den therapeutischen Einsatz von NO weisen.

Untersuchungen des Ionenstroms ergaben zahlreiche Hinweise darauf, daß NO in Epithelzellen sowohl die Ionenkanäle als auch die Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ durch Veränderung der cGMP- und ATP-Level moduliert oder die Aminosäuren dieser Proteine modifiziert. Compeau et al. konnte bei fetalen Epithelzellen beispielsweise zeigen, daß reaktive Stickstoffderivate, die von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden, die Dichte der von Ca^{2+} aktivierten Kationenkanäle vermindern (93-94).

NO, das im Rahmen der Inflammation u.a. von Typ II-Zellen und Makrophagen produziert wird, moduliert den Na^+ -Iontentransport auch dadurch, daß es sowohl den apikalen Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanal als auch die basolaterale $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ durch einen cGMP-unabhängigen Mechanismus inhibieren und den vektoriellen Na^+ -Transport in Typ II-Zellen vermindern kann (93). Andererseits besitzen Alveolarepithelzellen Typ II einen Na^+ -Kanal, bei dem es nach NO-Stimulation zu einer durch zyklisches Guanosinmonophosphat-vermittelten Inhibition kommt (95).

2.7 Fragestellung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage nach den Auswirkungen unterschiedlicher Schädigungsmechanismen (oxidativer Streß, Porenbildung, Veränderung der Membranpolarität durch Polykationen) auf die alveolo-epitheliale Barriere an Monolayern aus Alveolarepithelzell Typ II und deren mögliche Beeinflußbarkeit durch unterschiedliche exogen zugeführte Substanzen.

Es wurden die Effekte des oxidativen Agens H_2O_2 und dessen Metaboliten sowie des Polykations Protamin und des Porenbildner ECH auf die alveolo-epitheliale Barriere untersucht. Hierzu wurden die Methoden zur Messung des epithelialen Ionenstroms, der Leitfähigkeit und der parazellulären Permeabilität etabliert.

Die Beeinflußbarkeit der epithelialen Barrierschädigung durch NO, NO-Donatoren und cGMP-Analoga wurde herausgearbeitet.

Dabei wurden detailliert die Unterschiede im parazellulären Mannitolfluß bei apikaler bzw. basolateraler H_2O_2 -Applikation sowie zwischen apikaler bzw. basolateraler NO-Applikation untersucht. Des weiteren wurden die möglichen Mechanismen für die protektiven NO-Effekte auf die Barrierefunktion des Alveolarepithels bei oxidativem Streß analysiert. Hierbei kamen die Phosphodiesterase-Inhibitoren IBMX und Zaprinast, Inhibitoren der löslichen Guanylatzyklase wie OEQ sowie cGMP-Analoga zum Einsatz, um die Beeinflussung von Signaltransduktionswegen zu untersuchen.

Folgende Fragen wurden untersucht:

1. In welchem Maß führen Mediatoren der Inflammation zur Öffnung der alveolo-epithelialen Barriere? Welchen Effekt haben hier insbesondere H_2O_2 , Protamin und ECH auf die alveolo-epitheliale Barrierefunktion? Hierzu erfolgte die Etablierung des Mannitol- sowie des Ussing-Kammer-Modells zur Messung der Intaktheit der alveolo-epithelialen Barriere.

2. Welche zellulären und extrazellulären protektiven Mechanismen gibt es zum Schutz vor oxidativem Streß und welche Substanzen spielen hier eine Rolle? Welchen Anteil haben hieran Stickstoffmonoxid, cGMP und cAMP?
3. Welche Wirkung hat die apikale bzw. basolaterale H_2O_2 -Applikation auf die parazelluläre Permeabilität und welche Bedeutung hat hier die apikale bzw. basolaterale Applikation von NO? Welche protektiven Schutzmechanismen spielen für die jeweilige Applikationsweise eine Rolle?
4. Welche Auswirkungen hat H_2O_2 auf den epithelialen Ionenstrom und die Leitfähigkeit? Können diese durch NO beeinflußt werden? Ist dieser Prozeß cGMP-abhängig?

3 Material und Methoden

3.1 Material für die Isolierung von Alveolarepithelzellen Typ II aus Rattenlungen

3.1.1 Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial

- Aqua tridestillata; im Milli Q Wasseraufbereitungssystem entionisiert und gefiltert, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- D-(+)-Glukose, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- EGTA (Chelator mit erhöhter Calcium-Selektivität), Ethylenglykol-bis-(2-amino-äthyläther)-N,N-tetraessigsäure „zur Analyse“, Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
- Entellan, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Fibronectin, Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), mit Aqua dest. und NaCl gelöst, steril filtriert; die Zellkulturplatten wurden für 45 Minuten mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml bei Raumtemperatur beschichtet
- Filter (0,2 µm), Nalgene (Hereford, U.K.)
- Gentamycin, lyophilisiert, steril, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Harris Haematoxylin, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- HEPES (Gewebskulturpuffer) N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure „cell-culture tested“, Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Immunglobulin, purified Rat IgG-Technical Grade, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Isotonische Kochsalzlösung und Ringerlösung, steril und pyrogenfrei, Braun (Melsungen, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Pufferbestandteile in der Qualität „cell culture tested“: Di-Natriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Glucose, Calciumchlorid und Magnesiumsulphat, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Snapwell culture inserts, Clear Polyester (pore size 0,4 µm; 12 mm diameter); Snapwell culture inserts, Polycarbonate (pore size 0,4 µm; 12 mm diameter), Costar Corning (Bodenheim, Deutschland)
- TRIS, Trishydroxyaminomethan p.A., Merck (Darmstadt, Deutschland)

Die zur Zellisolierung 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 NaH₂PO₄, 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 NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 6 mM Glucose, 2,2 mM CaCl₂, 1,3 mM MgSO₄, pH 7,42

TRIS-Puffer: 50 mM Trishydroxyaminomethan in aqua dest. gelöst und mit 1 N HCl auf pH 9,5 eingestellt

DMEM: Dulbecco's modified eagle Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 2 mM Glutamin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 50 µM/ml Gentamycin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland); carbonatgepuffert, im Inkubator äquilibriert

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

3.1.2 Enzyme und Sera

- Desoxyribonuklease I (DNAase I) Typ DN 25, lyophilisiert, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Elastase Typ EC 134 aus Schweinepankreas, chromatographisch gereinigt, salzfrei, lyophilisiert, wasserlösliches Pulver, spezifische Aktivität 135 U/mg Protein (Orcein-Elastin), Elastin Products Company (St. Louis, Missouri, U.S.A.)
- Fötale Kälberserum (FCS), steril, Biochrom (Berlin, Deutschland) und Gibco (Karlsruhe, Deutschland). Es wurde 30 Minuten lang bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.
- gereinigtes Immunglobulin G (rat IgG, lyophilisiert); 500 µg/ml wurden in 50 mM TRIS-Puffer pH 9,5 gelöst, Sigma (Deisenhofen, Deutschland),
- Trypsin Typ III aus Rinderpankreas; kristallisiert, dialysiert, lyophilisiert, „essentially salt free“, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

3.1.3 Pharmaka und Agenzien

- Amilorid (N-amidino-3,5-diamino-6-chloro-pyrazincaboxamide), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Bicarbonat (NaHCO₃), Elektrolytkonzentrat 8,4%ig, Braun (Melsungen, Deutschland)
- 8-bromoadenosin 3':5'-cyclic monophosphat (8-bromo-cAMP), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 8-bromoguanosin 3':5'-cyclic monophosphat (8-bromo-cGMP), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Carbogen-Gasgemisch (5% CO₂ in O₂), Messer (Krefeld, Deutschland)
- cGMP (¹²⁵I) assay system, code RPA 525, Amersham (Dreieich, Deutschland)
- DMEM (Dulbeco`s modified eagle Medium), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- *Escherichia coli* Hämolysin A (HlyA), Prof. Dr. S. Bakhdi (Institut für Mikrobiologie, Joh. Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland)
- Forskolin (7β-Acetoxy-1α,6β,9αtrihydroxy-8,13-epoxy-labd-14-en-11-one), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Isobutyl-methylxanthin (IBMX), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Krebs-Henseleit-Puffer (125 mM NaCl; 4 mM KCl; 1,1 mM KH₂PO₄; 2,4 mM CaCl₂; 1,3 mM MgCl₂; 24 mM NaHCO₃), Serrag-Wiessner (Naila, Deutschland)
- Liquemin N 25.000 (Heparin); Hoffmann La Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- Nembutal (Pentobarbital-Natrium 6 g/ml), Sanefi-CEVA Importgesellschaft (Hannover, Deutschland)
- Mannitol ³H, Amersham (Dreieich, Deutschland)
- ODQ (1H-(1,2,4)oxadiazolo-(4,3,a)quinoxalin-1-one), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Ouabain (G-Strophantin; 1β,3β,5β,11α,14,19-Hexa-hydroxycard-20(22)-enolide 3-(6-deoxy-α-L-mannopyranosidel)), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Phosphin 3R, Lipid-Farbstoff, ICN Flow Biochemicals (Mannheim, Deutschland)
- Protamin, Hoffmann-La Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- S-Nitroso-N-N-acetylpenicillamine (SNAP), Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden, Deutschland)
- Spermine NONOate (C₁₀H₂₆N₆O₂), Cayman Chemicals (Michigan, U.S.A.)
- Szintillatorflüssigkeit Quicksafe A, Zinsser Analytik (Frankfurt, Deutschland)

- Zaprinast (1,4-Dihydro-5-(2-propoxyphenyl)-7H-1,2,3-triazolo(4,5-d)pyrimidine-7-one), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

3.1.4 Instrumente und Geräte

- CO₂-Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Cytospin: Kleinzentrifuge zum direkten Sedimentieren von Zellen auf Objektträger: Eigenbau. Filter dazu von Shandon (Ohio, U.S.A.)
- Endohm^R, tissue resistance measurement chamber, World Precision Instruments Inc. (Berlin, Deutschland)
- Gamma-Counter (Cobra Auto-Gamma), Packard/Canberra Company (Zürich, Schweiz)
- Hamilton Präzisionspritze 100 µl und 50 µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- Hettich Rotanda RP Kühlezentrifuge mit Schwingbecherrotor, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Liquidszintillationscounter, Phillips (Hamburg, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Nylon Filtergewebe, 150 µm, 20 µm und 10 µm, Reichelt Chemie (Linz, Österreich).
- Petrischalen, bakteriologisch 100 x 15 mm, aus Polystyrol, Falcon (Le Pont de Claix, Frankreich)
- Pipetten für Zellkultur: Becton & Dickinson (Heidelberg, Deutschland).
- Polypropylenbecher und Erlenmeyerkolben (250 ml), Brand KG (Berlin, Deutschland)
- Präparierbesteck und Scheren zur Gewebszerkleinerung, Aeskulap GmbH (Aachen, Deutschland)
- Präparierbrett: Größe 20 x 20 cm; an drei Kanten ausgespannte Gummiringe
- Spritzen: 1 ml, 10 ml und 20 ml, Terumo Plastics (Tokio, Japan)
- Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Trachealtuben aus V2A-Stahl, 2 mm: MSZ, Uniklinik Gießen
- Ussing-Kammer: Mikroprozessor-kontrolliertes Voltage/Current Clamp Meßsystem für 6 Kammern zum Anschluß an einen PC, bezogen von Dipl. Ing. K. Mußler (Aachen, Deutschland)
- Ussing-Kammer-Software für einen PC, bezogen von Dipl. Ing. K. Mußler (Aachen, Deutschland)

- Wägezelle, Hottinger Baldwin Meßtechnik (Langen, Deutschland)
- Zentrifuge RPC Rotanda, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen Falcon „Blue Max“ 50 ml aus Polypropylen mit konischem Boden, Falcon (Le Pont de Claix, Frankreich)
- Zellkulturschalen Falcon Multiwell 6- und 12-fach, Falcon (Le Pont de Claix, Frankreich)

3.1.5 Versuchstiere und Tierhaltung

Spezifisch pathogenfreie männliche Ratten der Art *Rattus norvegicus familiaris* und Zuchtlinie Sprague-Dawley (CD18) mit einem Gewicht von 180-200 g lieferte die Firma Charles River WIGA (Sulzfeld/Main). Sie wurden mit Futter ad libitum versorgt und innerhalb 48 Stunden nach Lieferung den Versuchen zugeführt.

3.2 Isolierung von Alveolarepithelzellen Typ II aus Rattenlungen

3.2.1 Isolierungsmethode nach Dobbs, Gonzales und Williams (2)

Zur Vorbereitung der Isolierung wurden die Lösungen 1 und 2 (siehe Kapitel 3.1.1) sowie physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Immunglobulin G wurde mit einer Konzentration von 500 µg/ml in 15 ml 50 mM TRIS-Puffer mit pH 9,5 gelöst und filtriert. Es wurden drei bakteriologische 100 mm-Petrischalen 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-Lösung abgegossen und die Platte fünfmal mit PBS sowie mit DMEM gespült.

Für die Betäubung der Tiere wurde eine Mischung aus 0,35 ml Nembutal, 0,5 ml Ringerlösung und 0,05 ml Heparinlösung in einer Insulinspritze (1 ml) aufgezogen. Eine männliche Sprague-Dawley-Ratte mit einem Gewicht von 180-200 g wurde durch intraperitoneale Injektion von 0,7-0,8 ml des Nembutal-Heparin-Gemisches betäubt. Das Tier schlief nach 10 Minuten und sollte auf einen Schmerzreiz nicht mehr reagieren. Es wurde sodann auf dem Rücken liegend auf einem Brett fixiert. Das Fell wurde vom Bauch bis zur Schnauzenspitze längs median aufgeschnitten. Der Bauchraum wurde eröffnet und das Tier über eine Nierenarterieninzision exsanguiniert. Am Hals wurde anschließend die Trachea freigelegt, mit einer feinen Pinzette umfahren, ein Faden unterlegt und die Trachea eröffnet. Ein 2 mm-Tubus (mit Luer-Adapter) wurde hier fest eingebunden. Danach wurde der Thorax entlang des Sternums 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 die Arteria pulmonalis vorgeschoben und die Lunge mit 50 ml warmer Lösung 2 perfundiert; dabei wurde diese mit Hilfe einer auf den Trachealtubus aufgesetzten Spritze viermal mit je 5 ml Raumluft beatmet. Sodann wurde die Lunge herausgenommen und zwischen Mull abgetupft. Zum Entfernen von Alveolarmakrophagen wurde die Lunge achtmal mit je 5 ml Lösung 1 lavagiert; dazu wurde eine leichtgängige 10 ml-Spritze verwendet. Dann wurde zweimal mit je 6 ml Lösung 2 sowie einmal mit 6 ml einer Elastase/Trypsin-Lösung lavagiert (9 mg Elastase EC 134 und 2 mg Trypsin in 40 ml Lösung 2, entsprechend 30 U/ml Orcein-Elastin), ohne daß Perfusat aus der Lunge austreten durfte. Nach Instillation eines Volumens von 8 ml Elastaselösung wurde die Lunge in eine auf 37°C temperierte Kochsalzlösung gehängt und die restliche Elastaselösung

unter einem hydrostatischen Druck von 7 cm Wassersäule über einen Zeitraum von 20 Minuten instilliert.

Im Anschluß daran wurden die Bronchien und verbliebenes Nicht-Lungen-Gewebe entfernt und die Lunge in 4 ml DNAase-Lösung (2,5 mg/ml) mit zwei parallel geführten Scheren in einem spitzkonischen Kunststoffbecher in Stücke von etwa 1 mm³ 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 Gewebsauflösung zu unterbrechen, wurden dann 10 ml FCS (fötales Kälberserum) zur Zellsuspension hinzugefügt und diese weitere 2 Minuten geschüttelt. Das resultierende Gemisch aus Lungenstücken und freien Zellen wurde durch mehrere Filterlagen aus Mull sowie durch 150 µm, 20 µm und 10 µm Nylongaze aufgetrennt. Das Filtrat wurde mit Lösung 2 in einem Falcon-Röhrchen auf ein Gesamtvolumen von 50 ml eingestellt; anschließend wurde 8 Minuten lang bei 130g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Sedimentierte Zellen wurden in DMEM (mit 10 µg/ml DNAase I-Zusatz) resuspendiert und mit DMEM ohne DNAase auf eine Zellzahl von 2,5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Zum Entfernen von Alveolarmakrophagen und Granulozyten wurden je 10 ml dieser Suspension auf die vorbereiteten, mit IgG beschichteten Petrischalen gegeben und eine Stunde lang bei 37°C bei 10% CO₂ inkubiert. Danach wurde jede Petrischale dreimal vorsichtig geschwenkt, 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 adhärten. Die Zellsuspension wurde in sterile Zentrifugenröhrchen übertragen und wiederum 8 Minuten lang bei 130g zentrifugiert; der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in DMEM (mit 10 µg/ml DNAase-I-Zusatz) resuspendiert und mit DMEM mit 10% FCS auf eine Zellkonzentration von 6,67 x 10⁶ Zellen/ml aufgefüllt. 300 µl (mit je 2 x 10⁶ Zellen) dieser Lösung wurden dann auf Snapwells gegeben (Clear oder non-Clear), die zuvor mit Fibronectin (Konzentration 50 µg/ml) beschichtet worden waren, und wurden dann über zwei Nächte im Inkubator mit 10% CO₂ inkubiert. Routinemäßig wurden für eine Zellisolierung die Lungen von zwei bis drei Ratten entnommen und parallel nach diesem Protokoll aufgearbeitet.

3.2.2 Identifizierung isolierter Alveolarepithelzellen Typ II

Eine einfache und schnell durchführbare Identifizierung der Typ II-Zellen konnte durch Inkubation mit dem Lipid-Farbstoff Phosphin 3R durchgeführt werden. Dazu wurden einige

Milliliter der verdünnten Zellsuspension mit 10 µl/ml einer Stammlösung des Farbstoffes in Aceton (10 µg/ml) versetzt und nach 2 Minuten mit einer Cytospin-Zentrifuge direkt auf dem 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 gelbgrünen, gut unterscheidbaren Farbton. Andere Zellen färbten sich nur schwach und diffus an. Mit dieser Methode wurde bei unserer Isolierung regelmäßig eine Reinheit von Typ II-Zellen zwischen 96 und 98% ermittelt. Zum Vergleich wurden Ausstriche von Zellpräparationen der modifizierten Papanicolaoufärbung (96) unterworfen. Die Phospholipide werden dabei sauer oxydiert und bilden im alkalischen Milieu einen blau-schwarzen Farbkomplex mit Hämatin:

Durchführung:

1. Zellsuspension im Cytospin auf Objektträger sedimentieren und 1 Stunde trocknen
2. 2,5 Minuten in Harris Haematoxylin inkubieren
3. zweimal in Aqua dest. tauchen, um Farblösung abzuspielen
4. 2 Minuten in 0,03%iger LiCO₃-Lösung inkubieren
5. einmal in Aqua dest. abspülen
6. Objektträger durch aufsteigende Alkoholreihe führen
7. Kurz in Xylol tauchen und Eindecken mit Entellan

Die Lamellarkörper kultivierter Typ II-Zellen wurden außerdem mit Tanninsäure-Polychromfärbung nach Mason et al. (97) dargestellt.

Durchführung:

1. Kulturschalen dreimal mit PBS waschen
2. fixieren mit 1,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,3 30 Minuten bei 4° C
3. zweimal mit 3,4% Saccharose in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,3 waschen
4. Postfixation mit 1% Osmiumtetroxyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,3 90 Minuten bei 4° C
5. dreimal waschen 3,4 % Saccharose in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,3
6. färben mit 1,0% Tanninsäure mit 0,1 M Cacodylatpuffer; pH 6,8 bei 4° C 16 h
7. zweimal waschen mit 0,1 M Cacodylatpuffer; pH 7,0 , zweimal waschen mit Aqua dest.
8. Gegenfärbung mit Polychromblau 10 sec.; Polychromrot 10 sec.
9. waschen mit Aqua dest., Lagerung in 0,1% Natriumazid

3.3 Barrieremessung mit ^3H -Mannitol bei Alveolarepithelzellen Typ II

3.3.1 Versuchsvorbereitungen - Kultivierung der Zellen und Widerstandsmessung mit dem Endohm^R

Nach der oben beschriebenen Isolierung der Typ II-Zellen wurden diese auf mit Fibronectin beschichtete Snapwells aufgetragen. Dabei wurden 300 μl der Zellsuspension, welche 2 Mio. Typ II-Zellen enthielten, auf die speziell für die Gewebeskultur behandelten Membranen pipettiert (Snapwell culture inserts, Polycarbonate (pore size 0,4 μm ; 12 mm diameter)). In den unteren Teil des Snapwells wurden 3 ml DMEM gegeben (Dulbecco's Modified Eagle Medium), welches 2mM Glutamin, 50 $\mu\text{M/ml}$ Gentamycin und 10% FCS enthielt und zuvor im Inkubator voräquilibriert wurde. Danach wurden die Zellen auf den Snapwells im Inkubator bei 37°C und 10 % CO_2 für mindestens zwei Tage unbehandelt belassen. Zwischenzeitlich wurden die Snapwell-Platten kurzzeitig geschüttelt, um sicherzustellen, daß sich ein konfluenter Zellrasen ausbildete. Außerdem wurden die Zellen auf den mikroskopierbaren Snapwells bezüglich der zunehmenden Konfluenz des Zellrasens untersucht.

Am zweiten Tag nach Isolierung wurde regelhaft der Widerstand der Zellen überprüft, um eine Aussage darüber zu treffen, ob ein konfluenter Zellrasen vorliegt oder die Zellen noch weiter kultiviert werden sollten. Die Endohm^R-Kammer diente hierfür als Meßgerät (Abbildung 4). Die Messung des Stromes erfolgte zwischen symmetrisch gegenüberliegenden Scheibenelektroden. Das Gerät war zuvor bezüglich der Spannung und des Widerstandes geeicht worden. Der Widerstand hing insgesamt von dem Abstand der oberen und der unteren Elektrode, der Meßlösung und der Temperatur ab. Diese Einflußfaktoren wurden standardisiert und immer eingehalten. Die Flüssigkeit innerhalb der Endohm^R-Kammer betrug wie im basolateralen Kompartiment des Snapwells 3 ml. Die Snapwells wurden einzeln in die Endohm^R-Kammer eingesetzt, so daß der obere Rand des Snapwells sicher in der Verankerung der Kammer hing und die obere Elektrode zentral positioniert werden konnte. Mit dem Meßknopf „Measure R“ wurde der Widerstand des einzelnen Wells gemessen und notiert. Zwischen 2. und 4. Tag nach Isolierung betrug der Widerstand der für den Versuch verwendeten Zellen immer über 2000 Ohm/cm^2 . Betrug der Widerstand eines Well weniger als 2000 Ohm/cm^2 , wurde es entweder noch weitere Tage kultiviert, um evtl. noch einen höheren Widerstand zu erreichen, oder es wurde verworfen.

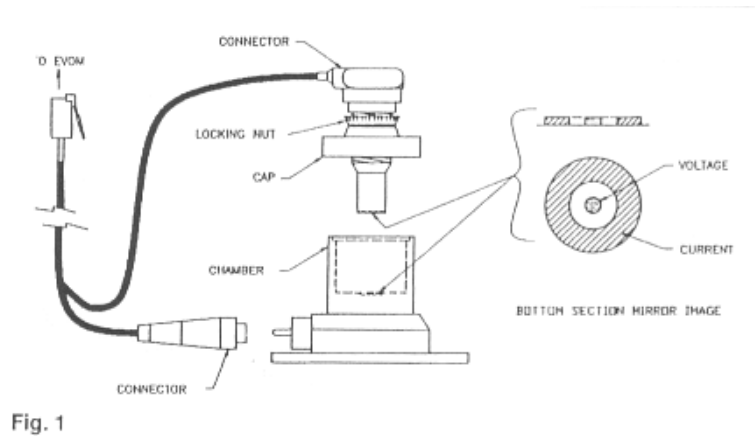


Fig. 1

Abbildung 4: Endohm^R Meßvorrichtung für Snapwells (übernommen aus der Endohm-Bedienungsanleitung, World Precision Instruments)

Am zweiten Tag nach Isolierung wurden die Zellen außerdem mit steriler DMEM-Lösung gewaschen. Es wurden vorsichtig sowohl die oberen 300 µl des inserts als auch die unteren 3 ml des Snapwells abgesaugt und durch frisches voräquilibriertes Medium ersetzt. Der Waschvorgang wurde 1-2 mal wiederholt. Sollten die Zellen am gleichen Tag für entweder einen Mannitol- oder einen Ussing-Kammer-Versuch verwendet werden, wurde FCS-freies Medium auf die Snapwells aufgetragen. Andernfalls wurden die Snapwells für weitere Kulturtage mit FCS-haltigem Medium versehen und im Inkubator weiter aufbewahrt.

