BESTIMMUNG DER ZILIÄREN FUNKTION HUMANER RESPIRATORISCHER FLIMMEREPITHELIEN UND DEREN PHARMAKOLOGISCHE STIMULIERBARKEIT ANHAND VON BRONCHIALEPITHEL-SPHEROIDEN

Ingrid Stocker

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R. M. Huber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. D. Reinhardt
	Prof. Dr. Dr. Welsch
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. F. Gamarra
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	31.10.2002

Gewidmet

meinem Mann Lothar

und unseren Kindern

Niklas

Fee✞

Delia

1. Einleitung 1

1.1. Ziliäre Funktion und ihre Bedeutung 1
1.2. Konventionelle Verwendung und Kultivierung von respiratorischem Epithel 2
1.3. Konventionelle Messung und Beurteilung der ziliären Funktion 3
1.4. Aufbau von Bronchialepithel-Spheroiden 4
1.5. Fragestellung 5

2. Material und Methodik 6

2.1 Kultivierung der Bronchialepithel-Spheroide 6
2.1.1. Probengewinnung 6
2.1.2. Kultivierung der Zellen 7
2.1.3. Entstehung von Bronchialepithel-Spheroiden in Kultur 8

2.2. Erfassung der Rotationsfrequenzen von Bronchialepithel-Spheroiden 10
2.2.1. Messung der Rotationsfrequenzen 10
2.2.2. Messapparatur zur Konstanthaltung der Temperatur 11
2.2.3. Verdunklung und UV-Lichtbestrahlung 13

2.3. Versuchsstoffe 13
2.3.1. Caged-Produkte 13
2.3.1.1. Chemischer Hintergrund und Wirkmechanismus 13
2.3.1.2. Aufbau und Wirkungsweise von Caged-Isoproterenol 14
2.3.2. Aufbau von Nitrobenzaldehyd 16
2.3.3. Aufbau von Dimethylsulfoxid 17

2.4. Messung und Auswertung 17

2.5. Versuchsdurchführung 18
2.5.1. Kontrollgruppen 19
2.5.1.1. Kontrollgruppe I: Bronchial Epithel Growth Medium und UV-Lichtbestrahlung; (n=10) 19
2.5.1.2. Kontrollgruppe II: Bronchial Epithel Growth Medium, 0,5 % Dimethylsulfoxid und UV-Lichtbestrahlung; (n=10) 20
2.5.2. Versuchsgruppen 20
2.5.2.1. Versuchsgruppe I: Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=10) 20
2.5.2.2. Versuchsgruppe II: Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=10) 21
2.5.2.3. Versuchsgruppe III: Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; (n=10) 21
2.5.2.4. Versuchsgruppe IV: Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=5) 22
2.5.2.5. Versuchsgruppe V: Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=5) 22

2.5.2.6. Versuchsgruppe VI: Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; (n=5) 23
2.5.2.7. Versuchsgruppe VII: Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=5) 23
2.5.2.8. Versuchsgruppe VIII: Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=5) 24

2.6. Statistik 25

3. Ergebnisse 26

3.1. Kontrollgruppe I: Einfluss von UV-Licht auf die Rotationsfrequenzen von Bronchialepithel-Spheroiden 26
3.2. Kontrollgruppe II: Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die Rotationsfrequenzen von Bronchialepithel-Spheroiden 28
3.3. Versuchsgruppen I bis III: Rotationsfrequenzänderungen in den Versuchsgruppen mit Caged-Isoproterenol 30
3.4. Rotationsfrequenzänderungen in den Versuchsgruppen mit photolysiertem Caged-Isoproterenol 33
3.5. Einfluss von Nitrobenzaldehyd auf die spheroidalen Rotationsfrequenzen 38

4. Diskussion 40

4.1. Diskussion der Materialien und Methoden 40
4.1.1. Spheroide 40
4.1.2. Kultivierungsmethoden 42
4.1.3. Versuchskammer 43
4.1.4. Caged-Produkte 43
4.1.5. Versuchsdurchführung 45

4.2. Vergleich mit der konventionellen Beurteilung der ziliären Funktion respiratorischer Epithelien 46

4.3. Diskussion der Ergebnisse 48
4.3.1. Ergebnisse in den Kontrollgruppen 48
4.3.1.1. Ergebnisse in Kontrollgruppe I 48
4.3.1.2. Ergebnisse in Kontrollgruppe II 49
4.3.2. Ergebnisse der Versuchsgruppen mit Caged-Isoproterenol 49
4.3.3. Ergebnisse der Versuchsgruppen mit photolysiertem Caged-Isoproterenol 51
4.3.4. Ergebnisse der Versuchsgruppen mit Nitrobenzaldehyd 52

5. Zusammenfassung und Ausblick 54

6. Verwendete Abkürzungen 57

7. Literaturverzeichnis 58

8. Danksagung 65

9. Lebenslauf 66

1. Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit war es, am Modell humaner Bronchialepithel-Spheroide zu zeigen, dass die ziliäre Funktion respiratorischer Epithelien pharmakologisch beeinflusst werden kann. Das Erfassen und Auswerten der Rotationsfrequenzen von Spheroiden könnte eine einfache, schnelle und den Patienten wenig belastende Methode zur Charakterisierung der mukoziliären Funktion darstellen.
Das vorliegende Kapitel gibt zunächst einen Überblick über die ziliäre Funktion, ihre Bedeutung, und die herkömmliche Methode ihrer Beurteilung. Danach wird das Modell der Spheroide vorgestellt, bevor anschließend die zugrunde liegende Idee für die Durchführung der Versuche detailliert beschrieben wird.

1.1. Ziliäre Funktion und ihre Bedeutung

Der gesamte Tracheobronchialbaum wird bis in die bronchioli terminalis durch zilientragendes Epithel ausgekleidet. Dieses respiratorische Flimmerepithel hat die Aufgabe Schleim und Partikel durch koordinierten, in Richtung Pharynx weisenden Zilienschlag aus den Atemwegen heraus zu befördern. Ein intaktes mukoziliäres System ist die Grundvoraussetzung für den Abtransport von inhalierten Fremdstoffen und Detritus und stellt somit den wichtigsten Mechanismus zur Protektion der Atemwege dar. Die Zilien befördern mit einer Schlagfrequenz von 10 bis 15 pro Sekunde Fremdstoffe kehlkopfwärts, wobei eine besondere Bedeutung dem in eine bestimmte Richtung weisenden Zilienschlag und einer ausreichenden Zahl an Zilien zukommt [3, 11, 16, 25].
Die ziliäre Schlagfrequenz unterliegt einer circadianen Rhythmik und kann durch inhalative Noxen, wie NO_2, Zigarettenrauch und Allergene vermindert oder durch Substanzen wie Ethanol zum Stillstand gebracht werden [8, 11, 15, 20, 27, 39, 40, 46, 47, 54, 56].
Andererseits kann die Schlagfrequenz der Zilien durch Gabe von Nikotin als Monosubstanz und Sympathomimetika wie Isoproterenol und insbesondere durch β_2-wirksame Substanzen

wie Salbutamol oder Salmeterol durch einen Anstieg des intrazellulären Adenosinmonophosphat (AMP) gesteigert werden [6, 10, 13, 31, 48, 55, 57]. Eine besondere Bedeutung kommt auch der Zusammensetzung des Mukus zu: Je nach Menge und Viskosität des Schleimes kann die mukoziliäre Funktion positiv oder negativ beeinflusst werden [18, 31, 32, 43]. Diese Faktoren stellen ein sich stetig an mehreren Stellen beeinflussendes System zur Reinigung des Respirationstraktes dar. Sie sind unabdingbar zur Aufrechterhaltung des Abwehrmechanismus der oberen und unteren Atemwege. Die ziliäre Schlagfrequenz wird nach heutigem Stand als wichtigste Determinante der mukoziliären Reinigung angesehen [27].

1.2. Konventionelle Verwendung und Kultivierung von respiratorischem Epithel

Es gibt verschiedene In-vitro-Verfahren zur Kultivierung respiratorischer Epithelien. Diese Kultivierungssysteme sind meistens mit spezifischen Veränderungen des respiratorischen Epithels verbunden. Zellsuspension- und Monolayerkulturen verlieren ihre in-vivo vorhandene Differenzierung, wenn die Zellen aus ihrem Verband, bestehend aus Basalmembran, Becherzellen und ziliertem Flimmerepithel, gelöst werden [21, 22, 24, 44].
Bronchialepithel-Spheroide sind Konglomerate aus Bronchialepithelstreifen, bestehend aus einer zilientragenden Oberfläche und einem mit Flüssigkeit gefüllten zystischen Hohlraum. Ihre Entstehung und die Methode ihrer Kultivierung werden zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit vorgestellt.

1.3. Konventionelle Messung und Beurteilung der ziliären Funktion

Es gibt mehrere konventionelle Methoden zur Erfassung der ziliären Funktion. Nachfolgend werden die gängigsten drei Methoden vorgestellt.