3.3.2 Erhöhung der parazellulären Permeabilität und die Möglichkeit der Messung

Nachdem auf den Snapwells das FCS-haltige Medium durch FCS-freies Medium ersetzt, die Widerstandsmessung durchgeführt und die Zellen für versuchstauglich befunden worden waren, wurden sie für 30-60 Minuten im Inkubator unstimuliert belassen. In diesem Zeitraum wurden alle für den Versuch notwendigen Vorbereitungen in der Zellkultur und im Isotopen-Labor durchgeführt. Die Zellen wurden dann teils in der Zellkultur, teils im Radioaktivlabor stimuliert. Unmittelbar nach der Stimulation wurden 10 nCi tritiummarkiertes Mannitol zu den 300 µl Lösung im Snapwell pipettiert. Mannitol ist bekannt als parazellulärer Marker und sollte in unserem Versuch darüber Aufschluß geben, welche Substanzen die parazelluläre Permeabilität erhöhen, verringern oder sie unbeeinflusst lassen. Die stimulierten und radioaktiv markierten Snapwell-Platten wurden in einem auf 37°C vorgeheizten Wasserbad aufbewahrt.

Nach ein, zwei und nach drei Stunden wurden die Snapwell-Platten einzeln aus dem Wasserbad geholt, um Proben aus dem unteren Teil des Snapwells abzunehmen. Dabei wurden die Platten erst ganz vorsichtig geschwenkt, um eine gute Durchmischung des durch den Zellmonolayer in den unteren Teil des Snapwells permeierten Mannitols zu garantieren. Dann wurden jeweils 100 µl aus dem unteren Teil des Snapwells abgesaugt und in ein β-Counter Röhren pipettiert. Die entfernten 100 µl wurden durch 37°C warmes 100 µl FCS-freies DMEM ersetzt. In die β-Counter Röhren wurden, nachdem alle Snapwells in der oben beschriebenen Weise versorgt wurden, 2 ml Szintillatorflüssigkeit gegeben und die Lösungen gut gemischt. Die Röhren wurden im β-Counter (Liquidszintillationscounter, Phillips (Hamburg, Deutschland)) gemessen und die counts per minute (cpm) ermittelt. 3 Stunden nach Stimulation wurden zusätzlich zu den 100 µl aus dem unteren Teil des Snapwells 10 µl Proben aus dem oberen Teil des Snapwells entnommen, um nachträglich nach Ermittlung der cpm sicherzustellen, daß sich in allen Snapwells annähernd die gleiche Menge an Radioaktivität befand. Die restliche Flüssigkeitsmenge und die Snapwell-Platten wurden nach Beendigung des Versuchs fachgerecht verworfen und entsorgt.

3.3.3 NO-Begasung von Alveolarepithelzellen Typ II

Mit der NO-Begasung sollte eine Versuchsanordnung geschaffen werden, die klinische Praxis und Relevanz des NO-Einsatzes demonstrieren kann. So wurde in diesem Versuch statt NO-Donatoren NO-Gas zur Stimulation der Alveolarepithelzellen Typ II benutzt.

Der Versuchsaufbau ist dem in 3.6.1 und 3.6.2 beschriebenen sehr ähnlich. Der entscheidende Unterschied lag darin, daß die Stimulation und die radioaktive Markierung in einer luftdicht abgeschlossenen Plexiglaskammer erfolgte. Diese war wiederum von einem großen Plastiksack umschlossen, in dem mit Hilfe zweier handschuhförmiger Zugänge gearbeitet werden konnte. Sowohl die Plexiglaskammer als auch der Plastikschlauch waren für die verwendeten Gase undurchlässig. Die Plexiglaskammer hatte ein Einstrom- und ein Ausstromventil, wodurch beliebig Gase zugeführt und auch wieder ersetzt werden konnten.

Über 5 Minuten wurden der Plastikschlauch und die Kammer durch das Einlaßventil mit NO begast, so daß im Schlauch und der Kammer eine Konzentration von 250 ppm vorherrschten. Dann wurden die Zellen mit radioaktivem Mannitol markiert. Anschließend wurden je zwei Wells in zwei verschiedenen Snapwell-Platten, eine in normaler Luft und eine mit NO-

Begasung, mit H_2O_2 stimuliert. Zwei weitere Wells wurden als Kontrolle benutzt. Nun wurde eine Platte in die Plexiglaskammer gegeben und anschließend das Ausstrom-, dann das Einstromventil verschlossen. Es wurde nochmals die Konzentration des NO in der Kammer überprüft. Die Kammer wurde nun aus dem Plastikschauch entfernt und über 2 Stunden in einem auf 37°C vorgeheizten Wasserbad aufbewahrt. Nach einer Stunde wurde die Kammer aus dem Wasserbad entnommen und noch einmal mit NO nachbegast. Sowohl von dieser als auch der nicht mit NO begasten Platte wurde nach der zweiten Stunde eine Probe von $100\ \mu\text{l}$ aus dem unteren Teil des Snapwells entnommen. Hierzu wurde die in der Plexiglaskammer befindliche Platte aus dieser entnommen und in dem mit ebenfalls mit NO gefüllten Plastikschauch bearbeitet, um zu gewährleisten, daß vor der Probenentnahme noch kein zusätzlicher Sauerstoffkontakt erfolgte. Danach wurde auch diese Platte der Raumluft ausgesetzt. Nach einer weiteren Stunde wurden dann erneut Proben aus beiden Platten genommen. Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach der in 3.6.2 beschriebenen Weise.

3.4 Messung des Ionenstroms (Isc) und der Leitfähigkeit (Gt) bei Alveolarepithelzellen Typ II

3.4.1 Ussing-Kammer

Alle Experimente wurden mit Hilfe modifizierter Ussing-Kammern (Ing. Büro für Meß- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen; siehe Abbildung 5 und 6) ausgeführt. Eine Ussing-Kammer besteht aus zwei Plexiglasquadern. Das den Alveolarepithelzellen Typ II Monolayer enthaltende Snapwell wurde mit einem Gummiring in einer Hälfte der Kammer angebracht und danach mit der zweiten Hälfte durch Metallklemmen verspannt. Zwischen beiden Kammerhälften verblieb eine freie Gewebefläche von $1,13 \text{ cm}^2$ mit beidseitigen Kontakt zur Nährlösung. Durch die Öffnungen an der Oberseite der Kammer wurden die Lösungen eingefüllt sowie Wirkstoffe zugegeben. An der Oberseite jeder Kammerhälfte befand sich jeweils eine Öffnung für einen Begasungsschlauch. Zweck der Begasung war die Konstanthaltung des pH-Werts der Krebs-Henseleit Lösung sowie die Sauerstoffversorgung der Zellen. Die optimale Bicarbonatzufuhr für einen optimalen pH der Krebs-Henseleit Lösung ($7,35 \pm 0,05$) und die optimale zugeführte Gasmenge wurden in zahlreichen Vorversuchen ermittelt. Das Lösungsvolumen betrug auf beiden Seiten der Snapwellmembran je 5,0 ml. Die Kammern wurden von beiden Seiten durch zwei Metallplatten umschlossen, durch die in einem externen Wasserbad temperiertes Wasser floß. Durch dieses Durchlaufsystem wurde gewährleistet, daß die Temperatur der Nährlösung konstant bei 37°C lag.



Abbildung 5: Ussing-Kammer

Nachdem die Zellen in die Kammern eingespannt, die Nährlösung hinzugefügt und die Begasung begonnen worden war, erfolgte die Anbringung der Elektroden durch einen Plexiglasdeckel durch die obere Kammeröffnung. Dabei wurden pro Kammerhälfte jeweils eine Spannungselektrode membranah und eine Stromelektrode membranfern positioniert. Sowohl die Elektroden als auch die Begasungsschläuche waren mit der Schaltzentrale der Kammer verbunden. Hier wurden der Begasungsfluß feinjustiert, die Elektrodenenden eingesteckt, die Messungen an das intelligente Interface weitergeleitet und dann per PC weiterverarbeitet.

Die durch das Gewebe transportierten Elektrolytmengen sind zu gering, um die resultierenden Konzentrationsänderungen in den Nährlösungen auf beiden Seiten des Gewebes durch chemische Analysen bestimmen zu können. Die Ussing-Kammer-Technik ist eine Methode zur Erfassung des Transports von Ladungen in Form von Ionen durch die biologische Membran. Diese elektrischen Messungen sind empfindlich genug, um die vom Gewebe erbrachten Ladungsverschiebungen mit ausreichender Genauigkeit zu messen. Unter den oben beschriebenen Bedingungen blieben die Alveolarepithelzellen 2-3 Stunden lebens- und funktionsfähig.

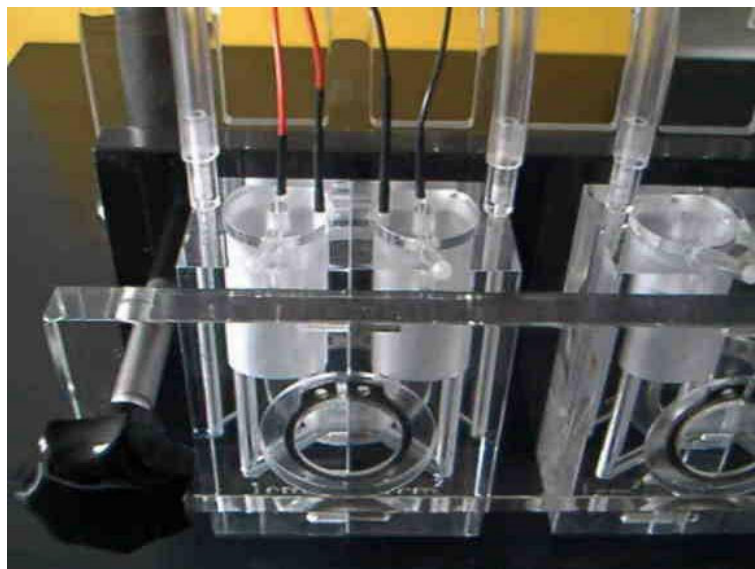


Abbildung 6: Ussing-Kammer mit Elektroden

3.4.2 Elektrische Messungen

Zur Durchführung der elektrischen Messungen wurden die Ussing-Kammern an die Computer kontrollierte Voltage-Clamp-Anlage (Ing. Büro für Mess- und Datentechnik, Dipl. Ing. K.

Mußler, Aachen) angeschlossen. Die Kammern besitzen Silber-Silberchlorid-Elektroden zur kontinuierlichen Messung der Potentialdifferenz (Pd) zwischen den beiden Kammerhälften.

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn war eine Meßperiode vorgeschaltet, in der die Kammern die Elektrolytlösung enthielten, aber noch kein Snapwell mit einem Typ II-Zellmonolayer. In dieser Phase wurden der Widerstand der Lösung und die Potentialdifferenz zwischen beiden Pd-Elektroden selbst ermittelt. Durch den Computer erfolgte in der Vorlaufphase mit den Zellen eine automatische Korrektur der gemessenen Pd, hier wurden die Potentialunterschiede zwischen den Elektroden selbst ermittelt (Messung im sog. „Open-Circuit“-Modus). Um den elektrischen Gradienten als treibende Kraft für eine Ionenbewegung durch den Monolayer auszuschließen, wurde die spontane Potentialdifferenz durch das Applizieren eines sog. Kurzschlußstromes (Isc) über die Stromelektroden kompensiert, d.h. auf Null „geklemmt“.

Die Applikation des Isc erfolgte über ein zweites Paar Ag/AgCl-Elektroden, die in bestimmter Entfernung von der Snapwellmembran angebracht wurden. Insgesamt erfolgte die Isc-Applikation gleichmäßig über den gesamten Monolayer (Messung im sog. „Voltage Clamp“-Modus). Durch die Verwendung identischer Ionenkonzentrationen in der mukosalen und serosalen Elektrolytlösung sowie gleicher Lösungsvolumina auf beiden Seiten des Snapwells wurden auch chemische und hydrostatische Gradienten ausgeschlossen. Die Isc-Änderungen konnten somit nur durch aktiven Transport von Ionen durch das Gewebe zustande kommen. Ein positiver Isc zeigt einen aktiven Netto-Kationentransport durch die Zellen von apikal nach basolateral bzw. einen Netto-Anionentransport in umgekehrter Richtung an.

Zur Ermittlung der Gewebsleitfähigkeit (Gt) wurde alle 60 s ein bipolarer Strompuls von 50 μA über eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe appliziert. Aus der resultierenden Potentialänderung (Gt bzw. U) wurde anschließend nach dem Ohm'schen Gesetz der Kehrwert des Widerstandes (R), die Leitfähigkeit (Gt), berechnet ($R=U/I$). Isc, Pd und Gt wurden kontinuierlich aufgezeichnet und jede Minute ausgedruckt. Der Isc wurde als Ladungstransfer pro Zeit und Gewebefläche ($\mu\text{Eq}/\text{hcm}^{-2}$ bzw. $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) angegeben, um einen direkten Vergleich mit den Ionenflüssen zu ermöglichen.

Unter Standard-Versuchsbedingungen wurden mit der Ussing-Technik nur die aus dem aktiven Ionentransport resultierenden Netto-Ströme gemessen. Um differenzieren zu können,

inwieweit Kationen- bzw. Anionenbewegungen dazu beitragen, in welche Richtung die einzelnen Transporte erfolgen und welche Ionen im Einzelnen beteiligt sind, können zusätzlich Versuche durchgeführt werden, bei denen ein Teil der Ionen durch die entsprechenden Radioisotope ersetzt sind.

3.4.3 Mikrocomputer-gestützte Voltage/Current Clamp-Einrichtung unter Windows

Mit diesem System konnten bis zu sechs Ussing-Kammern gleichzeitig im Echtzeitbetrieb unabhängig voneinander bedient werden (Abbildung 7). Sämtliche Meßgrößen (Gt, I_{sc}, P_d, pH) konnten alternativ und getrennt für jede Kammer graphisch dargestellt werden. Die genannten Größen wurden zudem im Speicher gehalten, was eine schnelle Darstellung zurückliegender Ereignisse ermöglichte. Zusätzlich wurden diese alle 10 Minuten automatisch auf der Festplatte als „Back up file“ gespeichert. Mit Versuchsende wurden die Daten dann unter Vergabe eines filenames endgültig auf der Festplatte abgelegt. Sie konnten zu jeder Zeit wieder in das Programm geladen werden.

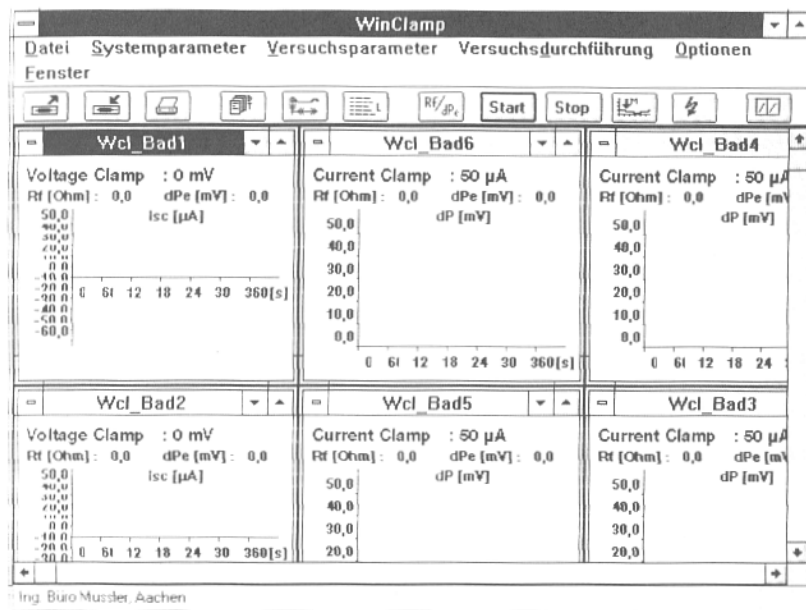


Abbildung 7: Bildschirmausschnitt bei Ussing-Kammer-Versuch mit 6 laufenden Kammern

Die Y-Achse zeigte je nach Modus die Leitfähigkeit, die Spannung oder den Ionenstrom an. Die X-Achse war die Zeitachse.

Aus dem Gesamtversuch konnten dabei Ausschnitte mit Hilfe einer Bildlaufleiste schnell ermittelt und auf dem Drucker ausgegeben werden. Zusätzlich wurde ein numerisches Protokoll aufgezeichnet, das ebenfalls zum Ausdruck mitgeführt wurde. Freundlicherweise wurde uns aus dem Arbeitskreis von Dr. Schuldtheiß aus dem Institut für Physiologie (Veterinärmedizin) an der hiesigen Universität ein Programm zur Überführung der Daten in das EXCEL-Programm zur Verfügung gestellt.

Optional standen je Kammer ein Anschluß für ein pH- Meßgerät zur Verfügung sowie ein einzelner Schaltausgang, über den z.B. eine automatische Substanzzugabe veranlaßt werden konnte. Das Gesamtsystem bestand aus dem Mikrocomputer (Standard-PC) und dem intelligenten Interface, das in einem Desktop-Gehäuse untergebracht war. Aufgrund des Schaltungskonzeptes konnte auf die Verwendung von Abschirmungen (Faraday-Käfig) verzichtet werden. Das Interface verfügte über einen eigenen Mikrorechner sowie eine Speichereinheit, auf der das Programm und weitere Dateien abgespeichert wurden. Sämtliche Regelvorgänge, Steuerungsaufgaben etc. liefen auf diesem System ab. Der Datenaustausch mit dem Computer erfolgte über die serielle Schnittstelle in Form von bidirektionalen Datentelegrammen. Der Anschluß der Diffusionskammern an das Interface erfolgte über zwei DE 25 Steckverbinder auf der Rückseite an die Anlage oder eine Anschlußbox (BNC Verbinder).

3.5 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit ungepaartem T-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Es wurden ungleiche Varianzen vorausgesetzt. Angaben sind jeweils Mittelwerte \pm mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM). Das Signifikanzniveau wurde bei $P < 0,05$ festgelegt, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

4. Ergebnisse

4.1. Übersicht

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Einfluß des oxidativen Agens H_2O_2 , des Polykations Protamin und des Porenbildners ECH auf die alveolo-epitheliale Barriere untersucht. Im Mittelpunkt stand die Evaluation des protektiven Einflusses von NO bei oxidativem Streß auf die alveolo-epitheliale Barriere. Dabei wurden insbesondere der Unterschied zwischen der apikalen und basolateralen Applikation von H_2O_2 und NO und die mögliche Rolle von cGMP und anderen potentiell protektiven Mechanismen herausgearbeitet.

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist nach folgenden Gesichtspunkten gegliedert:

Zunächst wurde der Einfluß von H_2O_2 auf die alveolo-epitheliale Barrierefunktion in Abhängigkeit von der Dosis, der apikalen und basolateralen Applikation und dem zeitlichen Verlauf untersucht. Als Parameter diente hierbei die parazelluläre Permeabilität, gemessen anhand des parazellulären Mannitolfusses. Des weiteren wurden die Wirkungsprofile des Polykations Protamin und des Porenbildners ECH im Vergleich zum H_2O_2 aufgezeigt.

Im Mittelpunkt standen die Untersuchungen der Effekte von NO auf die alveolo-epitheliale Barrierefunktion bei oxidativem Streß. Es wurden als NO-Donatoren SNAP und Spermine NONOate eingesetzt. Dabei wurden die Dosisabhängigkeit und die Rolle der apikalen und der basolateralen NO- und H_2O_2 -Applikation verglichen.

Außerdem wurden die Mechanismen der NO-Wirkung bei oxidativem Streß eruiert, die im Rahmen epithelialer Signaltransduktionswege eingreifen. Hierzu wurden Substanzen wie die Phosphodiesterase-Inhibitoren IBMX und Zaprinast, der Inhibitor der zyklischen Guanylatzyklase ODQ und das cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP verwendet.

In NO-Begasungsversuchen sollte der klinische Bezug zu den durchgeführten Experimenten hergestellt werden.

Des weiteren wurden Versuche mit Forskolin und Ilomedin, beides Stimulanzen der Adenylatzyklase, und dem cAMP-Analogon 8-bromo-cAMP durchgeführt.

Nach Etablierung der Ussing-Kammer-Methode in unserem Labor wurde der Einfluß von H_2O_2 auf den alveolo-epithelialen Ionenstrom und die Leitfähigkeit untersucht. Weiterhin wurden Ionenstrom- und Leitfähigkeitsmessungen mit NO-Donatoren und dem cGMP-Analogen 8-bromo-cGMP durchgeführt, sowie deren Einfluß auf oxidativem Streß am Alveolarepithel untersucht.

4.2 Störung der epithelialen Permeabilität durch H₂O₂, Protamin und ECH

Es wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die alveolo-epitheliale Barriere getestet. Als oxidatives Agens wurde H₂O₂ in Konzentrationen zwischen 10 µM und 2 mM bei apikaler und basolateraler Applikation eingesetzt. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich in der jeweiligen H₂O₂-Konzentrationen eine Zunahme des Mannitolflusses im Vergleich zur Kontrolle. Als optimale Konzentration ergab sich 200 µM sowohl bei apikaler als auch basolateraler Applikation. Konzentrationen darüber zeigten keine wesentlich stärkere Erhöhung der parazellulären Permeabilität. Die H₂O₂-Effekte waren ab der Konzentration 200 µM apikal und basolateral für alle Zeitpunkte signifikant, in den Konzentrationen 50 µM und 100 µM apikal und 100 µM basolateral nur für die Zeitpunkte 2 und 3 Stunden (n=13 für 200 µM H₂O₂ apikal, sonst n=3) (Abbildung 8a und 8b).

Anschließend erfolgten zum Vergleich der H₂O₂-Effekte Dosisreihen mit dem kationischen Agens Protamin in Konzentrationen 0,7 mg/ml und 1,4 mg/ml apikal und dem Porenbildner ECH in den Konzentration 2 HE/ml, 3 HE/ml und 4 HE/ml (HE= hämolysierende Einheit) apikal. Protamin erhöhte in Konzentrationen 0,7 mg/ml und 1,4 mg/ml den parazellulären Mannitolfluß für die Zeitpunkte 2 Stunden und 3 Stunden signifikant im Vergleich zur Kontrolle (n=3). ECH erhöhte ebenso den parazellulären Mannitolfluß für die eingesetzten Konzentrationen und war für die Zeitpunkte 2 und 3 Stunden signifikant im Vergleich zur Kontrolle (n=3). Die beiden letzteren Agentien erhöhten zwar ebenso die parazelluläre Permeabilität wie H₂O₂ signifikant, ergaben jedoch einen geringeren absoluten parazellulären Mannitolfluß als bei H₂O₂ (Abbildung 10).