Photoverstärkermethode:
Hierbei wird die ziliäre Schlagfrequenz der entnommenen Proben mittels eines Photoverstärkers gemessen. Zellen respiratorischen Epithels werden in Nährlösung gegeben, mit dem jeweilig zu testenden Stoff in Kontakt gebracht und anschließend beobachtet. Durch das Beobachtungsmikroskop strahlt eine Lichtquelle. Der Zilienschlag einzelner fokussierter Zilien verursacht eine Unterbrechung des Lichtstrahls. Diese Unterbrechung wird via Photoverstärker registriert und an ein Oszilloskop weitergeleitet. Mittels Fourier-Transformation wird daraus die ziliäre Schlagfrequenz optisch dargestellt und kann somit gemessen werden [55].

Direkte Beobachtung mittels Videoaufzeichnung:
Die ziliäre Aktivität wird direkt über ein an eine Videokamera angeschlossenes Interferenzmikroskop beobachtet und aufgezeichnet. Im Anschluss an die Videoaufzeich-nungen kann dann die ziliäre Tätigkeit eines so dokumentierten Zellverbandes ausgewertet werden [27].

In-vivo-Beobachtungen des nasalen Flimmerepithels: Mittels einer Haltevorrichtung wird der Kopf eines sitzenden Probanden, dem eine Nasensonde eingeführt wird, fixiert. Die Sonde enthält eine Lichtquelle und einen Spiegel zur Reflexion der auf die Mukosa auftreffenden Strahlen. Über eine Linse werden die zurückgesendeten Strahlen mittels Photoverstärker aufgezeichnet [29].

1.4. Aufbau von Bronchialepithel-Spheroiden

Corssen et al. haben als erste im Jahr 1958 humane Bronchialepithel-Spheroide beschrieben. Proben humanen Bronchialepithels wurden für zwei bis fünf Tage auf Kulturmedium gezüchtet und danach in Perfusionskammern überführt [7]. Innerhalb dieser Zeit entstanden kugelförmige Gebilde einer durchschnittlichen Größe von 500 µm, die an ihrer Oberfläche respiratorisches Flimmerepithel tragen. Diese so genannten Spheroide rotieren um ihre eigene Achse. Die Rotationsbewegung ist auf Grund des asymmetrischen Aufbaus der Spheroide gut mit einfachsten Mitteln, also rein mikroskopisch, zu beobachten. In einer Perfusionskammer führten Corssen et al. 1958 und 1960 erste Versuche mit diesem Modell zur Toxizität von Anästhetika durch [7, 8]. Hierbei handelte es sich nicht um eine direkte Messung der ziliären Tätigkeit sondern um eine indirekte Messung der ziliären Aktivität, da anhand der spheroidalen Rotationsfrequenzen Rückschlüsse auf die ziliäre Funktion gezogen wurden. Je nach verwendeter Substanz (Tetracain, Dibucain, Kokain), zeigten sich konzentrationsabhängige Veränderungen der Rotationsfrequenzen. Zu einer Abnahme der Rotationsfrequenzen kam es bei Tetracain und Dibucain, Kokain bewirkte eine Steigerung der Rotationsfrequenzen; bei einem Kokaingehalt der Lösung von mehr als 10% kam es jedoch zu einem irreversiblen Stillstand der Spheroide [8].

Gamarra und Grundler konnten zum einen zeigen, dass die Rotationsfrequenzen humaner Bronchialepithel-Spheroide unter konstanten Versuchsbedingungen auch über einen längeren Zeitraum (mindestens 300 min) konstant sind, zum anderen konnten sie nachweisen, dass das Rotationsverhalten von Bronchialepithel-Spheroiden temperaturabhängig ist [12].

Diese und weitere Versuche anderer Arbeitsgruppen legen nahe, dass humane Bronchialepithel-Spheroide ein einfach zu kultivierendes Modell zur Beurteilung der ziliären Funktion darstellen könnte.

1.5. Fragestellung

Zielsetzung dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Rotationsfrequenzen humaner Bronchialepithel-Spheroide pharmakologisch beeinflusst werden können. Die Untersuchung erfolgte vor dem Hintergrund der Etablierung des Spheroide-Modells in der medizinischen Diagnostik.

Analog der pharmakologischen Eigenschaften von herkömmlichen Proben respiratorischen Epithels wurde die Aufgabenstellung spezifiziert:

Führt die Zugabe eines Sympathomimetikums zu einer Steigerung der Rotationsfrequenzen humaner Bronchialepithel-Spheroide?

Die zweite daran anschließende Frage lautete:

Ist hinsichtlich der zu erwartenden Rotationsfrequenzsteigerung eine Konzentrationsabhängigkeit nachweisbar?