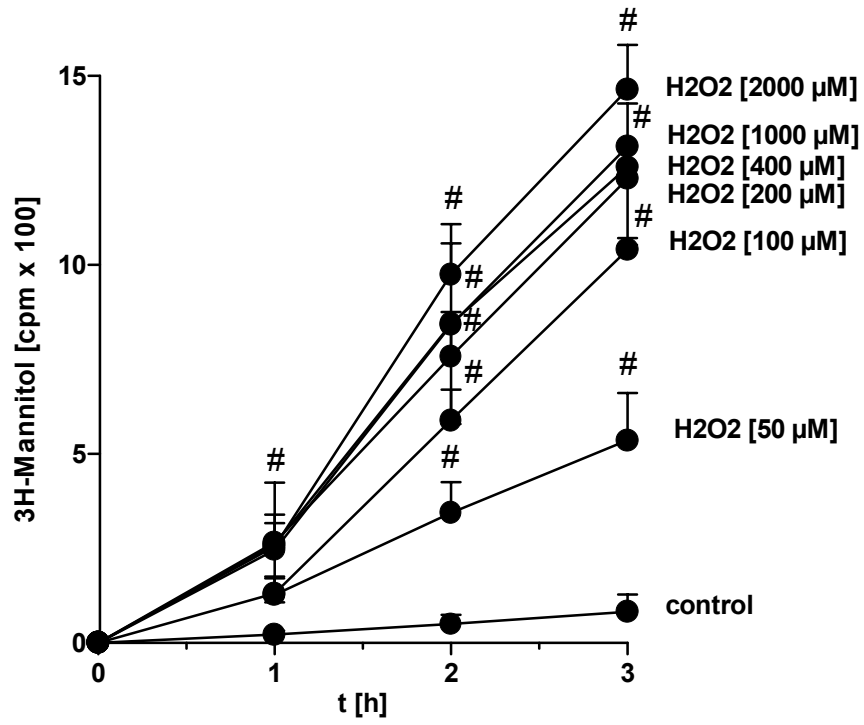


Abbildung 8a

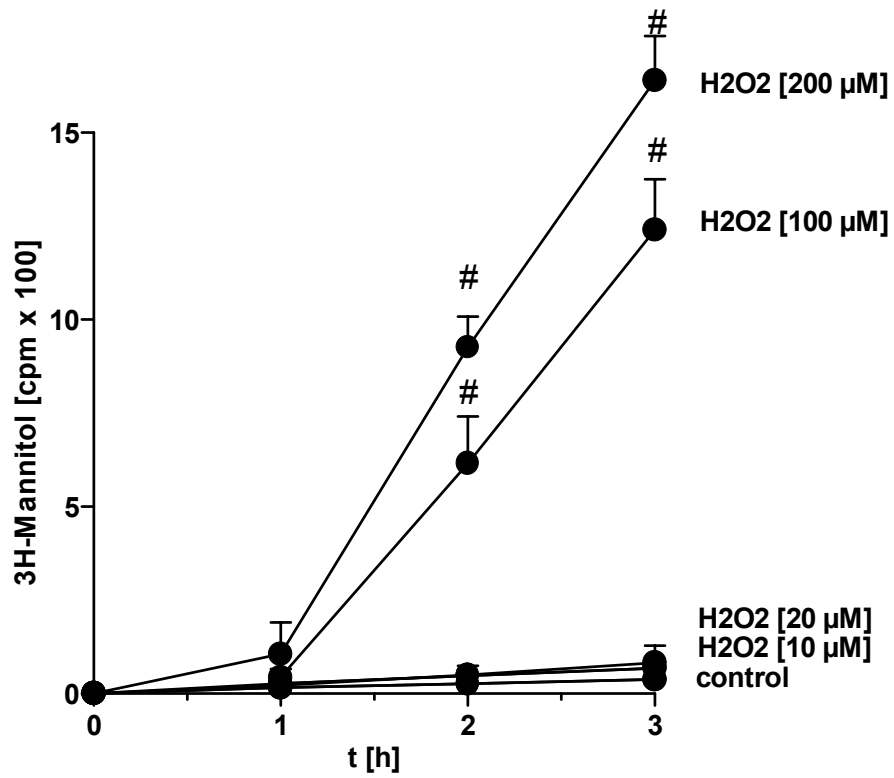


Abbildung 8b

Abbildung 8a und 8b: Dosisabhängiger ³H-Mannitolfluß (cpm x 100) bei apikaler und basolateraler H₂O₂-Applikation im Verlauf von 3 Stunden.

Die Alveolarepithelzellen Typ II bildeten nach 2-4 Tagen mikroskopisch einen konfluenten Zellrasen und wiesen einen Widerstand vom mindestens 2000 Ohm/cm² auf. Die Barrierschädigung wurde mit Hilfe des Durchflusses des radioaktiv markierten parazellulären Markers ³H-Mannitol (gemessen in cpm x 100) nachgewiesen. Die Zellen wurden in aufsteigender Dosierung apikal mit H₂O₂ (50 µM-2000 µM) (Abbildung 8a) und ebenfalls in aufsteigender Dosierung basolateral mit H₂O₂ (10 µM-200 µM) stimuliert (Abbildung 8b). Die Kurven zeigen den Verlauf über drei Stunden nach Stimulation mit H₂O₂. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet (bei Abbildung 8a gilt dies für die Dosierungen 50 µM apikal für die Zeitpunkte 2 und 3 Stunden sowie für die Dosierungen 100 µM bis 2000 µM apikal für alle drei Zeitpunkte; bei Abbildung 8b gilt dies für die Dosierungen 100 µM und 200 µM basolateral für die Zeitpunkte 2 und 3 Stunden). Die Mittelwerte \pm SEM stammen bei 200 µM H₂O₂ apikal aus 13 und bei den übrigen aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.3 Protektiver Effekt von Stickstoffmonoxid auf die epitheliale Barriere

NO aktiviert die lösliche Form der Guanylatzyklase und führt zur Bildung von cGMP, das seinerseits via Proteinphosphorylierung durch cGMP-abhängige Kinasen zu einer Vielzahl NO-assoziiierter Effekte führt. Diese Aktivierung ist in Alveolarepithelzellen Typ II nicht so deutlich ausgeprägt wie beispielsweise in Endothelzellen. Die Rolle von cGMP in Typ II-Zellen ist insgesamt sehr umstritten. NO wurde in unseren Experimenten auf seinen möglichen protektiven Effekt auf das oxidativ geschädigte Alveolarepithel untersucht.

Es erfolgte eine Dosisreihe mit SNAP in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 100 μM apikal allein sowie mit gleichzeitiger apikaler H_2O_2 -Applikation (200 μM). Es stellte sich dabei für die Dosis 100 μM SNAP apikal ein signifikanter Rückgang des permeabilisierenden H_2O_2 -Effektes für die Zeitpunkte 1, 2 und 3 Stunden ein. Dies wurde als protektiver Effekt gewertet. Bei der Dosis 10 μM apikal war nur der 2 Stundenwert signifikant protektiv. Die Dosis 1 μM SNAP apikal war hingegen deutlich weniger protektiv ($n=7$). Die alleinigen Gaben des NO-Donators SNAP hatten in der eingesetzten Konzentration keine protektiven Effekte auf die alveolo-epitheliale Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 9).

Anschließend wurde untersucht, welche Wirkung 100 μM SNAP apikal bei höherer H_2O_2 -Konzentration besitzt. Zum Zeitpunkt 1, 2 und 3 Stunden war NO in Kombination mit 400 μM H_2O_2 zwar protektiv, dies aber nicht mehr signifikant. So ergab sich für den Zeitpunkt 2 Stunden für 400 μM H_2O_2 apikal in Kombination mit 100 μM SNAP eine nur um 28% verminderte, jedoch bei 200 μM H_2O_2 in Kombination mit 100 μM SNAP eine signifikant um 86% verminderte Permeabilität ($n=3$). Dies wies darauf hin, daß NO bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen einen geringer protektiven Effekt auf die alveolo-epitheliale Barriere hat als bei niedrigerer Dosierung von H_2O_2 (Daten nicht gezeigt).

Verglichen wurde anschließend der Einfluß von apikal appliziertem SNAP (100 μM) auf die durch ECH und Protamin verursachte Erhöhung der parazellulären Permeabilität. Die schädigenden Substanzen wurden ebenfalls nur apikal eingesetzt. Dabei zeigte sich ein geringer protektiver Effekt von SNAP bei Schädigung durch Protamin (Konzentration 0,7 mg/ml; Zeitpunkt 2 Stunden) ($n=3$), sowie bei allen Zeitpunkten kein protektiver Effekt bei der Schädigung durch ECH ($n=3$) (Abbildung 10). Die alleinigen Gaben des NO-Donators SNAP hatten in der eingesetzten Konzentration keine signifikanten Effekte auf die alveolo-epitheliale Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle (Daten hier nicht gezeigt).

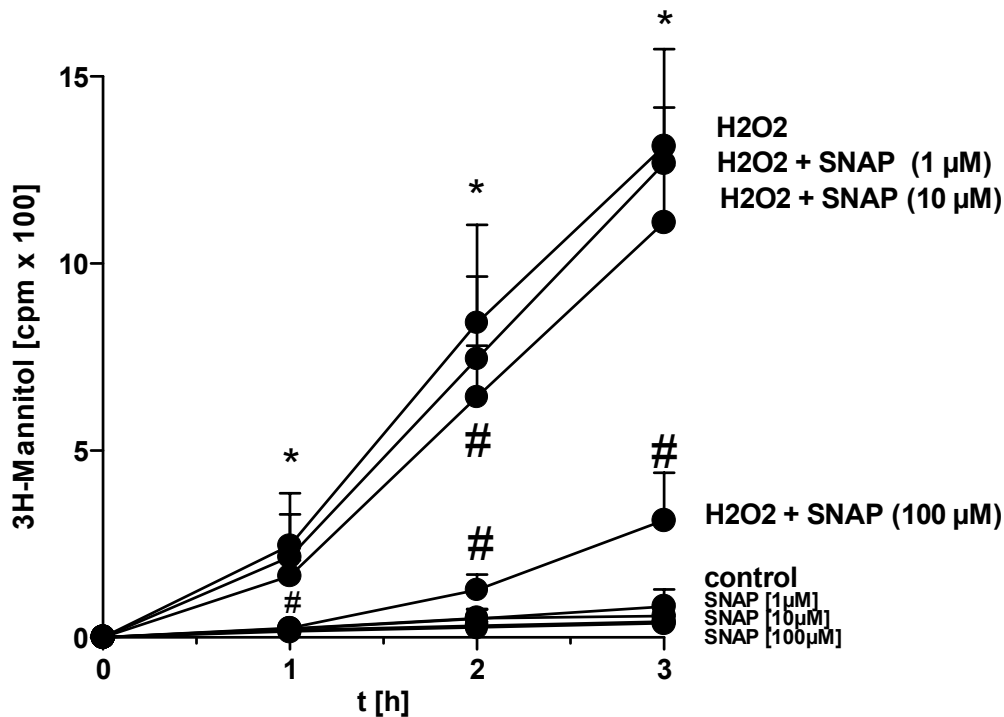


Abbildung 9: Dosisabhängiger protektiver Einfluß von apikaler SNAP-Applikation bei apikaler H₂O₂-Applikation

H₂O₂ wurde in der Konzentration 200 μM apikal und SNAP in den Konzentrationen 1 μM, 10 μM und 100 μM apikal eingesetzt. Die Zellen wurden vor der H₂O₂-Applikation für 15 Minuten mit SNAP präinkubiert. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von H₂O₂ unterscheidet. * bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen bei 200 μM H₂O₂ apikal + 10 μM/100 μM SNAP aus 7 unabhängigen und bei den übrigen aus 3 unabhängigen Experimenten.

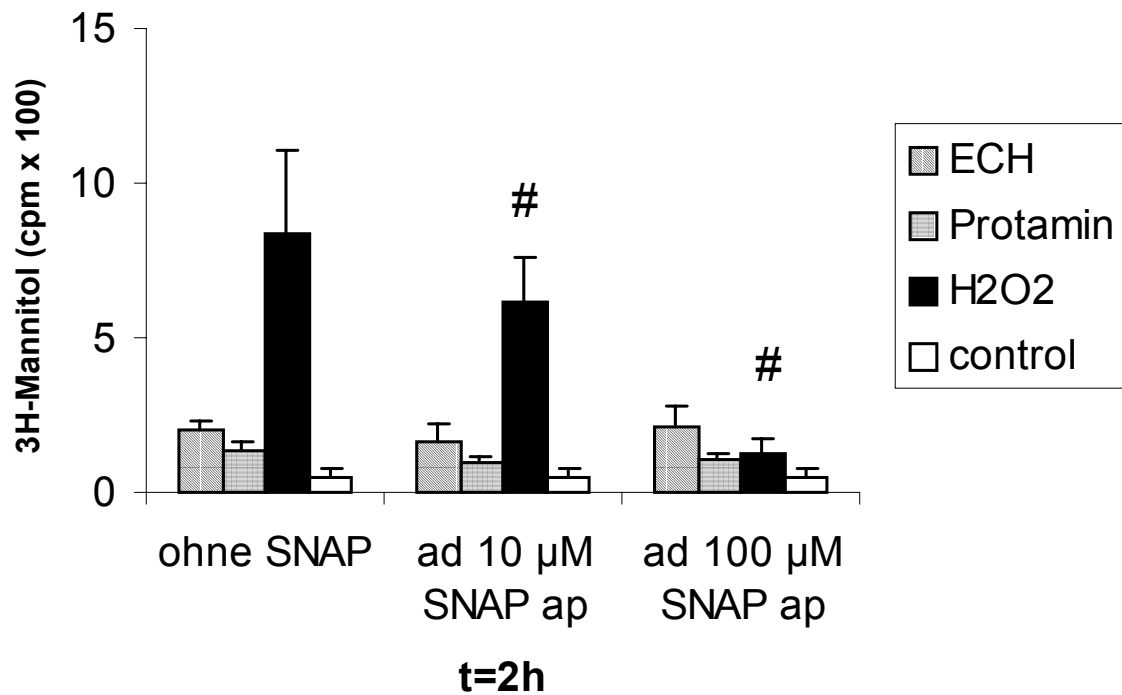


Abbildung 10: Vergleich von unterschiedlich schädigenden Substanzen auf die alveolo-epitheliale Barriere und der Einfluß des NO-Donators SNAP auf diese Schädigung

ECH wurde in der Konzentration 2 HE/ml apikal, Protamin in der Konzentration 0,7 mg/ml apikal, H₂O₂ in der Konzentration 200 µM apikal und SNAP in den Konzentrationen 10 µM und 100 µM apikal eingesetzt. Die Zellen wurden teilweise vor der H₂O₂-Applikation, Protamin oder ECH für 15 Minuten mit SNAP präinkubiert. Zeitpunkt des Vergleiches ist 2 Stunden nach ECH-, Protamin- oder H₂O₂-Applikation. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von H₂O₂ unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen bei 200 µM H₂O₂ apikal + SNAP aus 7 und bei den übrigen aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.4 Die Rolle des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) für die alveolo-epitheliale Schrankenfunktion

4.4.1 Die Rolle des zyklischen Guanylatzyklase-Inhibitors 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3,-a)quinoxalin-1-one (ODQ)

Im folgenden wurde untersucht, über welche Mechanismen NO den H₂O₂-Effekt vermindert. Exogenes NO stimuliert bekannterweise in vielen Epithelzellen die Guanylatzyklase und damit die intrazelluläre cGMP-Bildung. Mit Hilfe eines Hemmers der zyttoplasmatischen löslichen Guanylatzyklase sollte untersucht werden, ob sich durch Verminderung der cGMP-Bildung der protektive Effekt von SNAP als NO-Donator aufheben läßt.

Im Versuch ergab sich bei der Kombination von 10 µM ODQ apikal, 100 µM SNAP apikal und 200 µM H₂O₂ apikal eine signifikante und fast komplette Aufhebung des protektiven Effektes von SNAP in Kombination mit 200 µM H₂O₂ für die Zeitpunkte 1, 2 und 3 Stunden (n=6). ODQ selbst war allein, sowie in Kombination mit SNAP nicht signifikant permeabilisierend (n=3). ODQ zeigte ebenso in Kombination mit H₂O₂ im Vergleich zu der alleinigen H₂O₂-Applikation keinen zusätzlichen Effekt auf den parazellulären Mannitolfluß (n=3). Auch die Kombination von ODQ, SNAP und H₂O₂ unterschied sich signifikant von der Kontrolle. Diese Ergebnisse wiesen auf eine mögliche Bedeutung des cGMP bei der Instandhaltung der epithelialen Barriere bei oxidativem Streß hin (Abbildung 11).

4.4.2. Die Rolle des cGMP-Analogons 8-bromo-cGMP

Um diesen Aspekt noch genauer zu untersuchen, wurden Versuchsreihen mit dem cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP durchgeführt. Es wurden dabei die Konzentrationen von 10 µM, 100 µM und 1 mM apikal verwendet. Es zeigten sich in der Kombination mit 200 µM H₂O₂ apikal im Verlauf von 1, 2, und 3 Stunden keine Verminderung des durch H₂O₂ erhöhten Mannitolflusses (Daten nur für den Zeitpunkt 2h gezeigt) (n=4). 8-bromo-cGMP allein hatte keinen zusätzlichen Einfluß auf die Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle (n=4). Die Kombination von 8-bromo-cGMP und H₂O₂ unterschied sich wie die alleinige Applikation von H₂O₂ signifikant von der Kontrolle (n=4) (Abbildung 11).

4.4.3 Die Rolle der Phosphodiesterase-Inhibitoren Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Zaprinast

Durch den Einsatz von Phosphodiesterase-Inhibitoren sollte verifiziert werden, ob die Hemmung des Abbaus von basalem oder unter Induktion entstandenem intrazellulärem cGMP ebenfalls einen protektiven Effekt bei oxidativem Streß zeigt. Hierzu wurden die Phosphodiesterase-Inhibitoren IBMX (in der Konzentration von 60 μM apikal) und Zaprinast (in der Konzentration von 10 μM und 100 μM apikal) eingesetzt. IBMX hemmt alle Phosphodiesterasen und Zaprinast die PDE V und VI. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit IBMX oder Zaprinast jeweils apikal präinkubiert und anschließend mit 200 μM H_2O_2 apikal stimuliert. Es zeigte sich für die Kombination mit IBMX für den Zeitpunkt 1, 2 und 3 Stunden keine signifikante Senkung der parazellulären Permeabilität im Vergleich mit H_2O_2 allein, sondern vielmehr eine Erhöhung, die für den Zeitpunkt 1 Stunde sogar signifikant war ($n=4$). Die Kombination von 200 μM H_2O_2 und Zaprinast brachte kaum eine Veränderung der parazellulären Permeabilität im Vergleich zur alleinigen H_2O_2 -Applikation ($n=4$). IBMX und Zaprinast allein hatten keinen Einfluß auf den parazellulären Mannitolfluß bezogen auf die Kontrolle ($n=4$) (Abbildung 12).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen für 15 Minuten zunächst entweder 60 μM IBMX apikal oder 10 μM Zaprinast und anschließend zusätzlich für 15 Minuten mit SNAP 10 μM apikal präinkubiert. Darauf erfolgte die Stimulation mit 200 μM H_2O_2 apikal. Bei diesen Experimenten zeigte sich für den Zeitpunkt 1, 2 und 3 Stunden keine zusätzliche Senkung der Permeabilität im Vergleich zu H_2O_2 allein. Bei der Kombination aus H_2O_2 , SNAP und IBMX verringerte die Hinzunahme vom IBMX die protektive Wirkung von SNAP für die Zeitpunkte 1 und 2 Stunden sogar signifikant ($n=4$). Diese Verringerung der protektiven Wirkung von SNAP war ebenso bei der Hinzugabe von Zaprinast zu beobachten (für den Zeitpunkt 1, 2 und 3 Stunden) und für den Zeitpunkt 2 Stunden signifikant ($n=4$) (Abbildung 12). IBMX oder Zaprinast in Kombination mit SNAP hatten keinen Einfluß auf den parazellulären Mannitolfluß bezogen auf die Kontrolle ($n=4$) (Daten nicht gezeigt).

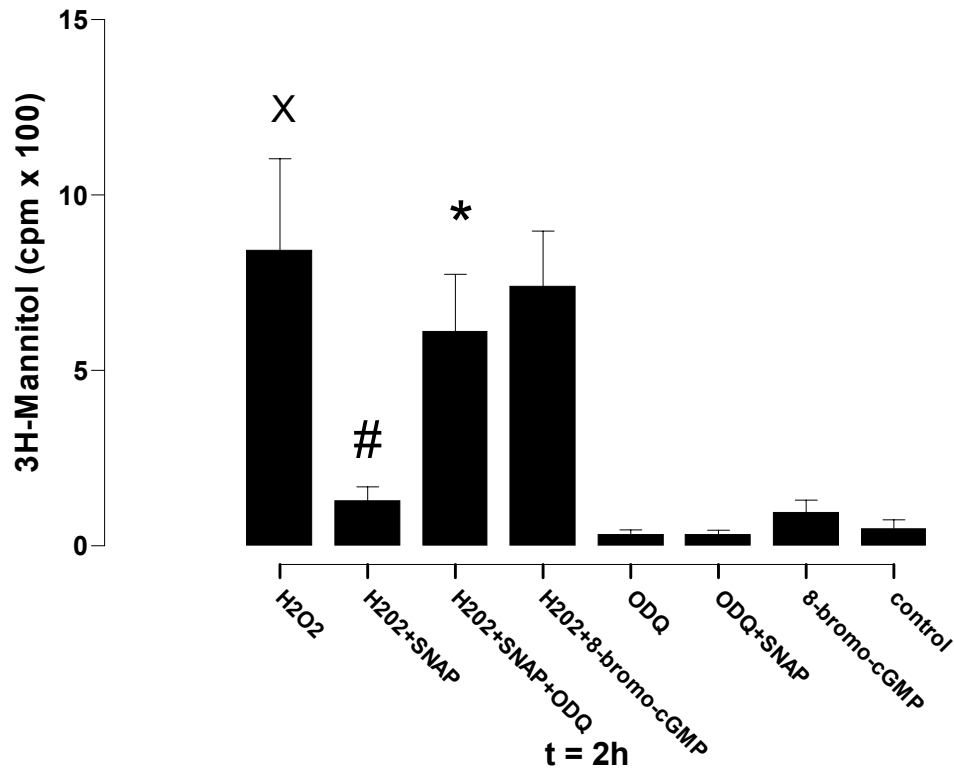


Abbildung 11: Vergleich des Einflusses von apikaler SNAP-, ODQ- und 8-bromo-cGMP-Applikation bei apikaler H₂O₂-Applikation

Die Zellen wurden vor Stimulation mit 200 μ M H₂O₂ apikal entweder für 15 Minuten mit 100 μ M SNAP apikal oder 100 μ M 8-bromo-cGMP apikal und teils 15 Minuten vor SNAP-Applikation mit 10 μ M ODQ apikal präinkubiert. Zeitpunkt des Vergleiches ist 2 Stunden nach H₂O₂-Applikation. X bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von H₂O₂ unterscheidet. * bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kombination aus SNAP und H₂O₂ unterscheidet. Die Applikation von ODQ und 8-bromo-cGMP allein ergab keinen Unterschied zur Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen bei 200 μ M H₂O₂ apikal + 100 μ M SNAP apikal aus 7, bei 200 μ M H₂O₂ apikal + 100 μ M SNAP apikal + 10 μ M ODQ apikal aus 6 und bei 200 μ M H₂O₂ apikal + 100 μ M 8-bromo-cGMP apikal aus 4 unabhängigen Experimenten.

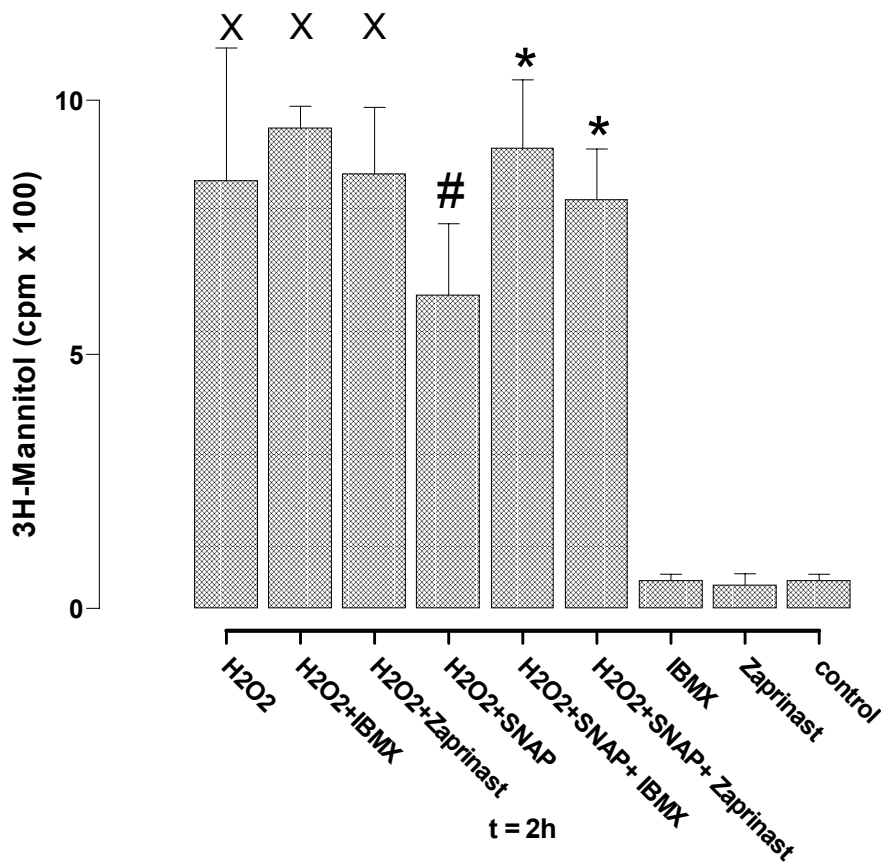


Abbildung 12: Einfluß apikal applizierter PDE-Inhibitoren auf die apikale H₂O₂-Applikation

Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 10 µM SNAP apikal und zusätzlich mit 60 µM IBMX apikal oder 10 µM Zaprinast apikal präinkubiert. Danach wurden die Zellen mit 200 µM H₂O₂ apikal stimuliert. Zeitpunkt des Vergleiches ist 2 Stunden nach H₂O₂-Applikation. X bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von H₂O₂ unterscheidet. * bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kombination H₂O₂ und SNAP unterscheidet. Die Applikation von IBMX und Zaprinast allein sowie in Kombination mit SNAP ergab keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM bei SNAP + H₂O₂ stammen aus 7, IBMX + SNAP + H₂O₂ sowie Zaprinast + SNAP + H₂O₂ aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.5 Vergleich der apikalen versus basolateralen NO-Applikation bei oxidativem Streß am Alveolarepithel

4.5.1. Effekt der apikalen SNAP-Applikation bei oxidativem Streß am Alveolarepithel

Die vorangegangenen Experimente konnten nicht klären, welche Rolle das cGMP für den Schutz der epithelialen Barriere spielt. Infolgedessen wurden weitere Versuche angeschlossen, die Aufklärung darüber geben sollten, ob antioxidative Mechanismen bei der Protektion eine Rolle spielen, oder vielmehr das cGMP. Hierzu wurde der Einfluß der apikalen und basolateralen NO-Applikation für den protektiven Effekt bei oxidativem Streß untersucht.

Die Zellen wurden in einer Versuchsreihe für 15 Minuten mit 100 μM SNAP apikal präinkubiert und wurden entweder mit 200 μM H_2O_2 apikal (n=7) oder 200 μM H_2O_2 basolateral (n=3) stimuliert. Es zeigte sich dabei für die Zeitpunkte 1, 2 und 3 Stunden, daß mit apikaler Applikation von SNAP sowohl bei apikaler als auch bei basolateraler H_2O_2 -Applikation die Epithelpermeabilität von Typ II-Zellen signifikant gesenkt werden konnte (Abbildung 13).

4.5.2 Effekt der basolateralen SNAP-Applikation bei oxidativem Streß am Alveolarepithel

Die Zellen wurden in einer weiteren Versuchsreihe für 15 Minuten mit 100 μM SNAP basolateral präinkubiert und dann wiederum entweder mit 200 μM H_2O_2 apikal oder 200 μM H_2O_2 basolateral stimuliert. Es zeigte sich dabei erneut für die Zeitpunkte 1, 2 und 3 Stunden, daß auch mit basolateraler Applikation von SNAP sowohl bei apikaler als auch bei basolateraler H_2O_2 -Applikation die parazelluläre Permeabilität auf ein etwa gleich niedriges Niveau signifikant gesenkt werden konnte. Dieser Effekt war jedoch nicht so deutlich wie bei apikaler SNAP-Applikation. Der protektive Effekt war bei der Kombination von SNAP basal mit 200 μM H_2O_2 apikal für die Zeitpunkte 2 und 3 Stunden signifikant, die Kombination von 100 μM SNAP basolateral mit 200 μM H_2O_2 basolateral jedoch für den Zeitpunkt 3 Stunden (n=3) (Abbildung 13).

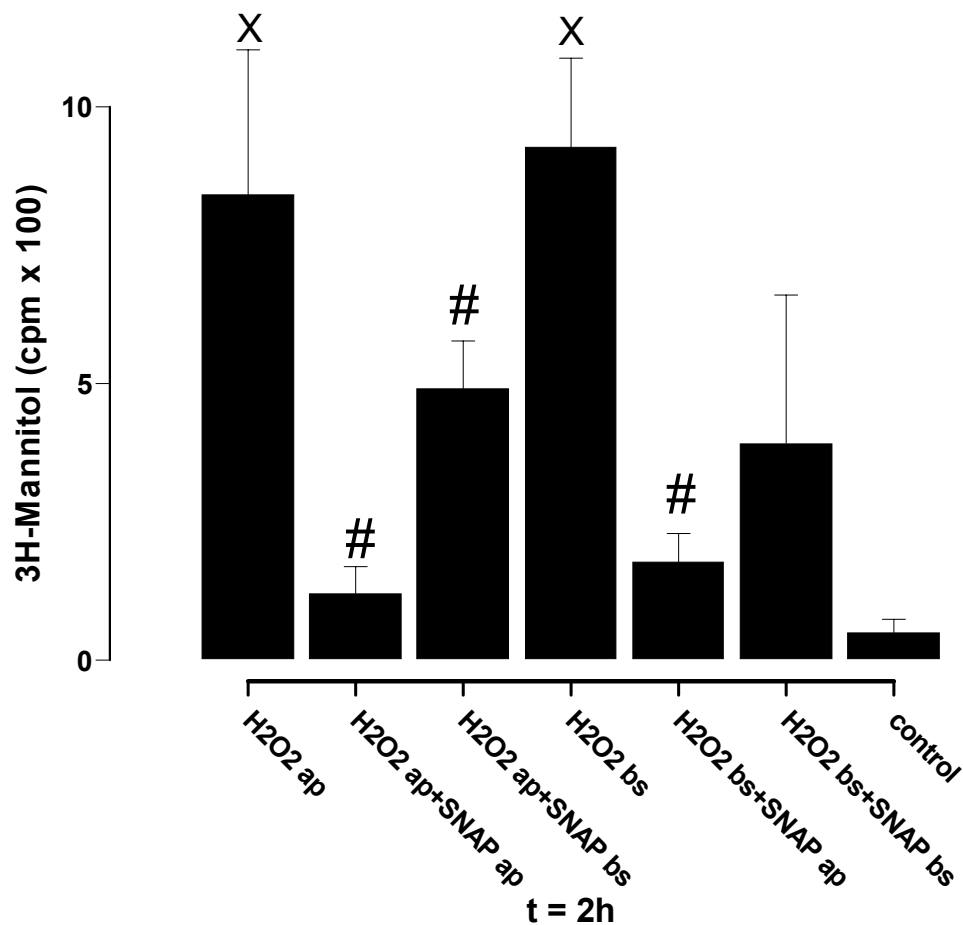


Abbildung 13: Einfluß der apikalen bzw. basolateralen SNAP-Applikation bei apikaler bzw. basolateraler H_2O_2 -Applikation

Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 100 μM SNAP apikal (ap) oder basolateral (bs) präinkubiert. Danach wurden die Zellen entweder apikal oder basolateral mit 200 μM H_2O_2 stimuliert. Zeitpunkt des Vergleiches ist 2 Stunden nach H_2O_2 -Applikation. X bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von H_2O_2 unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen bei 200 μM H_2O_2 apikal + 100 μM SNAP apikal aus 7 und bei den übrigen aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.6 Die Wirkung von NO als Antioxidans

Es schlossen sich weitere Versuche mit einem zweiten NO-Donator an, um zu klären, ob sich der protektive Effekt von SNAP bei oxidativem Streß auch bei dieser Substanz demonstrieren läßt. In diesen Versuchsreihen wurden die Zellen für 15 Minuten mit 200 μM Spermine NONOate apikal präinkubiert und im Anschluß mit 200 μM H_2O_2 apikal stimuliert. Auch der NO-Donators Spermine NONOate konnte für die Zeitpunkte 1, 2 und 3 Stunden den durch H_2O_2 -induzierten erhöhten Mannitolfluß signifikant vermindern ($n=3$) (Abbildung 14).

Um spezifische Effekte der NO-Donatoren auszuschließen und den klinischen Bezug zur Anwendung von NO bei einem entzündlichen Geschehen in der Lunge herzustellen, wurde NO-Gas in einer Konzentration von 250 ppm mit und ohne 200 μM H_2O_2 apikal eingesetzt. NO-Gas verminderte in Kombination mit H_2O_2 signifikant den durch H_2O_2 erhöhten Mannitolfluß (für den Zeitpunkt 2 Stunden nach Beginn der Begasung). NO-Gas allein war jedoch in der eingesetzten Konzentration toxisch für die epitheliale Barriere und erhöhte signifikant den Mannitolfluß ($n=3$) (Abbildung 14).

Die bisherigen Versuche unterstützten größtenteils die Hypothese, daß NO über antioxidative Mechanismen vor oxidativem Streß schützt. Um den Effekt einer bekannten antioxidativen Substanz bei oxidativem Streß an der alveolo-epithelialen Barriere zu testen, wurde 20 μM Vitamin E/ α -Tocopherol apikal in Kombination mit H_2O_2 eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden vor der eigentlichen Stimulation mit H_2O_2 mit Vitamin E präinkubiert und wie gewohnt vor der Stimulation gewaschen. Dabei zeigte sich nach H_2O_2 -Applikation im Verlauf von 3 Stunden ein verminderter parazellulärer Mannitolfluß, der jedoch nicht signifikant war, im Vergleich zu H_2O_2 allein ($n=3$). Zum Vergleich wurden die Typ II-Zellen nach Präinkubation mit Vitamin E auch mit Protamin oder ECH stimuliert. Es konnte dabei kein protektiver Effekt für Vitamin E demonstriert werden (nicht alle Daten gezeigt) (Abbildung 14).

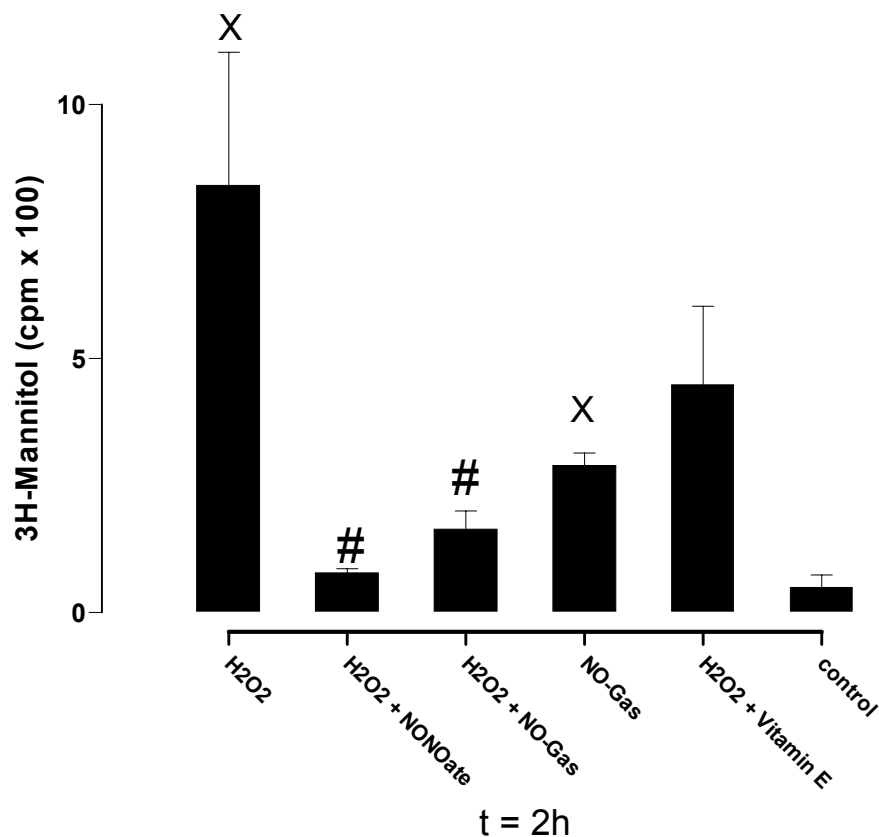


Abbildung 14: Protektiver Einfluß von Spermine NONOate, NO-Begasung und Vitamin E bei apikaler H₂O₂-Applikation im Vergleich

Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 200 µM Spermine NONOate apikal oder für 24 Stunden mit 20 µM Vitamin E apikal präinkubiert. Die Zellen wurden darauf mit 200 µM H₂O₂ stimuliert. Bei der NO-Begasung wurden die Zellen im gesamten Versuchsverlauf in einer Umgebung mit 250 ppm NO gehalten. Zeitpunkt des Vergleiches ist 2 Stunden nach H₂O₂-Applikation. X bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von H₂O₂ unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

4.7 cGMP-Produktion im Alveolarepithel unter Applikation von NO-Donatoren und Phosphodiesterase-Inhibitoren

Um festzustellen, ob und wieviel cGMP in den Alveolarepithelzellen Typ II nach Spermine NONOate-Applikation entsteht, wurden Radioimmunoassays durchgeführt. Die Inkubation mit dem exogenen NO-Donator Spermine NONOate verursachte einen signifikanten cGMP-Anstieg in den Typ II-Zellen. Diese Antwort wurde in Anwesenheit von dem spezifischen PDE-Inhibitor Zaprinast (PDE Typ V Inhibitor) und dem unspezifischen Inhibitor IBMX verstärkt (n=5) (Abbildung 15).

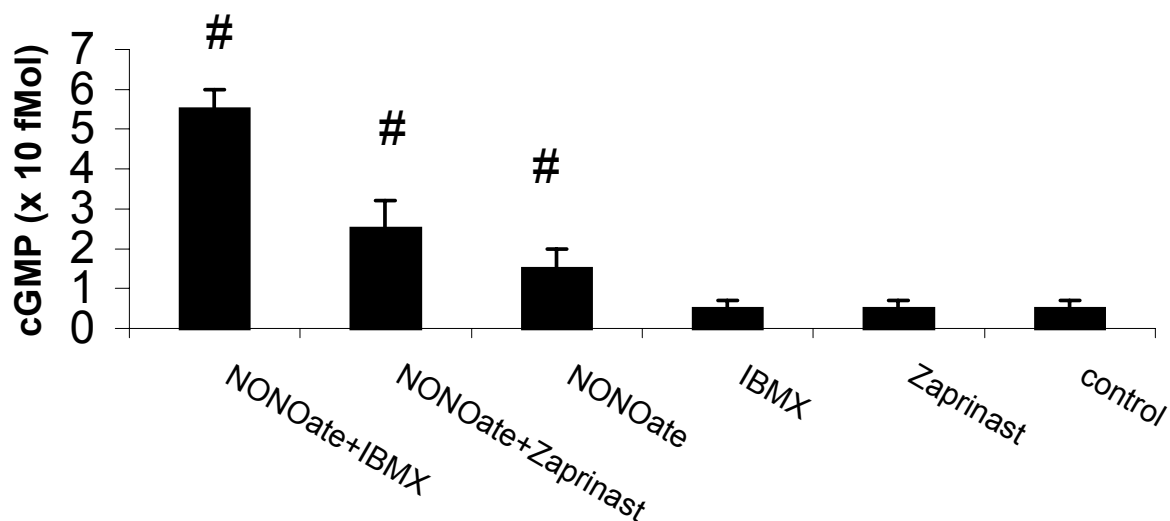


Abbildung 15: cGMP-Bildung im Alveolarepithel

Die cGMP-Ausschüttung aus dem Überstand permeierter Alveolarepithelzellen Typ II wurde mit dem kommerziell erhältlichen ^{125}I -markiertem cGMP-Radioimmunoassay quantifiziert. Gezeigt ist der Einfluß von Zaprinast und IBMX auf die Agonisten-induzierte cGMP-Bildung. Die Präinkubation mit 10 μM Zaprinast apikal und 60 μM IBMX apikal wurde für 15 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Typ II-Zellen für 30 Minuten mit 200 μM Spermine NONOate apikal oder ohne Spermine NONOate inkubiert. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der jeweiligen Kontrolle unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 5 unabhängigen Experimenten.

4.8 Der Einfluß von oxidativem Streß auf den Ionenstrom und die Leitfähigkeit im Alveolarepithel

Zur Untersuchung des alveolo-epithelialen Ionenstroms und der Leitfähigkeit wurden Alveolarepithelzellen Typ II auf Nucleoporefiltern (Snapwells) kultiviert. Die bioelektrischen Eigenschaften stellten sich wie folgt dar: Die Standard-Potentialdifferenz (Pd) betrug im Durchschnitt 8,4 mV (apikal negativ), der Kurzschlußstromes bzw. short circuit current (Isc) $3,09 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($= 0,12 \mu\text{Eq}/\text{hcm}^2$) und die Leitfähigkeit (Gt) $0,36 \text{ mS}/\text{cm}^2$. Die bioelektrischen Eigenschaften wurden aus 20 verschiedenen Monolayern bestimmt.

4.8.1 Grundlagenversuche mit Amilorid und Ouabain

Im ersten Schritt zur Untersuchung des Ionenstroms und der Leitfähigkeit von Typ II-Zellen wurden Grundlagenexperimente mit den in der Literatur gängig eingesetzten Substanzen Amilorid und Ouabain durchgeführt (Abbildung 16 und 17).

Der basolaterale Zusatz vom $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ Inhibitor Ouabain ($100 \mu\text{M}$) hatte einen raschen signifikanten Abfall des Isc zur Folge. Die Leitfähigkeit erhöhte sich ebenso signifikant ($n=4$). Die apikale Applikation von $100 \mu\text{M}$ Amilorid (ein Na^+ -Kanal- und $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiport-Inhibitor) verminderte sofort den Isc auf 40% seines ursprünglichen Wertes. Die Leitfähigkeit verminderte sich um ca. 20% bei der apikalen Zugabe ($n=4$).

4.8.2 H_2O_2 und SNAP

Nach Etablierung des Ussing-Kammer-Modells wurden die Effekte von H_2O_2 auf den alveolo-epithelialen Ionenstrom und die Leitfähigkeit untersucht. Es wurde zunächst eine Dosisreihe für die apikale H_2O_2 -Applikation erstellt. Dabei zeigte sich bei einer H_2O_2 -Konzentration von $800 \mu\text{M}$ ein rascher signifikanter Isc-Abfall auf 20%-0% des Ausgangswertes und ein Gt-Anstieg bis auf weit über 200% des Ausgangswertes innerhalb der ersten 10 Minuten. Niedrigere Konzentrationen ergaben einen späteren Isc-Abfall und Gt-Anstieg, so daß für die weiteren Experimente zur Untersuchung von kurzzeitig erzielten Effekten standardmäßig H_2O_2 in der Konzentration $800 \mu\text{M}$ als Stimulus eingesetzt wurde. Zur Überprüfung der möglichen protektiven Eigenschaften von NO-Donatoren auch bezüglich des Ionenstroms und der Leitfähigkeit wurden die Zellen bei diesen Versuchen

zunächst mit 100 μM SNAP apikal für 14 Minuten präinkubiert. Dabei konnte innerhalb dieser Zeit keine signifikante Isc- oder Gt- Veränderung festgestellt werden. Lediglich in den folgenden Minuten kam es zu einem leichten, nicht signifikanter Gt-Anstieg.

Zum Zeitpunkt der 14. Minute wurden die Zellen zusätzlich mit 800 μM H_2O_2 apikal inkubiert. Diejenigen Zellen, die mit 800 μM H_2O_2 apikal allein inkubiert wurden, hatten sofort einen signifikanten Isc-Abfall auf 20%-0% des Ausgangswertes und einen Gt-Anstieg bis weit über 200% des Ausgangswertes innerhalb der ersten 10 Minuten. Bei den Typ II-Zellen jedoch, die mit SNAP präinkubiert worden waren, fiel der Isc langsamer ab und hielt sich auf einem Niveau von 50-60% über 30 Minuten. Die Leitfähigkeit stieg im Vergleich zu H_2O_2 allein zunächst langsamer an und erreichte erst nach 15-20 Minuten Werte über 200% des Ausgangswertes (n=4). Dieser partiell protektive Effekt von SNAP war jedoch nicht signifikant. Dieses Ergebnis stellt einen weiteren möglichen Hinweis auf eine protektive Wirkung von NO für die alveolo-epitheliale Barriere dar, bezogen nun auf den Ionenstrom und die Leitfähigkeit. Bei der alleinigen SNAP-Applikation blieben der Isc- und die Gt-Werte auf Kontrollniveau (Abbildung 18).

4.8.3 H_2O_2 und Spermine NONOate

Um nun das vorherig gefundene Ergebnis mit einem weiteren NO-Donator zu verifizieren, wurden die Zellen bei den nächsten Versuchen mit 200 μM Spermine NONOate apikal für 14 Minuten präinkubiert. Dabei konnte innerhalb dieser Zeit bereits ein Isc-Abfall auf 63% des Ausgangswertes beobachtet werden, während nur eine geringe Gt-Veränderung festgestellt wurde. In den weiteren 15 Minuten erfolgte ebenso kein Gt-Anstieg, der Isc fiel hingegen weiter auf Werte um 50% des Ausgangswertes.

Zum Zeitpunkt der 14. Minute wurden die Zellen wiederum zusätzlich mit 800 μM H_2O_2 apikal stimuliert. Das Verhalten des Isc und der Gt bei der alleinigen Applikation von H_2O_2 wurde oben schon beschrieben. Bei den Zellen jedoch, die mit Spermine NONOate präinkubiert worden waren, fiel der an sich schon fallende Isc fast wie bei alleiniger H_2O_2 -Applikation ab. Die Leitfähigkeit hingegen stieg im Vergleich zu H_2O_2 allein zunächst langsamer an, erreichte aber schon nach 12 Minuten Werte von weit über 200% des Ausgangswertes (n=4). Es herrschte auch hier kein signifikanter protektiver Effekt des NO-

Donators vor. Insgesamt ließen sich der mit SNAP dargestellte verzögerte Isc-Abfall und der verzögerte Gt-Anstieg nicht deutlich nachweisen (Abbildung 19).

4.8.4 H₂O₂ und 8-bromo-cGMP

Die Zellen wurden bei diesen Versuchen mit 100 µM 8-bromo-cGMP apikal für 14 Minuten präinkubiert. Dabei konnte innerhalb dieser 14 Minuten keine signifikanten Isc- und Gt-Veränderung beobachtet werden. In den folgenden Minuten trat ebenso keine nennenswerte Isc-Veränderung ein, die Gt stieg jedoch allmählich auf Werte um die 150% des Ausgangswertes.

Zum Zeitpunkt der 14. Minute wurden die Zellen wiederum zusätzlich mit 800 µM H₂O₂ apikal inkubiert. Das Verhalten des Isc und der Gt bei der alleinigen Applikation von H₂O₂ wurde oben schon beschrieben. Bei den Zellen jedoch, die mit 8-bromo-cGMP präinkubiert worden waren, fiel der Isc erneut ähnlich wie mit H₂O₂ allein ab. Die Leitfähigkeit stieg im Vergleich zu H₂O₂ allein zunächst langsamer an, erreichte aber schon nach 12 Minuten Werte um 177% des Ausgangswertes (n=4). Insgesamt ließen sich auch hier der mit SNAP dargestellte verzögerte Isc-Abfall und der verzögerte Gt-Anstieg nicht nachweisen und implizierten keine cGMP-Beteiligung am Geschehen (Abbildung 20).

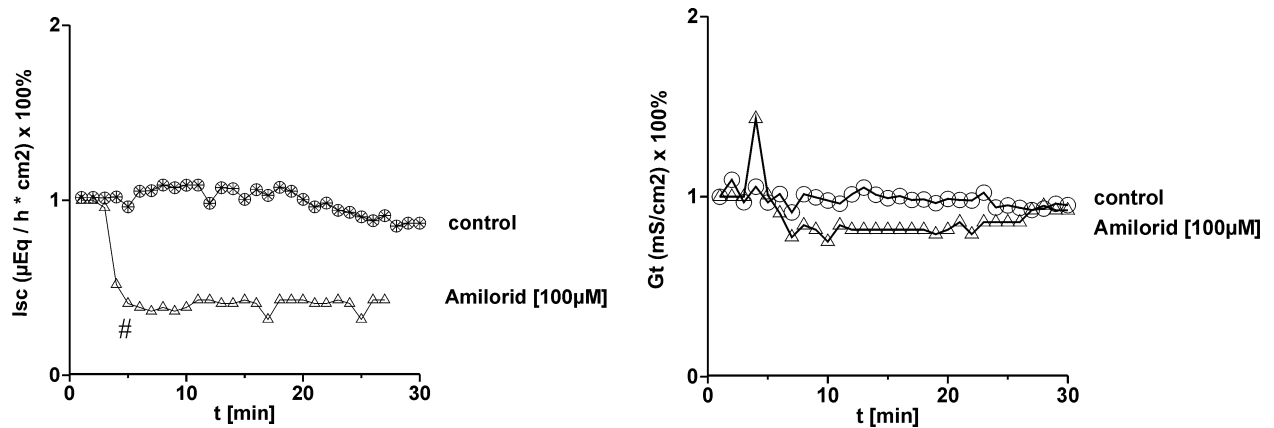


Abbildung 16

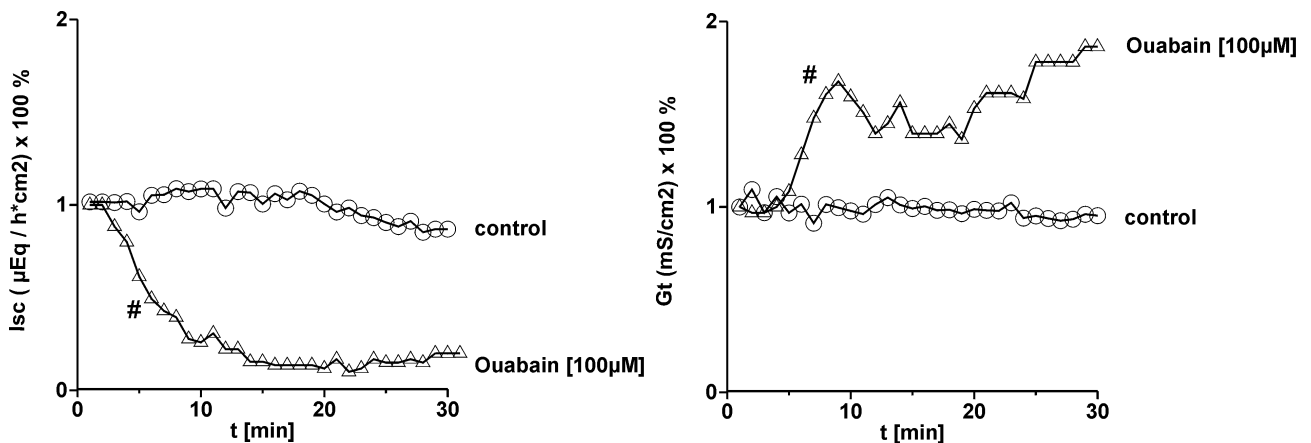


Abbildung 17

Abbildung 16 und 17 : Kontrollversuche mit Amilorid und Ouabain

Die Alveolarepithelzellen Typ II zeigten nach 2-4 Tagen mikroskopisch einen konfluenten Zellrasen und wiesen einen Widerstand vom mindestens 2000 Ohm/cm^2 auf. Die X-Achse gibt den zeitlichen Verlauf und die Y-Achse den Isc- bzw. Gt-Wert in % vom Ausgangswert an. Die Zellen wurden mit 100 μM Amilorid apikal und 100 μM Ouabain basolateral stimuliert. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen bei Abbildung 16 und 17 jeweils aus 3 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 1: I_{sc} ($\mu\text{Eq}/\text{hcm}^{-2}$) x 100 % des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt Minuten	0 100 μM Amilorid apikal	100 μM Ouabain basolateral	Kontrolle
+ 1 min	0,96 \pm 0,05	1,00 \pm 0,00	1,01 \pm 0,21
+ 3 min	0,41 \pm 0,09	0,88 \pm 0,12	1,09 \pm 0,17
+ 6 min	0,36 \pm 0,07	0,49 \pm 0,33	1,06 \pm 0,31
+ 9 min	0,43 \pm 0,12	0,27 \pm 0,34	1,02 \pm 0,33

Tabelle 2: G_t (mS/cm^2) x 100 % des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt Minuten	0 100 μM Amilorid apikal	100 μM Ouabain basolateral	Kontrolle
+ 1 min	1,43 \pm 0,59	1,08 \pm 0,14	1,05 \pm 0,21
+ 3 min	0,91 \pm 0,13	1,47 \pm 0,38	1,01 \pm 0,16
+ 6 min	0,81 \pm 0,15	1,51 \pm 0,59	0,99 \pm 0,15
+ 9 min	0,81 \pm 0,06	1,56 \pm 0,50	1,01 \pm 0,10

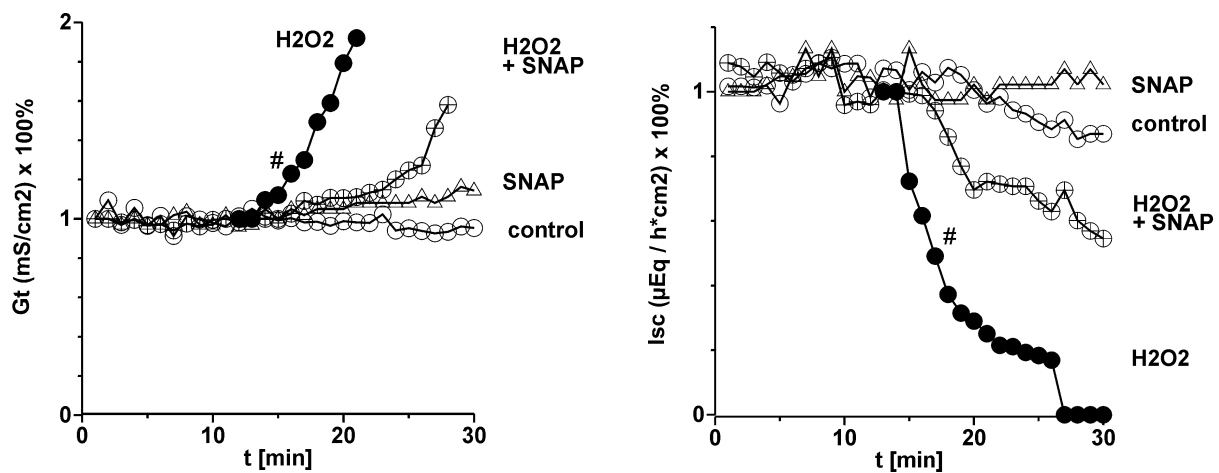


Abbildung 18: Protektiver Einfluß von SNAP auf den Isc-Abfall und Gt-Anstieg bei apikaler H₂O₂-Applikation

Die Zellen wurden 14 Minuten mit 100 µM SNAP apikal präinkubiert und anschließend mit 800 µM H₂O₂ stimuliert. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3: Isc (µEq/hcm⁻²) x 100% des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt	800 µM H ₂ O ₂ apikal	100 µM SNAP apikal	800 µM H ₂ O ₂ apikal+ 100 µM SNAP apikal	Kontrolle
14. Minute				
+ 3 min	0,72 \pm 0,31	0,97 \pm 0,03	0,94 \pm 0,09	0,98 \pm 0,39
+ 6 min	0,37 \pm 0,41	1,02 \pm 0,10	0,69 \pm 0,24	0,96 \pm 0,33
+ 9 min	0,25 \pm 0,33	1,02 \pm 0,10	0,70 \pm 0,17	0,90 \pm 0,34
+ 12 min	0,11 \pm 0,26	1,01 \pm 0,10	0,63 \pm 0,16	0,85 \pm 0,39

Tabelle 4: Gt (mS/cm²) x 100% des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt	800 µM H ₂ O ₂ apikal	100 µM SNAP apikal	800 µM H ₂ O ₂ apikal+ 100 µM SNAP apikal	Kontrolle
14. Minute				
+ 3 min	1,22 \pm 0,20	1,05 \pm 0,12	1,07 \pm 0,07	0,98 \pm 0,19
+ 6 min	1,39 \pm 0,38	1,05 \pm 0,15	1,11 \pm 0,11	0,98 \pm 0,24
+ 9 min	2,12 \pm 1,14	1,08 \pm 0,15	1,20 \pm 0,16	0,97 \pm 0,22
+ 12 min	7,11 \pm 11,09	1,08 \pm 0,15	1,46 \pm 0,53	0,93 \pm 0,26

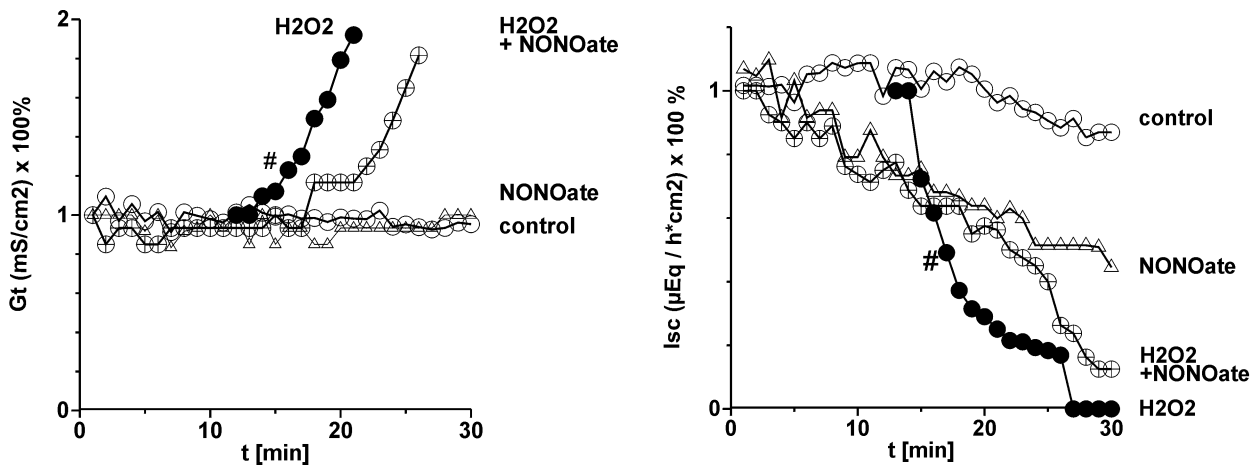


Abbildung 19: Einfluß von Spermine NONOate auf den Isc-Abfall und Gt-Anstieg bei apikaler H₂O₂-Applikation. Die Zellen wurden 14 Minuten mit 200 µM Spermine NONOate apikal präinkubiert und anschließend mit 800 µM H₂O₂ stimuliert. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 5: Isc (µEq/hcm⁻²) x 100% des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt	800 µM H ₂ O ₂ apikal	200 µM Spermine NONOate apikal	800 µM H ₂ O ₂ apikal+ 200µM Spermine NONOate apikal	Kontrolle
14. Minute				
+ 3 min	0,72±0,31	0,66±0,05	0,63±0,01	0,98±0,39
+ 6 min	0,37±0,41	0,59±0,21	0,56±0,12	0,96±0,33
+ 9 min	0,25±0,33	0,51±0,12	0,45±0,05	0,90±0,34
+ 12 min	0,11±0,26	0,51±0,12	0,23±0,17	0,85±0,39

Tabelle 6: Gt (mS/cm²) x 100% des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt	800 µM H ₂ O ₂ apikal	200 µM Spermine NONOate apikal	800 µM H ₂ O ₂ apikal + 200 µM Spermine NONOate apikal	Kontrolle
14. Minute				
+ 3 min	1,22±0,20	0,85±0,10	1,16±0,12	0,98±0,19
+ 6 min	1,39±0,38	0,93±0,10	1,16±0,12	0,98±0,24
+ 9 min	2,12±1,14	0,93±0,10	1,48±0,22	0,97±0,22
+ 12 min	7,11±11,09	0,93±0,10	1,81±0,53	0,93±0,26

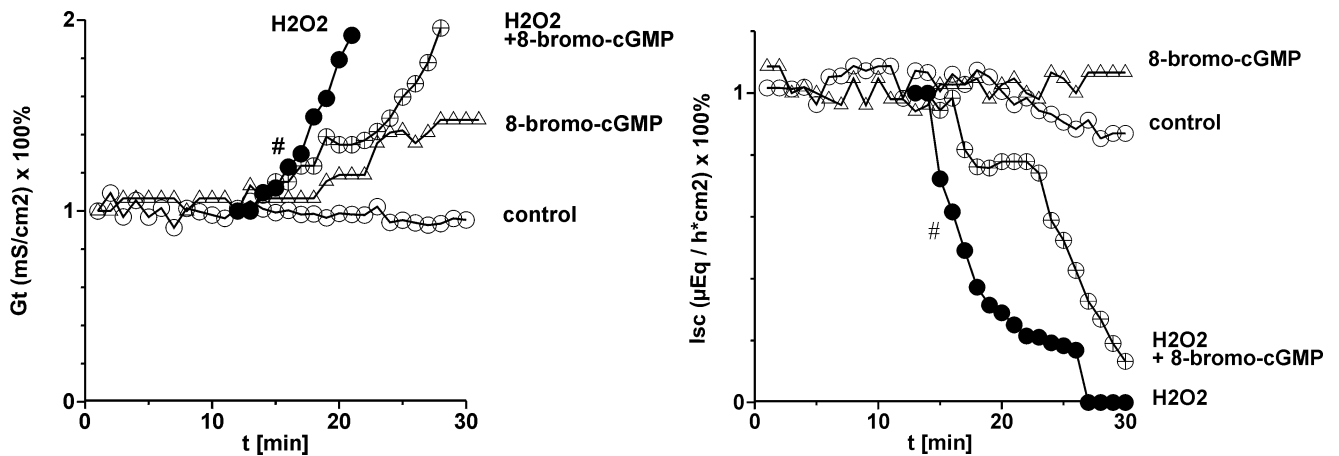


Abbildung 20: Einfluß von 8-bromo-cGMP auf den Isc-Abfall und Gt-Anstieg bei apikaler H₂O₂-Applikation

Die Zellen wurden 14 Minuten mit 100 µM 8-bromo-cGMP apikal präinkubiert und anschließend mit 800 µM H₂O₂ stimuliert. # bedeutet, daß sich der Wert signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Die Mittelwerte ± SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 7: Isc (µEq/hcm⁻²) x 100% des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt	800 µM H ₂ O ₂ apikal	100 µM 8-bromo-cGMP apikal	800 µM H ₂ O ₂ apikal+ 100 µM cGMP apikal	Kontrolle
14. Minute				
+ 3 min	0,72±0,31	1,04±0,12	0,76±0,42	0,98±0,39
+ 6 min	0,37±0,41	1,04±0,11	0,77±0,47	0,96±0,33
+ 9 min	0,25±0,33	1,06±0,01	0,58±0,34	0,90±0,34
+ 12 min	0,11±0,26	1,06±0,10	0,32±0,16	0,85±0,39

Tabelle 8: Gt (mS/cm²) x 100% des Ausgangswertes

Werte ab Zeitpunkt	800 µM H ₂ O ₂ apikal	100 µM 8-bromo-cGMP apikal	800 µM H ₂ O ₂ apikal+ 100 µM cGMP apikal	Kontrolle
14. Minute				
+ 3 min	1,22±0,20	1,06±0,09	1,15±0,14	0,98±0,19
+ 6 min	1,39±0,38	1,18±0,16	1,24±0,09	0,98±0,24
+ 9 min	2,12±1,14	1,41±0,07	1,35±0,23	0,97±0,22
+ 12 min	7,11±11,09	1,41±0,07	1,49±0,60	0,93±0,26

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die alveolo-epitheliale Barriere durch drei unterschiedliche Mechanismen geschädigt. Besonders wurden die Effekte von H_2O_2 und seiner Reaktionsprodukte, die oxidativen Streß an der alveolo-epithelialen Barriere induzieren können, untersucht. Es zeigte sich im beobachteten Zeitraum von drei Stunden ein dosisabhängiger, signifikant erhöhter parazellulärer Mannitolfluß sowohl bei apikaler als auch bei basolateraler H_2O_2 -Applikation. Dabei war die Effektivität der apikalen Applikation vergleichbar der Effektivität bei der basolateralen Applikation. Im Unterschied zu H_2O_2 schädigten Protamin als membranveränderndes Polykation und ECH als Porenbildner die von Typ II-Zellen gebildete alveolo-epitheliale Barriere zwar auch signifikant, aber mit geringerer Effektivität. H_2O_2 hatte im Vergleich zu Protamin und ECH einen 3-5 mal stärkeren Effekt auf den parazellulären Mannitolfluß.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Präinkubation mit NO-Donatoren auf den durch H_2O_2 verursachten oxidativen Streß an der alveolo-epithelialen Barriere konnte ein unterschiedlicher Effekt bei apikaler und basolateraler Applikation festgestellt werden. Die apikale Applikation des NO-Donators SNAP war deutlich protektiver als die basolaterale bei apikaler oder basolateraler H_2O_2 -Applikation. Der protektive NO-Effekt konnte anhand verschiedener NO-Donatoren sowie anhand gasförmigen Stickstoffmonoxids demonstriert werden. Inwieweit die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und die damit einhergehende Induktion der cGMP-Bildung eine Rolle spielten, blieb unklar. Die Hemmung der löslichen Guanylatzyklase bei apikaler NO-Applikation und gleichzeitiger apikaler H_2O_2 -Applikation bewirkten den Rückgang des protektiven Effektes von NO. Spezifische Phosphodiesterase-Inhibitoren wie Zaprinast sowie das cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP konnten die protektiven Effekte von NO nicht reproduzieren, sondern verschlechterten sogar den durch SNAP erreichten protektiven Effekt wieder teils signifikant. Außerdem hatten Stimulanzen der Adenylatzyklase wie Forskolin und Ilomedin und 8-bromo-cAMP bei oxidativem Streß keinen protektiven Effekt auf die parazelluläre Permeabilität.

In den mit der Ussing-Kammer durchgeführten Experimenten konnte auch ein dosisabhängiger H_2O_2 -Effekt auf den alveolo-epithelialen Ionenstrom und die Leitfähigkeit festgestellt werden. Die apikale H_2O_2 -Applikation führte zu einem raschen signifikanten

Abfall des Ionenstroms und einem Anstieg der Leitfähigkeit. Der durch H_2O_2 induzierte Effekt auf den Ionenstrom und die Leitfähigkeit konnte durch die Präinkubation der NO-Donatoren SNAP und Spermine NONOate sowie durch 8-bromo-cGMP kaum beeinflusst werden. SNAP allein hatte keinen Einfluß auf den Ionenstrom und die Leitfähigkeit, Spermine NONOate verminderte den Ionenstrom, und 8-bromo-cGMP erhöhte die Leitfähigkeit.

Die vorliegenden Experimente deuten darauf hin, daß NO die alveolo-epithelialen Barriere durch vorwiegend antioxidative Mechanismen vor oxidativem Streß schützt. cGMP hingegen scheint beim Schutz der Barrierefunktion im Rahmen von oxidativem Streß eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5.1 Oxidativer Streß in der inflammatorisch aktiven Alveole

Das Alveolarepithel spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Blut-Alveolar-Schranke und der pulmonalen Surfactantproduktion. Wenn diese Eigenschaften im Rahmen der akuten Lungenschädigung bzw. des Lungenversagens beeinträchtigt sind, kann es zum Lungenödem und dem Verlust der respiratorischen Funktionen kommen. Die akute Lungenschädigung ist u.a. eine Folge toxischer Effekte durch reaktive Sauerstoffmetaboliten. Diese werden durch Alveolar-, Gefäß- und inflammatorische Zellen generiert. Eine entscheidende Funktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten ist die immunologische Abwehrfunktion. Zahlreiche Lungenerkrankungen, wie das ARDS, die brochopulmonale Dysplasie und der Ischämie-Reperfusionsschaden, gehen mit oxidativem Streß einher (35,66,98-99).

5.1.1 Die pathogenetische Relevanz von H_2O_2 im Alveolarepithel und dessen Einfluß auf die alveolo-epitheliale Barriere

In den vorliegenden Experimenten konnte ein dosisabhängiger H_2O_2 -Effekt auf die alveolo-epitheliale Barriere beobachtet werden. Die eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen korrelieren mit denen anderer Arbeitsgruppen, die einen signifikanten Effekt auf die Barrierefunktion beobachten konnten (74,89,100-101). Sowohl bei der apikalen als auch bei der basolateralen Applikation von Wasserstoffperoxid auf Alveolarepithelzellen Typ II sah man bei zunehmender Dosierung einen zunehmenden parazellulären Mannitofluß und einen schnelleren Abfall des Kurzschlußstromes sowie eine Erhöhung der Leitfähigkeit.

Bekannt ist, daß reaktive Sauerstoffmetaboliten wie H_2O_2 und $O_2^{\cdot -}$ spezifische Veränderungen an der angegriffenen Zielzelle verursachen. Eisen-Schwefel-Enzyme beispielsweise sind direktes Angriffsziel für Superoxidanionen. Eine mögliche Erklärung für ihre Toxizität ist die Inaktivierung solcher Enzyme. Außerdem weiß man, daß Wasserstoffperoxid in der Fenton-Reaktion mit redox-aktiven Metallen zur Bildung starker Oxidantien wie Hydroxylradikalen führt (35,43-44). Hydroxylradikale reagieren schnell mit einer Reihe von Zielmolekülen. Ihr Auftreten in der Nachbarschaft der epithelialen tight junction-Strukturen könnte für den Verlust der Barrierefunktion verantwortlich sein. Bisher sind die genauen Zusammenhänge der tight junction-Regulierung insbesondere auch im Rahmen von Oxidativem Streß noch unklar. Man weiß, daß Zelloberflächencharakter, zytoskelettbildende Proteine,

Adhäsionsmoleküle, Proteinkinasen und Ca^{2+} eine zentrale Rolle spielen. Inwieweit H_2O_2 diese Faktoren beeinflusst, ist noch nicht genau aufgeklärt (22-24). Des Weiteren führt H_2O_2 in höheren Dosierungen zur ATP-Depletion, zur epithelialen Zellyse und zur Freisetzung von radioaktiv markiertem Chrom aus Typ II-Zellen (72,90). Dies kann eine Erklärung dafür darstellen, daß der antagonisierende Effekt von NO auf die Barrierschädigung von höheren H_2O_2 -Konzentrationen in unseren Versuchen weniger wirksam ist, da die Typ II-Zellen zunehmend zerstört werden und wichtige Zellfunktionen nicht mehr wahrnehmen können.

Das Ausmaß der Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere scheint auch vom Applikationsort des H_2O_2 abzuhängen. Zwar verstärkten apikal und basolateral appliziertes H_2O_2 den parazellulären Mannitolfluß in vergleichbarer Weise, von Kim et al. wurde jedoch beschrieben, daß die basolaterale Seite bezüglich des Isc und des Widerstandes sensibler gegenüber H_2O_2 ist als die apikale, was auf das Vorhandensein der Katalase an der apikalen Membran zurückgeführt wird. Apikale Ionenkanäle können demnach vor der H_2O_2 -Toxizität besser geschützt werden (74).

Im Vergleich zu H_2O_2 verursachte die Applikation von ECH und Protamin in der einem inflammatorischen Geschehen entsprechender Dosierung einen geringeren parazellulären Mannitolfluß als H_2O_2 . Dies läßt sich mit den unterschiedlichen Wirkmechanismen dieser Substanzen erklären. ECH ist ein Porenbildner und nimmt nicht speziell Einfluß auf die tight junctions. Es kann andererseits beispielsweise in humanen und porcinen Endothelzellen die NO-Bildung stimulieren (62,102). Den vorliegenden Experimenten zufolge spielt dieser Effekt bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Alveolarepithelzellen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, da exogen appliziertes NO bei der Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere durch ECH nicht protektiv gewesen ist.

Protamin bewirkt Veränderungen am Aktin-Zytoskelett und vermindert möglicherweise auf diese Weise in Kulturen von Epithelzellmonolayern den transepithelialen Widerstand und erhöht den parazellulären Mannitolfluß (54,56). In den vorliegenden Experimenten war der Effekt von Protamin im Gegensatz zum H_2O_2 geringer auf den parazellulären Mannitolfluß, weil es vermutlich die tight junctions weniger schädigt und die Zytotoxizität von H_2O_2 größer ist. NO konnte eine Barrierschädigung durch Protamin nur geringfügig verhindern. Von daher gesehen wirkt hier NO wahrscheinlich durch nicht antioxidative Mechanismen, wie z.B. über die Bildung von cGMP.

5.2 Die postulierte Rolle von Stickstoffmonoxid im Alveolarepithel

5.2.1 Protektiver Effekt von Stickstoffmonoxid auf die alveolo-epitheliale Barriere

In der Lunge kann die konstitutive Produktion von NO sowohl protektive als auch toxische Effekte haben. So können NO-vermittelte Mechanismen vor Gewebeschaden schützen durch: 1.) Vasodilatation (82,103); 2.) Veränderung der Superoxid-vermittelten Reaktivität (89-90); 3.) reduzierte Leukozytenaktivierung und verminderte Leukozytenadhäsion am Lungenendothel (17); 4.) Unterdrückung des pulmonalarteriellen Druckanstieges, Verminderung der Ödembildung, des Ventilations-Perfusions-Mißverhältnisses und des Shunt-Flusses nach Ischämie und Reperfusion (103).

Bekannte schädliche Effekte von NO sind: 1.) die Oxidation von Sulfhydrylgruppen durch die Bildung von Peroxynitrit bei der Reaktion mit Superoxidanionen (84); 2.) Hemmung der Synthese von Surfactant und bei hohen Konzentrationen der biophysikalischen Funktion des Surfactant-Systems, wobei dies wiederum auf die Bildung von Peroxynitrit zurückgeführt wird (104); 3.) Verminderung des ATP-Gehaltes in frisch isolierten Typ II-Zellen (105); 4.) Verminderung sowohl der Aktivität des apikal lokalisierten Amilorid-sensitiven Na^+ und des Ca^{2+} -Kanals (vom L-Typ) als auch der basolateral lokalisierten Na^+ - K^+ -ATPase (95,106).

In unseren Versuchen konnten wir signifikante protektive Effekte der NO-Donatoren SNAP und Spermine NONOate bei oxidativem Streß auf die alveolo-epitheliale Barriere nachweisen. Dieser Effekt war dosisabhängig, sowohl für das NO als auch für das H_2O_2 . In Kombination miteinander waren höhere Konzentrationen von NO-Donatoren protektiver und höhere Konzentrationen von H_2O_2 toxischer. Aber auch sehr hohe Konzentrationen von NO allein waren schädlich für die alveolo-epitheliale Barriere. NO-Gas (250 ppm) hatte protektive Eigenschaften in Kombination mit H_2O_2 , allein war es jedoch toxisch für die Barriere. Die PDE-Inhibitoren IBMX und Zaprinast konnten allein und in Kombination mit NO keinen bzw. keinen zusätzlichen protektiven Effekt auf das oxidativ geschädigte Alveolarepithel bewirken, sondern verstärkten sogar teilweise signifikant die Schädigung durch H_2O_2 oder verminderten den protektiven SNAP-Effekt. Eine Hemmung der zyklischen Guanylatzyklase durch ODQ reduzierte den protektiven Effekt von NO hingegen signifikant. Das cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP hatte jedoch keinen protektiven Effekt bei oxidativer Schädigung.

Diskutiert werden unterschiedliche Mechanismen des protektiven Einflusses von NO bei oxidativem Streß. Im folgenden sollen diese Mechanismen erörtert und diskutiert werden.

1. Konzentrationsabhängiger Effekt von NO

Prinzipiell hängt der protektive Effekt von der Konzentration des eingesetzten Oxidans und des NO-Donators ab. So kann NO per se in hohen Konzentrationen permeabilisierend und zytotoxisch wirken. Solche Konzentrationen können bei akuter und chronischer Inflammation, beim ARDS und beim Endotoxinschock vorkommen. Bekannt ist außerdem, daß NO in geringen Konzentrationen auch protektiv auf die Barrierefunktion wirken kann (90,93,107).

Auch in der hier dargestellten Studie zeigte sich im NO-Begasungsversuch, daß eine hohe NO-Konzentration toxisch für die alveolo-epitheliale Barriere sein kann. NO erwies sich in Kombination mit H_2O_2 selbst als weniger toxisch und konnte durch H_2O_2 ausgelösten oxidativen Streß vermindern. Außerdem waren höhere Dosierungen (100 μM im Vergleich zu 10 μM) von NO-Donatoren bei oxidativem Streß protektiver aus als niedrigere. Höhere H_2O_2 -Konzentrationen verminderten diesen Effekt jedoch wieder.

Wink et al. konnten eine direkte Korrelation zwischen Stickoxidbildung und Protektion bei Wasserstoffperoxid-vermittelter Toxizität feststellen. Es zeigte sich, daß NO-Donatoren wie DEA/NO, SNAP und GSNO NO-Konzentrationen von $>1,0 \mu M$ liefern, SIN-1, ein klassischer Peroxynitritbildner, und Natriumnitroprussid (SNP) nur $<0,3 \mu M$. Eine höhere Konzentration von NO bei oxidativem Streß ist hier mit verbessertem protektivem Effekt verbunden (92). In Darmepithelzellen kann SNAP, aber nicht GSNO oder Spermine NONOate, Methylradikale abfangen, die beim Abbau von tert-butyl-Hydroperoxid (tBOOH) entstehen. SNAP, GSNO und Spermine NONOate können die tBOOH-induzierte Erhöhung der Zelltoxizität unterdrücken (108).

2. Hemmung von Enzymen durch NO

Hämoproteine wie die Guanylatzyklase werden bei niedrigen NO-Konzentrationen aktiviert, während Cytochrom P450 und andere Eisen enthaltende Enzyme wie die Aconitase, die Lipoxygenase und die Xanthin-Oxidase durch NO gehemmt werden, jedoch teils mit Konzentrationen, die physiologisch nicht erreicht werden (86).

3. Hemmung der Lipidperoxidation durch NO

Eine Reihe von Studien konnte zeigen, daß NO in vitro die $O_2^{\cdot-}$ -abhängige Eisen- oder Hämoprotein-katalysierte Lipidperoxidation hemmt. Diese offensichtliche antioxidative Aktivität von NO hat weitere Untersuchungen nach sich gezogen, die nahelegen, daß die Interaktion zwischen NO und $O_2^{\cdot-}$ einen wichtigen Detoxifikationsmodus von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und somit einen antiinflammatorischen Abwehrmechanismus darstellt. Es gibt unterschiedliche Vorstellungen darüber, wie NO hier letztlich protektiv wirkt. Es wird zum einen angenommen, daß NO die Lipoxygenase-abhängige Lipidperoxidation via Enzyminaktivierung direkt hemmt. Zum anderen hält man für wahrscheinlich, daß NO die durch Lipidradikale ausgelösten Kettenreaktionen inhibiert. Das bei dieser Reaktion entstehende Peroxynitrit ist zwar toxisch, jedoch kommt es letztlich auch hier auf das Verhältnis von Oxidans zu Antioxidans an. So spielen wiederum die relativen Konzentrationen von NO und $O_2^{\cdot-}$ eine entscheidende Rolle. Makrophagen und Endothelzellen zeigen durch Zytokinstimulation und durch die Makrophagen-vermittelte erhöhte NO-Produktionsrate (durch iNOS Genexpression) eine Inhibition der durch $O_2^{\cdot-}$ vermittelten Lipoproteinoxidation. Man weiß außerdem, daß NO nur dann die $O_2^{\cdot-}$ -abhängige Lipidperoxidation stimuliert, wenn die Produktionsraten von NO geringer oder gleich der $O_2^{\cdot-}$ -Produktion sind. Weil NO außerdem auch schneller mit Peroxylradikalen (LOO^{\cdot}) als mit α -Tocopherol, Lycopren, Retinylderivaten und β -Carotenen reagiert, kann es allein oder mit diesen zusammen als antioxidativer Verteidiger gegen Sauerstoffradikale und gegen die durch die Lipoxygenase entstandenen oxidierten Lipide wirken (86,88).

4. Antioxidativer Effekt von NO

Einen sehr wahrscheinlichen Wirkmechanismus für die Protektion durch NO bei oxidativem Streß stellt der antioxidative Effekt dar (107). Die reaktiven Sauerstoffmetaboliten wie das $O_2^{\cdot-}$ und das OH^{\cdot} können vom NO abgefangen und in weniger toxische Metaboliten umgewandelt werden. NO wird deshalb als freier Radikalfänger diskutiert und könnte von daher ein zytoprotektiver Faktor sein (89). Vitamin E ist ein lipidlösliches Antioxidans. Es konvertiert $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} und Lipidperoxylradikale in weniger reaktive Formen. Es ist besonders effektiv bei der Unterbindung der durch die Lipidperoxidation ausgelösten Reaktionen. Auch in dieser Arbeit zeigte Vitamin E protektive Eigenschaften bei oxidativem Streß. Deshalb ist auch denkbar, daß NO ähnlich dem Vitamin E in die Lipidperoxidation eingreift und hier protektiv wirkt (35). Clerici et al. konnten für Typ II-Zellen zeigen, daß Vitamin E die H_2O_2 -

induzierte Abnahme des Natrium-gekoppelten Uptake und der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ Aktivität verhindert. Dieser protektive Effekt legt außerdem nahe, daß bei den beobachteten Effekten die Peroxidation von Membranlipiden involviert ist (110).

5. Reaktion von NO mit Eisenbindungsstellen

Der protektive Effekt von NO kann auch durch die Reaktion mit freien Eisenbindungsstellen zustande kommen. Durch die Bildung von Eisen-Nitrosyl-Komplexen kann NO als Eisenchelator fungieren und so die Fenton-Reaktion und den eisenabhängigen Elektronentransport verhindern. NO bindet an Fe^{2+} in Hämoproteinen und inhibiert so die OH-Bildung via Fenton-Reaktion (110,111). 100 μM SNAP reduziert signifikant die Netto-Oxidation von Fe^{2+} durch H_2O_2 und verhindert so die Peroxidation von Membranlipiden durch Fe^{2+} und H_2O_2 (112). Die Reaktionsgeschwindigkeit von NO mit den meisten Metallen ist jedoch langsamer als die Reaktion mit O_2^- , LO \cdot und LOO \cdot (86,111). Außerdem kann NO bei der Reaktion mit flüchtigen Metallen auch einen prooxidativen Effekt haben, z.B. durch Reduktion von Fe^{3+} . Dieses kann wiederum die Freisetzung von gebundenem Eisen induzieren und indirekt als Ersatz für ein anderes Reduktionsmittel fungieren, so daß die in der Haber-Weiss-Reaktion katalysierte Produktion von OH \cdot aus H_2O_2 resultiert (113).

6. Verminderung der Fenton-Reaktion durch NO

Im Hinblick auf die Interaktion von O_2^- und NO wird vermutet, daß als Reaktionsprodukt Peroxynitrit entstehen kann, das die Barriere schädigt. O_2^- steht somit für die Fenton-Reaktion weniger zur Verfügung, folglich wird auch weniger OH \cdot gebildet. Es ist anzunehmen, daß durch Interaktion von NO mit O_2^- weniger Fe^{3+} reduziert werden kann und daß so die Fenton-Reaktion und damit die OH \cdot -Produktion gedrosselt wird. Die Reaktion von O_2^- mit NO kann möglicherweise auch dessen Reaktion mit anderen O_2^- -sensitiven Zielmolekülen verhindern (44,87,88).

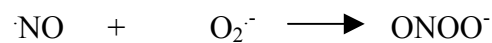
Hydroxylradikale reagieren mit einer Reihe von Zielmolekülen, wie den epithelialen tight junction-Strukturen, und könnten für einen Verlust von Barriereigenschaften verantwortlich sein. Aufgrund seiner geringen Halbwertsreichweite reagiert OH \cdot rasch und ist als das hauptsächlich schädigende Agens bei oxidativem Streß zu diskutieren (86,90,111).

Die Reduktion von Fe^{3+} erscheint auch bei anderen Epithelzellen als wichtige Voraussetzung für den durch Wasserstoffperoxid verursachten Schaden (114). Als Fe^{3+} -Reduktionsmittel zur Verhinderung der Bildung von OH \cdot stehen des weiteren z.B. Ascorbat und Glutathion zur Verfügung, die in der Zelle in höherer Konzentration als O_2^- zur Verfügung stehen. Möglich

ist außerdem eine direkte Interaktion von OH^\cdot und NO mit beispielsweise der Bildung von HNO_2 . Selbstverständlich muß ein direkter Beweis einer solchen Reaktion mittels weiterer experimenteller Arbeiten mit Techniken zur Sauerstoffradikalerkennung erfolgen. Inwieweit das OH^\cdot vom Mannitol schon abgefangen wird, bleibt bisher ebenso ungeklärt (115).

7. Bildung von Peroxynitrit durch NO

Alternativ kann das Superoxidanion bei der Reaktion mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit bzw. Peroxynitritsäure reagieren. Stickstoffmonoxid wird entweder intrazellulär von der NO -Synthetase gebildet oder kann, wie in dieser Arbeit durchgeführt, der Zelle exogen zugeführt werden. Die eigentlichen biologischen Ziele von NO sind die Guanylatzyklase und/oder Eisen enthaltende Hämoproteine. NO ist ein schwaches, nur ein freies Elektron enthaltendes Oxidans und reagiert mit dem Radikal O_2^\cdot rasch zu Peroxynitrit:



Diese Reaktion läuft dreimal schneller ab als die Reaktion zwischen dem Superoxidanion und der Superoxid-Dismutase ($2 \cdot 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und annähernd dreißig Mal schneller als die Reaktion von NO mit Hämoproteinen. Dies bedeutet, daß die Peroxynitritbildung schneller abläuft als andere Reaktionswege von NO und O_2^\cdot ($6,7 \cdot 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (87,88). Es konnte gezeigt werden, daß O_2^\cdot und nicht H_2O_2 für die Bildung von Peroxynitrit verantwortlich ist. Peroxynitrit ist kein freies Radikal, sondern ein Oxidans mit einem oder zwei freien Elektronenpaaren und ein nitrierendes Agens. Obwohl Peroxynitrit wie das Hydroxylradikal die meisten Moleküle oxidieren kann, ist die Reaktionsrate 10000fach kleiner als beim Hydroxylradikal. Dies läßt vermuten, daß Peroxynitrit besser diffundieren kann und mit selektiven Zielen reagiert. Im weiteren Reaktionsverlauf der Peroxynitritentstehung werden auch NO_2 , NO_2^+ und Intermediärprodukte mit OH -artiger Reaktivität gebildet (91). Unter den durch Peroxynitrit verursachten Reaktionen finden sich die Oxidation von Sulfhydrylgruppen, die Oxidation von Lipiden und zahlreichen Lungenproteinen wie dem Surfactantprotein A, DNA-Strang-Schäden, Hemmung mitochondrialer Enzyme wie der Aconitase sowie die Nitrierung von Tyrosin durch nicht-katalysierte und katalysierte Mechanismen (78,84,87,116).

Es gibt in experimentellen Ansätzen zahlreiche Hinweise dafür, daß Peroxynitrit unter dem Einfluß von inflammatorischen Mediatoren produziert wird. Die meisten Daten aus Tiermodellen implizieren, daß eine erhöhte NO -Produktion für die Lunge schädlich ist.

Immunohistochemische Untersuchungen von Lungengewebe pädiatrischer Patienten mit akutem Lungenschaden zeigen eine exzessive Nitrotyrosin-Bildung, was auf einen signifikanten Peroxynitrit-Effekt in der Lunge hinweist (37). Möglicherweise spielen auch NO und Peroxynitrit unter chronischen und weniger oxidierenden Bedingungen (Exposition über Tage und Wochen) bei der Exazerbation pathologischer Prozesse eine Rolle (90).

Aber auch protektive Effekte von Peroxynitrit konnten gezeigt werden. Jackson et al. wiesen nach, daß Peroxynitrit ein starker Induktor der mitochondrialen, manganhaltigen Superoxid-Dismutase (MnSOD)-Transkription ist. Diese kann ebenso zur antioxidativen Verteidigung beitragen. NO allein hat keine erhöhte MnSOD-Geninduktion zur Folge (117).

Inwieweit die hier dargestellten Mechanismen im einzelnen für den protektiven Effekt verantwortlich sind, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß ein komplexes Zusammenspiel der dargestellten, aber auch möglicher anderer Faktoren (wie z.B. das im folgenden Kapitel erörterte cGMP) den protektiven Effekt von NO erklären.

5.2.2 Unterschiedliche Wirkung von NO an Epithel- und Endothelzellen - Die Rolle von cGMP

Stickstoffmonoxid ist ein potenter endogener Vasodilatator, der eine wichtige Rolle bei der Modulation des Gefäßtonus spielt. Die endotheliale Freisetzung von NO stimuliert die lösliche Guanylatzyklase in den glatten Muskelzellen der Gefäßmuskulatur und führt so zu deren Relaxation (25). NO per se kann zudem in Endothel- und Epithelzellen zytoprotektiv wirken (118). Ob dies ein cGMP-vermittelter Effekt ist, wird kontrovers diskutiert. Für einige Epithel- und Endothelzellen konnte gezeigt werden, daß NO auch bei oxidativem Streß einen protektiven Effekt besitzt. SNAP und DEA/NO können beispielsweise sowohl den H₂O₂-Effekt als auch den des NO-Synthetase-Inhibitors L-NAME in Schweine-Endothelzellen verhindern (119). Bei Endothelzellen aus der Kaninchen-Aorta schützt NO vor Wasserstoffperoxid-vermittelter Toxizität. Aber auch bei Lungenfibroblasten vom chinesischen Hamster, Hepatomzellen und embryonalen mesencephalen Rattenzellen zeigen NO-Donatoren schützende Effekte gegenüber der H₂O₂-Toxizität (112). In porcinen pulmonalarteriellen Endothelzellen schützt die Applikation des spezifischen PDE II-Inhibitors EHNA über einen wahrscheinlich cGMP-vermittelten Effekt vor oxidativem Streß (120,121). Im Katzendünndarm hat ein durch NO vermittelter cGMP-Effekt eine verbesserte vaskuläre Protein-Clearance zur Folge (122) und bewirkt außerdem eine verminderte epitheliale Permeabilität (123). In perfundierten Kaninchenlungen schützt NO vor vaskulären Lecks nach Ischämie-Reperfusion. Dieser protektive Effekt von NO kann durch Zaprinast verstärkt werden. Im Perfusat können außerdem erhöhte cGMP-Mengen nachgewiesen werden (124). Kurzzeitige Vorbehandlung mit inhalativem NO schützt Kaninchenlungen gegen Ischämie-Reperfusionsschäden, die wohl nicht vasoregulatorisch und nicht cGMP-vermittelt sind. Zyklisches Guanosinmonophosphat scheint jedoch bei dauerhafter Inhalation mit NO in der Reperusionsphase eine wichtige Rolle zu spielen (125). Chang et al. zeigten in mikrovaskulären Rattenlungen-Endothelzellen, daß durch Oxidantien induzierter vaskulärer Endothelzellschaden durch NO-Donatoren, aber nicht durch cGMP Analoga verhindert werden kann, was auf einen cGMP-unabhängigen und mehr NO vermittelten schützenden Effekt hindeutet (126).

NO kann sich bei oxidativem Streß aber auch schädigend auswirken. Bei pulmonalarteriellen Endothelzellen von Rindern beispielsweise verstärkt NO die Wasserstoffperoxid-vermittelte Permeabilitätserhöhung (113).

In dieser Arbeit spricht gegen einen schützenden NO-vermittelten cGMP-Effekt bei oxidativem Streß, daß mit dem cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP kein protektiver Effekt gezeigt werden konnte. Des weiteren zeigten die PDE-Inhibitoren Zaprinast, das vor allem den cGMP-Abbau hemmt, und IBMX keine protektiven Eigenschaften bei oxidativem Streß, sondern verminderten den protektiven SNAP-Effekt vielmehr, was ebenso die Rolle von cGMP bei der Protektion in den Hintergrund treten läßt. Wahrscheinlich ist der Rückgang des protektiven Effektes von NO durch ODQ am ehesten so zu werten, daß eine gewisse Konzentration an cGMP in den Typ II-Zellen notwendig und diese jedoch bei oxidativem Streß vermindert ist. Die NO-Donatoren selbst hatten bezogen auf die Kontrolle keinen Einfluß auf die parazelluläre Permeabilität. Höhere NO-Dosierungen wie beim NO-Begasungsexperiment zeigten jedoch gegenteilige Effekte. Dies spricht aber nicht prinzipiell gegen einen möglichen durch NO-vermittelten cGMP-Effekt. Diese dosisabhängigen, teils zytoprotektiven, teils schädigenden Effekte sind bereits beschrieben (92,127). Weiterhin ist unklar, ob ODQ selbst Einfluß auf das Molekül NO ausüben kann und es so zu einem verminderten antioxidativen Effekt von NO kommt. ODQ allein und in Kombination mit H_2O_2 war aber für die Typ II-Zellen nicht zusätzlich schädlich. Postuliert man, daß H_2O_2 den intrazellulären cGMP-Level senkt und dieser durch NO-Donatoren normalisiert wird, könnte dies eine weitere Möglichkeit für einen NO-vermittelten cGMP-Effekt zum Schutz vor oxidativem Streß darstellen. H_2O_2 kann nämlich per se in die Signaltransduktionskaskade eingreifen und diese modulieren, indem es Sulphydrydrylgruppen von intrazellulären Proteinkinasen oxidiert (31,32). Für die Typ II-Zellen sind diese Mechanismen aber noch unklar.

5.2.3 Diskussion des Unterschiedes von apikaler und basolateraler NO-Applikation bei oxidativem Streß

In der durchgeführten Untersuchungsreihe konnte gezeigt werden, daß bei apikaler Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere durch H_2O_2 die apikale Applikation von NO wirksamer ist als die basolaterale. Bei basolateraler Schädigung mit H_2O_2 ist die apikale Applikation von NO ebenfalls protektiver als die basolaterale. In Bezug auf den parazellulären Mannitolfluß waren die Dosisreihen der basolateralen H_2O_2 -Applikation zur apikalen kaum unterschiedlich. Diese Daten, die eben den parazellulären Mannitolfluß zum Gegenstand hatten, unterscheiden sich in gewisser Weise von den von Kim et al. bei Typ II-Zellen erhobenen Daten. Hier wurden der Isc und der Widerstand bei H_2O_2 -Applikation apikal und basolateral untersucht. Dort fand sich bei gleichen Konzentrationen, daß die apikale Wirkung deutlich schwächer als die basolaterale ausfällt. Diskutiert wird, daß H_2O_2 hier basolateral Membrankomponenten wie die Na^+K^+ -Adenosintriphosphatase beeinflusst. Apikales H_2O_2 hingegen wird von der Katalase größtenteils abgebaut (72).

Es ist anzunehmen, daß auch basolateral appliziertes H_2O_2 bzw. dessen Abbauprodukte, sprich andere reaktive Sauerstoffmetaboliten wie OH^\cdot , an den tight junctions Schädigungen hervorrufen können und vermehrt auf parazellulärem Weg oder transzellulär an die apikale Membran gelangen. Ähnliche Schädigungsmuster an apikalen Strukturen durch basolateral appliziertes H_2O_2 und umgekehrt scheinen so denkbar. Die Isc- und Gt-Veränderungen durch H_2O_2 werden hingegen durch komplexe Veränderungen an der apikalen und basolateralen Membran verursacht, die auch auf die tight junction-Regulierung Einfluß haben können. Stickstoffmonoxid reagiert jedoch schnell und hat kaum die Möglichkeit, die Zellen zu durchwandern. Es reagiert prompt mit membranösen Strukturen und den reaktiven Sauerstoffmetaboliten. Da diese aufgrund der H_2O_2 -Permeabilität überall entstehen können, könnte NO mit H_2O_2 und den anderen reaktiven Sauerstoffmetaboliten wie OH^\cdot und $O_2^{\cdot-}$ reagieren. Möglicherweise hat apikal appliziertes NO eine entscheidendere Wirkung auf die Verhinderung der Lipidperoxidation und die Depletion des ATP, das bei der Instandhaltung der tight junctions eine wichtige Rolle spielt (26,35,43,44).

Die Stimulierung der löslichen Guanylatzyklase mit anschließender cGMP-Bildung ist ebenso wie schon oben diskutiert ein weiterer Aspekt, wobei dies nicht der entscheidende Mechanismus für die Protektion zu sein scheint. Für den cGMP-Effekt spricht, daß die

apikale NO-Applikation einen deutlicheren protektiven Effekt als die basolaterale hat; für den antioxidativen, daß auch die basolaterale SNAP-Applikation eine Verminderung des parazellulären Mannitolfusses bewirkt. Insgesamt scheint letztlich die kurze Diffusionsstrecke von NO der limitierende Faktor zu sein, so daß apikal appliziertes NO den Schutz der apikal wichtigeren Strukturen garantiert. Dies und auch das Vorhandensein vieler weiterer Schutzfaktoren an der apikalen Membran bzw. in der Alveolarflüssigkeit (SOD, Katalase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase) unterstützen die Annahme, daß vor allem die apikale Membran eine besondere Bedeutung bei Aufrechterhaltung der alveolo-epithelialen Barriere besitzt und diese besonders geschützt werden muß (71). Zusammenfassend läßt sich aus den gewonnenen Daten ablesen, daß bei oxidativem Streß die apikale SNAP-Applikation und somit die apikale NO-Applikation protektiver ist als die basolaterale. Die genaue Ursache dieser Beobachtung müssen erst weitere Experimente zeigen.

5.3 Vergleich der Wirksamkeit von Aktivatoren der Guanylatzyklase und der Adenylatzyklase beim Schutz vor oxidativem Streß auf das Alveolarepithel

Aufgrund der bekannten protektiven Eigenschaften von cAMP und cGMP im Endothel bei oxidativem Streß führten wir Versuche mit Alveolarepithelzellen Typ II durch. Die im Endothel gezeigten Ergebnisse konnten für dieses Epithel nicht reproduziert werden.

Im Vergleich zwischen den NO-Donatoren SNAP und Spermine NONOate auf der einen Seite sowie den Adenylatzyklasestimulanzien Forskolin und Ilomedin und dem cAMP-Analogon 8-bromo-cAMP auf der anderen Seite zeigten letztere keine protektiven Eigenschaften bezüglich des erhöhten parazellulären Mannitolfusses bei oxidativem Streß. Apikal eingesetzt wurden Forskolin (10 µM und 50 µM), Ilomedin (10 nM und 50 nM) und 8-bromo-cAMP (10 µM, 100 µM und 1 mM). Diese Substanzen hatten keinen schädigenden Effekt verglichen mit der Kontrolle. Bei der Kombination mit 200 µM H₂O₂ apikal konnte im Verlauf über 1, 2 und 3 Stunden keine signifikante Verbesserung oder Verschlechterung der Permeabilität verglichen mit der alleinigen H₂O₂-Applikation festgestellt werden. Auch der Einsatz des PDE-Inhibitors Rolipram in der Dosierung 10 µM apikal hatte sowohl allein als auch in der Kombination mit Forskolin keinen Effekt auf eine erhöhte parazelluläre Permeabilität im Rahmen von oxidativem Streß.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Experimenten konnten in Versuchen mit Endothelzellen protektive Effekte von Stimulanzien der Adenylatzyklase und cAMP gezeigt werden. Bei perfundierten intakten Kaninchenlungen schädigt intravaskulär verabreichtes H₂O₂ die mikrovaskuläre endotheliale und alveolo-epitheliale Barriere. Pharmaka wie Prostaglandin E₁ und Forskolin, die die cAMP-Erhöhung direkt stimulieren, sowie der Phosphodiesterase-Inhibitor Zadaverin, der die PDE III und IV hemmt, schützen teilweise einzeln und in Kombination die endotheliale Barriere und in einem geringeren Maß die epitheliale Barriere vor oxidativem Streß. Diese Beobachtungen führt man auf direkte Effekte auf die parazelluläre Permeabilität durch cAMP zurück. Der genaue Mechanismus, wie cAMP den durch H₂O₂ verursachten Effekt behebt, ist bisher unklar. H₂O₂ induziert einen intrazellulären Abfall von ATP, NADH, Glutathion, cAMP-Level und erhöht die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration. Stimulanzien der Adenylatzyklase scheinen diese Effekte im Endothel teils rückgängig zu machen (100). Langelier und Hinbergh konnten unter Iloprost verbesserte Barriereigenschaften in ruhenden humanen Endothelzellen beobachten (128). Warren et al.

zeigten, daß eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration in glatten Muskelzellen Ödeme durch erhöhten Blutfluß fördern, daß jedoch erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen im Endothel die Ödembildung durch Verstärkung der Barriere und Verminderung der Permeabilität verhindern (129).

Da in den vorliegenden Experimenten mit Typ II-Zellen kein cAMP-vermittelter protektiver Effekt für die bei oxidativem Streß erhöhte parazelluläre Permeabilität festgestellt konnte, kann man davon ausgehen, daß bei Typ II-Zellen, wie schon oben diskutiert, vielmehr direkt antioxidativ wirkende Mechanismen eine Rolle spielen. Forskolin, Ilomedin und Rolipram besitzen per se keine antioxidativen Eigenschaften und können demnach nur über den cAMP-Anstieg und die daraus resultierenden intra- und interzellulären Prozesse und Reaktionsvorgänge wirken. Diese Mechanismen scheinen zur Protektion der Typ II-Zellen vor oxidativem Streß mit Erhöhung der parazellulären Permeabilität eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5.4 Diskussion des Einflusses von H₂O₂ und NO auf den alveolo-epithelialen Ionenstrom und die Leitfähigkeit

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde festgestellt, daß H₂O₂ in dosisabhängiger Form bei apikaler Applikation den aktiven Ionenstrom signifikant vermindert und die Leitfähigkeit signifikant erhöht. Korrespondierend zu den parazellulären Mannitolflußmessungen wurde der Einfluß von SNAP, Spermine NONOate und 8-bromo-cGMP bei oxidativem Streß untersucht. Sowohl der durch H₂O₂-induzierte Isc-Abfall als auch der Gt-Anstieg konnten in der Kombination mit apikal appliziertem SNAP, weniger mit apikal appliziertem Spermine NONOate, aber nicht mit apikal appliziertem 8-bromo-cGMP verzögert werden. Bei der SNAP-Applikation in Kombination mit H₂O₂ hielt sich der Isc über 30 min um 50-60% im Vergleich zur alleinigen H₂O₂-Applikation konstant. Es konnten jedoch keine signifikant protektiven Effekte gemessen werden. SNAP verursachte bei der alleinigen Applikation ebenso keine signifikanten Veränderungen der Gt und des Isc im Vergleich zur Kontrolle. Spermine NONOate allein verminderte den Isc. Die Gt wurde kaum beeinflusst. Bei der alleinigen 8-bromo-cGMP-Applikation blieb der Isc auf Kontrollniveau. Die Gt hingegen stieg im Verlauf auf Werte von 150% des Kontrollwertes an.

Im Alveolarepithel beim Säugetier sind die Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Barriere insgesamt komplex. Für zahlreiche Gewebearten ist bereits bekannt, daß H₂O₂ die epithelialen Barriereigenschaften direkt beeinflusst. Beispielsweise wird der Na⁺-K⁺-Transport in der Rinderlinse von der ATP-Hydrolyse bei H₂O₂-Applikation abgekoppelt (130). Die Na⁺-K⁺-ATPase wird in sarkolemmalen Vesikeln von Ratten durch H₂O₂ inaktiviert (131). Die bilaterale H₂O₂-Applikation bei MDCK-Zellen führt zur raschen Leitfähigkeitserhöhung und gesteigertem Mannitolfluß (101). Bei Typ II-Zellen konnte gezeigt werden, daß basolateral appliziertes H₂O₂ den aktiven Ionentransport und den Widerstand mit einer 100fach höheren Sensitivität gegenüber der apikalen Applikation senkt (72). Ebenso erhöhen milde H₂O₂-Konzentrationen die Na⁺-K⁺-ATPase-Funktion bei Alveolarepithelzellen Typ II, was auf Regulationsmöglichkeiten und antioxidative Mechanismen der Typ II Zellen bei subletalem oxidativem Streß hinweist (132). Wie oben schon diskutiert, stellen Veränderungen der Transportproteine, Zelladhäsionsmoleküle und die Beeinflussung der tight junctions durch H₂O₂ und dessen Folgeprodukte mögliche Erklärungen der beobachteten Phänomene bei oxidativem Streß dar.

Der Na^+ -Transport ist im Alveolarepithel ein wichtiger Prozeß zur Limitierung der Flüssigkeitsansammlung in der Alveole in pathologischen Situationen. Es gibt einen aktiven Natriumtransport, der Natrium aus der Alveole entfernt; Wasser strömt hierbei passiv nach. Dieser aktive Reabsorptionsprozeß wird durch Agentien stimuliert, die den cAMP-Gehalt der Zelle erhöhen (1,18,80,95). Die physiologische Bedeutung von NO ist hier bisher unterschätzt worden. Unsere Experimente zeigten eine Inhibition des Na^+ -Transports durch Spermine NONOate und nicht durch SNAP. Die transepitheliale Na^+ -Absorption erfordert eine koordinierte Funktion der apikalen Na^+ -Kanäle und der basolateralen Na^+ - K^+ -ATPase. Die Hemmung dieser Mechanismen durch NO mag durch Erhöhung des cGMP oder Aktivierung der cGMP-Kinase, durch Reduktion zellulärer ATP-Level oder durch direkte Interaktion mit wichtigen Aminosäuren von Transportproteinen verursacht werden.

NO, das im Rahmen der Inflammation u.a. von Typ II-Zellen und Makrophagen produziert wird, moduliert den Na^+ -Iontentransport in Typ II-Zellen durch die Inhibition des apikalen Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanals und der basolateralen Na^+ - K^+ -ATPase durch einen cGMP-unabhängigen Mechanismus. Außerdem vermindert NO den vektoriellen Na^+ -Transport in Typ II-Zellen (93). In einer anderen Arbeitsgruppe wurde bei Alveolarepithelzellen Typ II der Ratte nach NO-Stimulation eine durch zyklisches Guanosinmonophosphat vermittelte Inhibition eines Kationenkanals beobachtet (95). Die hier bei Guo et al. und Jain et al. beobachteten Ergebnisse sind möglicherweise auch so zu deuten, daß es bei unterschiedlichen NO-Donatoren (GNSO, Spermine NONOate und SNAP) zu Substanz-spezifischen Effekten kommt. Diskutiert wird, daß durch SNAP etwas weniger NO freigesetzt wird als durch Spermine NONOate und eine erhöhte NO-Konzentration den apikalen Natriumkanal hemmt (92). Messungen der NO-Produktion sind in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt worden. Eine andere Möglichkeit ist, daß durch die eingesetzten NO-Donatoren unterschiedlich Einfluß auf verschiedene Ionenkanäle und auf die Signaltransduktion genommen wird. Der in dieser Arbeit beobachtete Effekt, daß 8-bromo-cGMP allein die Leitfähigkeit erhöht, steht im Widerspruch zu den NO-Donatoreffekten. Der Ionenstrom blieb jedoch unbeeinflußt, was mit den von Guo et al. erhobenen Daten in Einklang steht (93). Auch bei anderen Epithelzellen ist der Einfluß von NO auf den epithelialen Ionenstrom bekannt. NO aus Bradykinin-stimulierten Endothelzellen und Spermine NONOate vermindern den Netto- $^{22}\text{Na}^+$ -Fluß und den Na^+ -Isc bei kortikalen Sammelrohren (135).

Es gibt einige Hinweise, daß cGMP eine Rolle bei der Modulierung der Ionenkanäle hat. Bei renalen Sammelrohrzellen von Ratten können 28-pS Kationenkanäle durch cGMP per se und durch cGMP-Kinase-induzierte Phosphorylierung in ihrer Aktivität vermindert werden (133). In Trachealepithelzellen stimuliert cGMP die Natrium-Resorption und Chlorid-Sekretion (134). Auch bei A549-Lungeneithelzellen kann NO einen Chlorid-Kanal durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus aktivieren (136).

LPS ist ein Zellmembranbestandteil Gram-negativer Bakterien und fällt im Rahmen einer durch diese Bakterien ausgelösten Sepsis vermehrt an. Es kann direkt oder via Induktion der NO-Bildung zu zahlreichen Effekten an der Zielzelle führen. Bei Typ II-Zellen stimuliert LPS den Natrium-gekoppelten Transport durch einen Prozeß, der die Proteinsynthese involviert, und schützt partiell vor H₂O₂-induziertem Abfall des Natrium-abhängigen Alanin- und Phosphattransports (137). Makrophagen können bei der Modulation des Ionenstroms bei Typ II-Zellen ebenso Einfluß nehmen. Sie inhibieren nach LPS-Stimulation (via NO) den Amilorid-sensitiven Natriumkanal (106). Auch der durch H₂O₂-induzierte erhöhte parazelluläre Mannitolfluß kann durch apikale, aber nicht basolaterale Präinkubation mit LPS vermindert werden. Dieser protektive Effekt wird der durch LPS-induzierten Hochregulierung der NO-Synthese zugeschrieben. Der schützende Mechanismus scheint die Reaktion von NO mit den reaktiven Sauerstoffmetaboliten zu sein (138).

Auch Peroxynitrit spielt eine wichtige Rolle in der Physiologie des Ionenstroms und der Leitfähigkeit. Bei der Inhalation von hohen Konzentrationen von NO-Gas, speziell wenn sie mit hohen Konzentrationen von Sauerstoff gekoppelt sind, sowie in Anwesenheit von inflammatorischen Zellen in der Alveole und im Lungeninterstitium können signifikante Mengen von Peroxynitrit in der Alveolarflüssigkeit entstehen, die antioxidative Verteidigungsmechanismen überwinden und Schutzigenschaften des Alveolarepithels beeinträchtigen. Peroxynitrit inhibiert den Na⁺-Uptake frisch isolierter Typ II-Zellen durch Hemmung des Amilorid-sensiblen Kanals. Im Gegensatz dazu vermindern die reaktiven Sauerstoffmetaboliten den durch Amilorid inhibierbaren Na⁺-Uptake nicht bei Konzentrationen, die in vivo im Rahmen der Inflammation beobachtet werden (139).

Auch in unseren Versuchen kann Peroxynitrit bei der Schädigung der Typ II-Zellen eine Rolle gespielt haben. So ist vorstellbar, daß bei Spermine NONOate in Kombination mit hoher Wasserstoffperoxidkonzentration mehr Peroxynitrit gebildet wird als in Kombination

mit SNAP. Weitere experimentelle Untersuchungen über den Wirkmechanismus des protektiven und toxischen Effektes von NO auf die alveolo-epitheliale Barriere bei oxidativem Streß müssen hier weitere Aufklärung schaffen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Ionenstrom- und Leitfähigkeitsmessungen unterstreichen die Bedeutung von NO zur Vermeidung der Ödembildung im Rahmen von oxidativem Streß. Zwar sind die gezeigten protektiven Effekte der NO-Donatoren bei oxidativem Streß deutlich geringer als für den parazellulären Mannitolfluß. Dies hängt aber höchst wahrscheinlich mit der höheren eingesetzten H_2O_2 -Konzentration in den Ussing-Kammer-Experimenten zusammen. Die vorliegenden experimentellen Beobachtungen hängen mit den schon oben diskutierten unterschiedlichen Einflußmöglichkeiten von NO auf oxidativen Streß zusammen. So sind (I) die antioxidativen Eigenschaften, (II) die Rolle von Peroxynitrit, (III) die Rolle von cGMP, (IV) die mögliche Bindung von freiem Eisen durch NO und (V) die Verhinderung der Lipidperoxidation mit in die Überlegungen einzubeziehen.

5.5 NO und das ARDS - Charakterisierung der klinischen Bedeutung von NO bei oxidativem Streß und Sepsis

NO spielt eine wichtige Rolle bei der akuten und chronischen Inflammation, dem „systemic inflammatory response syndrome“ und der Sepsis. Monozyten, Alveolarmakrophagen, Kupffer-Zellen und Neutrophile Granulozyten sind, einmal stimuliert, in der Lage, NO zu synthetisieren. NO kann dabei eine Vasodilatation, die Bildung von Ödemen und die Modulation von sensorischen Nervenenden bewirken. Es herrschen zur Zeit unterschiedliche Auffassungen darüber, ob eine Unterdrückung oder Förderung der NO-Bildung bei oxidativem Streß und Sepsis förderlich sind (83,85,86).

Anhand des klinischen Bildes des ARDS, bei dem es zum Lungenödem kommt, lassen sich die Folgen des oxidativen Stresses aufzeigen (140). Als Ursache finden sich neben primär pulmonaler und sekundär hämatogener Inflammation auch toxische, hypoxische und durch mechanischen Unterdruck ausgelöste Formen, die eine akute Austauschstörung der Lunge nach sich ziehen. Es kommt zur pulmonalen Flüssigkeitseinlagerung (interstitielle und alveolare Ödembildung bei endo-epithelialer Permeabilitätssteigerung), Störung der pulmonalen Vasomotion (pulmonale Vasokonstriktion, Mikroembolisation, Mikrothrombosierung) und Abnahme der Lungencompliance (Atelektasenbildung durch Störung der alveolären Sufactantproduktion) (11,34).

Ein Ansatz zur Therapie des ARDS ist die inhalative Applikation von NO. Verwendet wird es jedoch zur Zeit wegen seiner bekannten vasodilatativen Wirkung und nicht wegen seiner antioxidativen Wirkung. Die Inhalation von NO bei Patienten mit schwerwiegendem ARDS reduziert den pulmonalarteriellen Druck und verbessert die arterielle Oxygenation durch Verbesserung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses, ohne systemisch eine Vasodilatation zu verursachen (141). Man geht aber sowohl bei NO als auch bei PGI₂ und PGE₁ davon aus, daß sie zahlreiche weitere biologische Effekte hervorrufen, die nicht akut meßbar sind, die jedoch wahrscheinlich ebenso erhebliche Relevanz für die Progression oder Regression der Erkrankung besitzen. Einfluß auf die endo-epithelialen Schrankenfunktionen, Host-Defense-Kompetenz im Alveolarraum und Mesenchymaktivierung sind wichtige Schlagworte in diesem Zusammenhang. So soll sich die Inhibition der Lymphozytenproliferation, die antimikrobielle und tumorizide Aktivität nach Induktion der iNOS, auf eine Hemmung der Elektronentransportkette und des Krebs-Zyklus, die Bildung von OONO⁻ und die Inhibition

der DNA-Synthese zurückführen lassen (142). Chollet-Martin et al. konnten bei ARDS-Patienten Veränderungen der Neutrophilenfunktion und der Zytokinlevel unter NO-Inhalation feststellen. Nach 4 Tagen NO-Inhalation (18 ppm) zeigten PMN, die aus bronchoalveolaren Lavagen gewonnen wurden, eine Verminderung der spontanen H₂O₂-Produktion und der β_2 -Integrin CD11b/CD18-Expression. Dies könnte ein Hinweis auf die antiinflammatorische Funktion von NO beim ARDS sein (36).

Zusammenfassend ließ sich in den durchgeführten Experimenten feststellen, daß die apikale Präinkubation mit NO-Donatoren besser als die basolaterale vor oxidativem Streß an der alveolo-epithelialen Barriere schützte. Dieser protektive Effekt war in bezug auf den parazellulären Mannitolfluß deutlicher als für den epithelialen Ionenstrom und die Leitfähigkeit. Als Ursache für den protektiven NO-Effekt lassen sich antioxidative Mechanismen mit Radikal-Radikal-Interaktionen vermuten. So stellt wahrscheinlich die Interaktion von NO und reaktiven Sauerstoffmetaboliten einen wichtigen Detoxifikationsweg bei oxidativem Streß dar und repräsentiert auf diese Weise einen endogenen Anti-Inflamationsmechanismus. cGMP scheint bei der Protektion der alveolo-epithelialen Barriere vor oxidativem Streß eine untergeordnete Rolle zu besitzen.

6 Zusammenfassung

Die Alveolarepithelzelle Typ II spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der alveolo-epithelialen Barriere. Sie limitiert die Passage von Makromolekülen vom Interstitium in den Alveolarraum. Einen wichtigen Pathomechanismus bei der Entstehung des ARDS stellt die Schädigung dieser Barrierefunktion in der Alveole durch reaktive Sauerstoffmetaboliten dar.

Die vorliegende Arbeit unterstützt die Hypothese, daß NO protektiv auf die alveolo-epitheliale Barriere bei oxidativem Streß wirkt. Dabei scheint die antioxidative Eigenschaft von NO vordergründig zu sein.

- SNAP und Spermine NONOate, beides NO-Donatoren, zeigten signifikante protektive Effekte bei oxidativem Streß, indem sie die durch H_2O_2 verursachte parazelluläre Permeabilitätserhöhung verhinderten. Dabei erwies sich die apikale NO-Applikation als protektiver in Vergleich zur basolateralen Applikation, sowohl bei apikaler als auch bei basolateraler H_2O_2 -Applikation. Steigende H_2O_2 -Konzentrationen schädigten die alveolo-epitheliale Barriere zunehmend. Der protektive Effekt des NO korrelierte positiv mit steigender NO-Konzentration, wobei eine NO-Konzentration von 250 ppm zwar in Kombination mit H_2O_2 protektiv, solitär appliziert jedoch schädigend wirkte.
- Die PDE-Inhibitoren IBMX und Zaprinast konnten allein und in Kombination mit NO keinen bzw. keinen zusätzlichen protektiven Effekt auf das oxidativ geschädigte Alveolarepithel bewirken, sondern verminderten den protektiven SNAP-Effekt teils signifikant.
- Eine Hemmung der zyklischen Guanylatzyklase durch ODQ reduzierte den protektiven Effekt von NO signifikant. Das cGMP-Analogon 8-bromo-cGMP hatte jedoch keinen protektiven Effekt auf die oxidative Schädigung.
- Die durch das Polykation Protamin und den Porenbildner ECH verursachte Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere konnte durch NO-Donatoren nicht beeinflusst werden.

- Im Vergleich zu den NO-Donatoren SNAP und Spermine NONOate zeigten Forskolin und Ilomedin (beides Stimulanzien der Adenylatzyklase) sowie das cAMP-Analogon 8-bromo-cAMP keine protektiven Eigenschaften bezüglich des erhöhten parazellulären Mannitolflusses bei oxidativem Streß.
- H₂O₂ verursachte eine signifikante Senkung des Isc und eine signifikante Erhöhung der Leitfähigkeit. Sowohl der Isc-Abfall, als auch der Leitfähigkeitsanstieg konnten in der Kombination mit SNAP, aber kaum mit Spermine NONOate und 8-bromo-cGMP verzögert werden.

NO hat demnach bei oxidativem Streß protektive Eigenschaften für die alveolo-epitheliale Barriere. Dabei scheint die antioxidative Eigenschaft von NO im Vordergrund zu stehen. Eine cGMP-Beteiligung ist aufgrund der vorliegenden Experimente denkbar, aber nicht entscheidend. Vielmehr scheint ein komplexes Zusammenspiel von Reaktionen innerhalb und außerhalb der Alveolarepithelzelle für die beobachteten Effekte verantwortlich zu sein. Allerdings ist NO in hohen Konzentrationen toxisch für die alveolo-epitheliale Barriere.

Die vorliegenden Befunde eröffnen die therapeutische Perspektive, pharmakologisch das inflammatorische Krankheitsbild des ARDS zu beeinflussen.

7 Literaturverzeichnis

1. Mason RJ, Shannon JM. Alveolar type II cells. *The Lung: Scientific foundations* 1997. Lippincott-Raven Publishers, 543-555.
2. Dobbs LG. Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1990;258:L134-L147.
3. Mason RJ, Williams MC, Greenleaf RD, Cleements JA. Isolation and properties of type II alveolar cells from rat lungs. *Am Rev Respir Dis* 1977;115:1015-1026.
4. Mason RJ, Williams MC. Phospholipid composition and ultrastructure of A549 cells and other cultured pulmonary epithelial cells of presumed type II cell origin. *Biochem Biophys Acta* 1980;617:36-50.
5. Dobbs LG, Geppert EF, Williams MC, Greenleaf RD, Mason RG. Metabolic properties und ultrastructure of alveolar type II cells isolated with elastase. *Biochem Biophys Acta* 1980;618:510-523.
6. Yeaman C, Grindstaff KK, and Nelson WJ. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* 1999;79:73-98.
7. Kim SK. Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:641-649.
8. Le Gall AH, Yeaman C, Muesch A, Rodriguez-Boulan E. Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin Nephrol* 1995;15:272-284.
9. Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol* 2000;279:G477-482.
10. Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 1998;60:161-177.
11. Luce JM. Acute injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1998;26:369-376.
12. Anderson JM, Balda MS, Fanning AS. The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:772-778.
13. Bhat M, Toledo-Velasquez D, Wand L, Malanga CJ, Ma JK, Rojanasakul Y. Regulation of tight junction permeability by calcium and cell cytoskeleton in rabbit tracheal epithelium. *Pharm Res* 1993;10:991-997.
14. Matsukawa Y, Lee VH, Crandall ED, Kim KJ. Size-dependent dextran transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J Pharm Sci* 1997;86:305-309.

15. Guadiz G, Sporn LA, Goss RA, Lawrence SO, Marder VJ, Simpson-Haidaris PJ. Polarized secretion of fibrinogen by lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:60-69.
16. Matsukawa Y, Yamahara H, Yamashita F, Lee VH, Crandall ED, Kim KJ. Rates of protein transport across rat alveolar epithelial cell monolayers. *J Drug Target* 2000;7:335-342.
17. Nevriere R, Guery B, Mordon S, Zerimech F, Charre S, Wattel F, Chopin C. Inhaled NO reduces leukocyte-endothelial cell interactions and myocardial dysfunction in endotoxemic rats. *Am J Physiol* 2000;278:H1783-1790.
18. Saumon G, Basset G, Bouchonnet F, Crone C. C-AMP and beta-adrenergic stimulation of rat alveolar epithelium. *Europ J Phys* 1987;410:464-470.
19. Bartels H, Oestern H-J, Voss-Wembter. Communicating-occluding junction complexes in the alveolar epithelium. *Am Rev Respir Dis* 1980;121:1017-1024.
20. Junqueira LC, Carneiro J. Histologie. *Springer Verlag* 1991; 3. Auflage:100-106.
21. Knust E. Control of epithelial cell shape and polarity. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:471-475.
22. Balda MS, Matter K. Tight junctions. *J Cell Sci* 1998;111:541-547.
23. Mandara JL. Tight junction dynamics: Is paracellular transport regulated? *Cell* 1988;53:497-498.
24. Anderson JM, van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 1995;269:G467-G475.
25. Ignarro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochemical pharmacology* 1991;41:485-490.
26. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
27. Deetjen P, Speckmann EJ. Physiologie. *Urban & Fischer* 1999; 3. Auflage:569-571.
28. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
29. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995;82:1598-1610.
30. Forth W, Henschler D. Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftsverlag*, 6. Auflage:100-102.
31. Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular function. *Int Rev Cytol* 1999;188:203-255.

32. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999;31:53-59.
33. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad Biol Med* 1997;22:269-285.
34. Hulsmann AR, Raatgeep HR, den Hollander JC, Bakker WH, Saxena PR, de Jongste JC. Permeability of human isolated airways increase after hydrogen peroxide and poly-L-arginine. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:841-846.
35. Heffner JE and Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defence. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:531-554.
36. Chollet-Martin S, Gatecel C, Kermarrec N, Gougerot-Pocicaldo MA, Payen DM. Alveolar neutrophil function and cytokine levels in patients with the adult respiratory distress syndrome during nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:985-990.
37. Panus PC, Shearer J, Freeman BA. Pulmonary metabolism of reactive oxygen species. *Exp Lung Res* 1988;14:959-976.
38. Ayars GH, Altmann LC, Rosen H, Doyle T. The injurious effects of neutrophils on pneumocytes in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:964-973.
39. Simon RH, DeHart PD, Todd R 3rd. Neutrophil-induced injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells. *J Clin Invest* 1986;78:1375-1386.
40. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 1992;107:397-418.
41. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982;47:12-26.
42. Freeman BA, Panus PC, Matalon S, Buckley BJ, Baker RR. Oxidant injury to the alveolar epithelium: biochemical and pharmacologic studies. *Res Rep Health Eff Inst* 1993;54:1-39.
43. Matthay MA, Geiser T, Matalon S, Ischiropoulos H. Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999;27:2028-30.
44. Martin L, Krunkowsky TM, Adler KB. The role of oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environ Health Perspect* 1997;105:1301-1307.
45. Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:241-248.
46. Crim C, Longmore WJ. Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes. *Am J Physiol* 1995;268:L129-135.
47. Warburton D, Buckley S, Cosico L, Forman HJ. Sublethal oxidant injury inhibits signal transduction in rat type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1989;257:L217-L220.

48. LaCaginin LB, Bowman L, Ma JYC, Miles PR. Metabolic changes in alveolar-type II cells after exposure to hydrogen peroxide. *Am J Physiol* 1990;259:L57-L65.
49. Rice KL, Duane PG, Archer SL, Gilboe DP, Niewoehner DE. H₂O₂ injury causes Ca²⁺-dependent and -independent hydrolysis of phosphatidylcholine in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;263:L430-438.
50. Meehan WJ, Spencer JP, Rannels DE, Welch DR, Knobbe ET, Ostrander GK. Hydrogen peroxide induces oxidative DNA damage in rat type II pulmonary epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 1999;33:273-278.
51. Kang JH, Kim SM. DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydroxide peroxide system. *Mol Cells* 1997;7:777-782.
52. Gardner PR. Superoxide production by the mycobacterial and pseudomonad quinoid pigments phthiocol and pyocyanine in human lung cells. *Arch Biochem Biophys* 1996;333:267-274.
53. Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Chea V, Matsukuma K, Gilchrist D, Wang H, Chan C. H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 1998;111:3209-3220.
54. Peterson MW, Gruenhaupt D. Protamine increases the permeability of cultured epithelial monolayers. *J Appl Physiol* 1990;68:220-227.
55. Rochat T, Casal J, Hunninghake GW, Peterson MW. Neutrophil cathepsin G increases permeability of cultured type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1988;255:C603-C611.
56. Saumon G, Soler P, Martet G. Effect of polycations on barrier and transport properties of alveolar epithelium in situ. *Am J Physiol* 1995;269:L1-L10.
57. Ghofrani HA, Kohstall MG, Weissmann N, Schmehl T, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F. Alveolar epithelial barrier functions in ventilated perfused rabbit lungs. *Am J Physiol* 2001;280:L896-904.
58. Suttorp N, Flöer B, Schnittler H, Seeger W, Bhakdi S. Effects of Escherichia coli hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* 1990;58:3796-3801.
59. Menestrina G, Mackman N, Holland IB, Bhakdi S. E.coli hemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochem Biophys Acta* 1987;905:109-116.
60. Welch RA, Dellinger EP, Minshaw B, Falkow S. Hemolysin contributes to virulence of extra-intestinal E. coli infections. *Nature* 1981;294:665-667.
61. van den Bosch JF, Emody L, Keteyi I. Virulence of hemolytic strains of Escherichia coli in various animal models. *FEMS Microbiol Lett* 1982;13:427-430.
62. Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Pötsch B, Spriesterbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W. Human endothelial cell activation and mediator release in response to

the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 1997;159:1909-1916.

63. Rose F, Kiss L, Grimminger F, Mayer K, Grandel U, Seeger W, Bieniek E, Sibelius U. E. coli hemolysin-induced lipid mediator metabolism in alveolar macrophages: impact of eicosapentaenoic acid. *Am J Physiol* 2000;279:L100-109.

64. Suttorp N, Hessz T, Seeger W, Wilke A, Koob R, Lutz F, Drenckhahn D. Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin. *Am J Physiol* 1988;255:C369-C376.

65. Seeger W, Obernitz R, Thomas M, Walmrath D, Holland IB, Grimminger F, Eberspächer B, Hugo F, Bhakdi S. Lung vascular injury after administration of viable hemolysin-forming Escherichia coli in isolated rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:797-805.

66. Folz R, Crapo JD. Pulmonary oxygen toxicity. *Curr Pulmonol* 1994;15:113-136.

67. Boucher R., van Scott M, Willumsen N. Mechanisms and cell biology of airway epithelial injury. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:S41-S44.

68. Simon RH, Edwards JA, Reza MM, Kunkel RG. Injury of rat pulmonary epithelial cells by H₂O₂: dependence on phenotype and catalase. *Am J Physiol* 1991;260:L318-L325.

69. Kinnula VL, Chang L, Everitt JI, Crapo JD. Oxidants and antioxidants in alveolar Type II cells: in situ, freshly isolated, and cultured cells. *Am J Physiol* 1992;262:L69-L77.

70. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82:291-295.

71. Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1990;86:962-971.

72. Kim KJ, Suh DJ. Asymmetric effects of H₂O₂ on alveolar epithelial properties. *Am J Physiol* 1993;264:L308-L315.

73. Cheek JM, Kim KJ, Crandall ED. Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am J Physiol* 1989;256:C688-C693.

74. Wang X, Kleymann TR, Thoda H, Marunaka Y, O'Brodovich. 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amilorid sensitive Na⁺ currents in intact fetal distal lung epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71:58-62.

75. Matalon S. Mechanisms and regulation of ion transport in adult mammalian alveolar type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1991;261:C727-C738.

76. Matalon S, Benos DJ, Jackson MJ. Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na⁺ channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1996;271:L1-L22.

77. Goodman BE, Kim KJ, and Crandall ED. Evidence for active sodium transport across alveolar epithelium in rat lung. *J Appl Physiol* 1987;62:2460-2466.

78. Mason RG, Williams MC, Widdicombe JH, Saunders MJ, Misfeldt DS, Berry LC. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:6033-6037.
79. Lubman RL, Chao DC, Crandall ED. Basolateral localisation of $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter activity in alveolar epithelial cells. *Respir Physiol* 1995;100: 15-24.
80. Goodman BE, Brown SE, and Crandall ED. Regulation of transport across pulmonary alveolar epithelial cell monolayers. *J Appl Physiol* 1984;57:703-710.
81. Cott GR, Sugahara K, Mason R. Stimulation of net active ion transport across alveolar type II cell monolayers. *Am J Physiol* 1986;250:C222-C227.
82. Davis MG, Hagen PO. The vascular endothelium, a new horizon. *Ann Surg* 1993; 218:593-609.
83. Clancy RM, Abramson SB. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;210:93-101.
84. Stammler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1808-1902.
85. Royall JA, Kooy NW, Beckmann JS. Nitric oxide-related oxidants in acute lung injury. *New Horiz* 1995;3:113-22.
86. Rubbo H, Darley-USmar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue radical injury. *Chem Res Toxicol* 1996;9:809-820.
87. Beckmann JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-C1437.
88. Beckmann JS, Chen J, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury by nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-1624.
89. Huie RE, Padmaja S. Reaction of NO with O_2^- . *Free Radic Res Commun* 1993;18:195-199.
90. Guitierrez HH, Nieves B, Chulmley P, Rivera A, Freeman BA. Nitric oxide regulation of superoxide dependent lung injury: oxidative protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:43-52.
91. Radi R, Beckmann JS, Freeman BA. Peroxynitrate induced membrane lipidperoxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:481-487.
92. Wink DA, Cook JA, Mitchel JB. The effect of various nitric oxide donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* 1996;331:241-248.

93. Guo Y, Duvall MD, Crow JP, Matalon S. Nitric oxide inhibits Na⁺ absorption across alveolar Type II cell monolayers. *Am J Physiol* 1998;274:L369-377.
94. Compeau CG, Rotstein OD, Tohda H, Marunaka Y, Rafii B, Slutsky AS, O`Brodovich H. Endotoxin-stimulated alveolar macrophages impair lung epithelial Na⁺ transport by an L-arg-dependent mechanism. *Am J Physiol* 1994;266:C1330-C1341.
95. Jain L, Chen XJ, Brown LA, Eaton DC. Nitric oxide inhibits lung sodium transport through a cGMP-mediated inhibition of epithelial cation channels. *Am J Physiol* 1998;274:L475-L484.
96. Kikkawa Y, Yoneda K. The type II epithelial cell of the lung. I. method of Isolation. *Lab Invest* 1974;30:76-84.
97. Mason RJ, Walker SR, Shields BA, Henson JE, Williams MC. Identification of rat alveolar type II epithelial cells with tannic acid and polychrome stain. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:786-788.
98. Wright DT, Cohn LA, Li H, Fischer B, Li CM, Adler KB. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. *Environ Health Perspect* 1994;102:85-90.
99. Wilborn AM, Evers LB, Canada AT. Oxygen toxicity to the developing lung of the mouse: role of reactive oxygen species. *Pediatr Res* 1996;40:225-232.
100. Seeger W, Hansen T, Rössig R, Schmehl T, Schütte H, Krämer H-J, Walmrath D, Weissmann N, Grimminger F, Suttorp N. Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial and epithelial permeability-effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition. *Microvasc Res* 1995;50:1-17.
101. Welsh MJ, Shasby DM, Husted RM. Oxidants increase paracellular permeability in cultured epithelial cell line. *J Clin Invest* 1985;76:1155-1168.
102. Suttorp N, Fuhrmann M, Tannert-Otto S, Grimminger F, Bhakdi S. Pore-forming bacterial toxins potently induce release of nitric oxide in porcine endothelial cells. *J Exp Med* 1993 178:337-41.
103. Hermle G, Schuette H, Walmrath D, Geiger K, Seeger W, Grimminger F. Ventilation-perfusion mismatch after lung ischemia-reperfusion. Protective effect of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1179-1187.
104. Hallman M, Bry K. Nitric oxide and lung surfactant. *Semin Perinatol* 1996;20:173-185.
105. Haddad IY, Zhu S, Crow J, Barefield E, Gadilhe T, Matalon S. Inhibition of alveolar type II cell ATP and surfactant synthesis by nitric oxide. *Am J Physiol* 1996;270:L898-906.
106. Ding JW, Dickie J, Marunaka Y, Rotstein OD. Inhibition of amiloride-sensitive sodium-channel activity in distal lung epithelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1998;274:L378-L387.

107. McQuaid KE, Keenan AK. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp Physiol* 1997;82:369-76.
108. Chamulitrat W. Nitric oxide inhibited peroxy and alkoyl radical formation with concomitant protection against oxidant injury in intestinal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1998;355:206-214.
109. Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 1991;1:130-136.
110. Clerici C, Friedlander G, Amiel C. Impairment of sodium-coupled uptakes by hydrogen peroxide in alveolar type II cells: the protective effect of d-alpha-tocopherol. *Am J Physiol* 1992;262:L541-L548.
111. Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reaktive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp* 1995;61:33-45.
112. Dehnim AC, Morrow SE, Nakayama DK. Nitric oxide inhibits peroxide-mediated endothelial toxicity. *J Surg Res* 1998;75:127-137.
113. Okayama N, Kevil CG, Alexander JS. Nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol* 1997;42:C1581-1587.
114. Hiraishi H, Terano A, Razandi M, Sugimoto T, Haranda T, Ivey KJ. Role of iron and superoxide in mediating hydrogen peroxide injury to cultured rat gastric cells. *Gastroenterology* 1993;104:780-788.
115. Meconi MJ, Unno N, Funk MP. Nitric oxid-donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrate. *Biochem Biophys Acta* 1998;16:186-203.
116. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg* 1995;221:220-235.
117. Jackson RM, Parish G, Helton ES. Peroxynitrate modulates MnSOD gene expression in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25: 463-472.
118. Cooke JP, Tsao PS. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation* 1993;88:2451-2454.
119. Gupta MP, Evanoff V, Hart CH. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-mediated injury to porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol* 1997;272:L1133-L1141.
120. Suttorp N, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krüll M, Podzuweit T. Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol* 1996;270:C778-C785.
121. Suttorp N, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krüll M, Seybold L. Phosphodiesterasen-Inhibitoren und pulmonale Strohmabahn - ein neuer Therapieeinsatz? *Atemw.-Lungenkrkh* 1996;11:S560-S566.

122. Lutz KL, Siahaan TJ. Molecular structure and apical junction complex and its contribution to the paracellular barrier. *J Pharm Sci* 1997;86:977-984.
123. Kubes P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in feline small intestine. *Am J Physiol* 1992;262:G1138-G1142.
124. Schütte H, Witzenrath M, Mayer K, Weissmann N, Schell A, Rosseau S, Seeger W, Grimminger F. The PDE inhibitor zaprinast enhances NO-mediated protection against vascular leakage in reperfused lungs. *Am J Physiol* 2000;279:L469-L502.
125. Schütte H, Witzenrath M, Mayer K, Rosseau S, Seeger W, Grimminger F. Short term preconditioning with inhaled nitric oxide protects rabbit lungs against ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2001;72:1363-70.
126. Chang J, Rao NV, Markewitz BA, Hoidal JR, Michael JR. Nitric oxide donor prevents hydrogen peroxide-mediated endothelial cell injury. *Am J Physiol* 1996;270:L931-L940.
127. McQuaid KE, Smyth EM, Keenan AK. Evidence for modulation of hydrogen peroxide-induced endothelial barrier dysfunction by nitric oxide in vitro. *Eur J Pharmacol* 1996;307:233-41.
128. Langelier EG, van Hinsbergh VWM. Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelial cell monolayers: role of cAMP. *Am J Physiol* 1991;260:C1052-C1059.
129. Warren JB, Wilson AJ, Rasphal KL, Coughlan ML. Opposing roles of cyclic AMP in the vascular control of edema formation. *FASEB J* 1994;7:1394-1400.
130. Garner WH, Garner MH, Spector A. H₂O₂-induced uncoupling of bovine lens Na⁺-K⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci* 1983;80:2044-2048.
131. Janero DR, Hrenuik D, Sharif HM. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): lethal peroxidative membrane injury. *J Cell Physiol* 1991;149:347-364.
132. Gonzales-Flecha B, Evelson P, Ridge K, Sznajder JJ. Hydrogen peroxide increases Na⁺/K⁺-ATPase function in alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1996;1290: 46-52.
133. Stoos BA, Garcia NH, Garvin JL. Nitric oxide inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:89-94.
134. Light DB, Corbin JD, Stanton BA. Dual ion-channel regulation by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Nature* 1990;344:336-339.
135. Schwiebert EM, Potter ED, Hwang TH, Woo JS, Ding C, Qiu W, Guggino WB, Levine MA, Guggino SE. cGMP stimulates sodium and chloride currents in rat tracheal airway epithelia. *Am J Physiol* 1997;272:C911-922.
136. Kamosinska B, Radomski MW, Duszyk M, Radomski A, Man SF. Nitric oxide activates chloride currents in human epithelial cells. *Am J Physiol* 1997;272:L1098-L1104

137. Azarian R, Clerici C, Coutee S, Friedlander G, Amiel C. Lipopolysaccharides stimulate Na-dependent transport in alveolar cells and protect against oxidant injury. *J Cell Physiol* 1995;163:328-338.
138. Rose F, Guthmann B, Tenenbaum T, Fink L, Ghofrani HA, Weissmann N, Haenze J, Kummer W, Seeger W, Grimminger F. Apical but not basolateral endotoxin preincubation protects alveolar epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier function - role of nitric oxide synthesis. *J Immunol* 2002;169:1474-1481.
139. Hu P, Ischiropoulos H, Beckman JS, Matalon S. Peroxynitrate inhibition of oxygen consumption and sodium transport in alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1999;266:L628-L634.
140. Seeger W, Grimminger F, Walmrath D. Therapie des ARDS. *Intensivmed* 1999;36:104-125.
141. Rossant R, Falke KJ, Lopez F. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993; 328: 399-405.
142. Walmrath D, Schneider T, Schermuly R, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W. Direct comparison of inhaled nitric oxide and aerosolized prostacyclin in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:991-996.

8 Publikationsverzeichnis

- 2002 Rose F, Guthmann B, Tenenbaum T, Fink L, Ghofrani HA, Weissmann N, Haenze J, Kummer W, Seeger W and Grimminger F. „Apical but not basolateral endotoxin preincubation protects alveolar epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier function: role of nitric oxide synthesis“. *The Journal of Immunology* 2002;169:1474-1481.
- 2002 Tenenbaum T, Kramm CM, Laws HJ, Nürnberger W, Lenard HG, Göbel U. „Pre-eruptive zoster virus encephalitis in two children after haematopoietic stem cell transplantation“. *Med and Pediatr Oncol* 2002;38:288-289.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Tobias Tenenbaum
Auf'm Hennekamp 12
40225 Düsseldorf
geb. am 13. August 1973 in Offenbach
verheiratet
Kinder: 1 Tochter

Schulbildung

1980 - 1984	Grundschule Lauterborn Offenbach
1984 – 1986	Edith-Stein-Schule Offenbach (Förderstufe)
1986 - 1993	Leibnizgymnasium Offenbach
Juni 1993	Abitur, Note 1.5

Studium

seit 10/1993	Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
1995	Ärztliche Vorprüfung, Note 2.0
1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2.0
1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2.0

Studium im Ausland

10/1996 - 4/1997	Auslandssemester an der University of Nottingham/ UK
3/1997	Final Medical Examination an der University of Nottingham, Staatsexamen nach dem dortigen fünften Studienjahr

Famulaturen im In- und Ausland

1996	Innere Medizin im Kath. Krankenhaus Gießen, Dr. Schwing
1997	Pädiatrie an der Universität Nottingham, Prof. Dr. N. Rutter und Prof. Dr. T. J. Stephenson
1998	Radiologie in Offenbach, Drs. Blasel, Falk, Petrosa, Preiß

Praktisches Jahr

4/ 1999-5/ 2000	1.Tertial: Innere Medizin (Lich), Prof. Dr. G. Goubeaud 2.Tertial: Pädiatrie (JLU Gießen), Prof. Dr. G. Neuhäuser 3.Tertial: Chirurgie (Mount Sinai Medical School, New York)
-----------------	---

Arzt im Praktikum

06/2000-11/2001	Universitätskinderklinik, Heinrich Heine Universität Düsseldorf; Prof. Dr. H-G. Lenard
-----------------	---

Wissenschaftlicher Mitarbeiter

seit 12/2001 Universitätskinderklinik, Heinrich Heine Universität Düsseldorf;
Prof. Dr. H-G. Lenard
Forschungsbereich: Infektiologie und Meningitispathogenese in
der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schroten

Dissertation

1997 – 1998 Experimentelle Doktorarbeit im Sonderforschungsbereich
„Kardiopulmonales Gefäßsystem 547“ bei Prof. Dr. W. Seeger
und Prof. Dr. Dr. F. Grimminger, Innere Medizin Gießen
Titel: „Protektiver Effekt von NO an der alveolo-epithelialen
Barriere bei oxidativem Streß“

Veröffentlichungen

2002 Frank Rose, Bernd Guthmann, Tobias Tenenbaum, Ludger Fink,
Hossein Ardeschir Ghofrani, Norbert Weissmann, Peter König,
Leander Ermert, Gabriele Dahlem, Joerg Haenze, Wolfgang
Kummer, Werner Seeger and Friedrich Grimminger „Apical, but
not basolateral, endotoxin preincubation protects alveolar
epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier
function: role of nitric oxide synthesis“. *The Journal of
Immunology* 2002, 169:1474-1481.

2002 Tobias Tenenbaum, Christof Maria Kramm, Hans-Jürgen Laws,
Wenzel Nürnberger, Hans-Gerd Lenard, Ulrich Göbel „Pre-
eruptive varicella zoster virus encephalitis in two children after
haematopoietic stem cell transplantation“. *Journal of Medical
and Pediatric Oncology*. 2002; 38:288-289

Medizinische Fortbildungen

2000 Hereditäres Angio-Ödem
Schmerztherapie in der Pädiatrie
Transplantation

2001 10. Düsseldorfer HIV-Syposium
Katheterintervention in der Kinderheilkunde
Aktuelle Aspekte der Tuberkulose in der Pädiatrie
Intensivkurs Infektiologie
Bakterielle Meningitis

Medizinische Zusatzqualifikationen

1998 Sonographie- und EKG-Kurs an der JLU Gießen

Nebentätigkeiten in der Pflege

1993-1999 in den Städtischen Kliniken Offenbach (Chirurgie), im Ketteler Krankenhaus Offenbach (Innere Medizin, HNO, Chirurgie), in der orthopädischen und der gynäkologischen Klinik (IVF-Station) der Justus-Liebig-Universität Gießen, im Hochwald Krankenhaus Bad Nauheim (Innere Medizin) sowie im Caritas Altenheim St. Elisabeth in Offenbach

Mitgliedschaften in Gremien und Organisationen des Fachbereichs Humanmedizin in Gießen

seit 1996 Mitglied der Fachschaft Humanmedizin in Gießen
4/1998-3/1999 Mitglied des Lehr- und Studienausschusses
1/1998-5/2001 Studentischer ERASMUS-Vertreter in Gießen
1998, 1999 Teilnahme an der MED-NET Konferenz in Lille und Maastricht

Sprachkenntnisse

Englisch fließend in Wort und Schrift/
Mehrere Sprachreisen und Gastfamilienaufenthalte in Großbritannien und den USA/ Medical English Kurs
Französisch Grundkenntnisse
Großes Latinum
EDV: Anwendungsorientierte Kenntnisse in Word und Excel

Weitere Aktivitäten

1988, 1989, 1990 Dreimalige Teilnahme und Erhalt des 1.Preises beim Wettbewerb „Deutschland und seine östlichen Nachbarn“ der hessischen Landeszentrale für politische Bildung
1985-1993 Aktives Mitglied im Theaterclub ELMAR/ Offenbach und im Schultheater des Leibnizgymnasiums Offenbach

10 Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. Dr. F. Grimminger und Dr. F. Rose für die Bereitstellung des Themas und für die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit in dem Laborbereich der klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“ bedanken. Ihnen ist gelungen, Rahmenbedingungen und Engagement zu schaffen, was ich als wichtigste Voraussetzung für die Produktivität dieser Arbeitsgruppe empfunden habe.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Klaus Zwick, Bernd Guthmann und Annette Tschuschner, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit eine große Hilfe waren. Des weiteren danke ich Herrn Dr. Schuldtheiß aus dem Institut für Veterinärphysiologie für die freundliche fachliche Unterstützung bei dem Aufbau der Ussing-Kammer.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für die moralische Unterstützung.

Insbesondere danke ich meiner Frau Svenja, die mich jederzeit bei meiner Arbeit unterstützt und motiviert hat. Ohne die unendliche Geduld und Bereitschaft, den hohen Arbeitsaufwand, oft spät abends, wochentags wie auch am Wochenende, zu tolerieren und zu unterstützen, wäre diese Arbeit für mich kaum möglich gewesen.