2. Material und Methodik

2.1. Kultivierung der Bronchialepithel-Spheroide

2.1.1. Probengewinnung

Die Gewinnung der Gewebeproben war ebenso wie die Durchführung der Versuche durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU-München genehmigt und erfolgte mit Einverständnis der Patienten.

Patienten, die sich aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen einer Bronchoskopie unterziehen mussten, wurde bei dem Eingriff eine zusätzliche Gewebeprobe in Form eines Abstrichs aus einem Hauptbronchus entnommen. Mit einer herkömmlichen Bronchoskopiebürste wurde oberflächliches bronchorespiratorisches Flimmerepithel abgestrichen und in ein mit Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM, Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) gefülltes Gefäß in das Labor zur Kultivierung gebracht. Zwischen Probenentnahme und Kultivierung derselben lagen in der Regel 60 bis 120 Minuten, jedoch nie mehr als vier Stunden.

Indikationen für die Bronchoskopien waren:

- Maligne Erkrankungen oder Verdacht auf maligne Erkrankungen:
  Kleinzelliges- und Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, unklare Raumforderung im Bereich der Lunge, Tonsillenkarzinom, Larynx-Karzinom, Lymphome, Mundboden-karzinom, metastasierendes Colonkarzinom, metastasierendes Mammakarzinom, metasta-sierendes Leiomyosarkom
- Kontollbronchoskopie bei Zustand nach entzündlichen Erkrankungen:
  chronische Bronchitis, Zustand nach Lungenabszess, Zustand nach bakterieller oder mykotischer Pneumonie, Verdacht auf Lungentuberkulose (TBC)
- Autoimmune Erkrankungen:
  Wegener-Granulomatose, Sarkoidose

Die Probenentnahme bei Tumorpatienten erfolgte aus makroskopisch nicht malignitäts-verdächtigen Arealen.
Proben von Patienten mit akuter pulmonaler Infektion oder bekannter HIV-Infektion wurden nicht in die Kultivierung eingebracht.

2.1.2. Kultivierung der Zellen

Bronchoskopisch gewonnene Bürstenabstriche der Trachea, bestehend aus Schleim, einzelnen Bronchialepithelien und Bronchialepithelstreifen, wurden nach zweimaligem Waschen mit BEGM (Bronchial Epithelial Cell Growth Medium, Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) auf agarbeschichtete (Agar Noble, DIFCO-Laboratorien, Detroit, USA) 24-Loch-Multiwellplatten (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) überführt. Die Anzucht der gewonnenen Zellen wurde auf agarbeschichteten Kulturplatten durchgeführt, um eine Adhärenz der Kulturzellen am Boden der Multiwellplatten zu verhindern.
Der Kulturagar enthielt Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Schottland) mit 10 % neugeborenem Kälberserum (NCS, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Schottland) sowie Streptomycin (Penstrep1,8 µl/ml, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Schottland), Amphoterecin B (Fungizone, 3,6 µl/ml, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Schottland) und nichtessentielle Aminosäuren (1,1 µl/ml, Gibco-Life-Technologies LTD, Paisley, Schottland). Zusätzlich wurde den Bürstenabstrichen 200 µl BEGM zugegeben, sodass das gewonnene Material in flüssiger Lösung auf dem Nähragar schwamm.
Anschließend wurden die Proben bei 37° C mit 5 % CO_2 und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Typ B 5060 EC/CO_2, Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert. Innerhalb weniger Stunden ballten sich erste Spheroide zusammen und rotierten auf dem sie umgebenden Schleim. Wie sich in den Versuchsreihen von Gamarra und Grundler zeigte, ist die Bildung der Spheroide nach etwa 48 Stunden abgeschlossen. Nach dieser Zeitspanne ist nicht mehr mit einem weiteren Anstieg der Anzahl der Spheroide zu rechnen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich auf jedem Loch der Multiwellplatten bei guter Abstrichqualität etwa zehn bis zwanzig Spheroide.

Die Proben wurden täglich phasenkontrast-mikroskopisch beurteilt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl von Spheroiden und Mukus gerichtet sowie auf die Freiheit von bakteriellen Verunreinigungen und einen ausreichenden Flüssigkeitsspiegel auf dem Nähragar. Jeden zweiten Tag wurde das Nährmedium durch 200 µl frisches BEGM ersetzt. Die agarbeschichteten Multiwell-platten wurden einmal wöchentlich gewechselt. Humane Bronchialepithel-Spheroide konnten auf diese Art und Weise mindestens 28 Tagen kultiviert werden [5].

2.1.3. Entstehung von Bronchialepithel-Spheroiden in Kultur

Abstriche, die aus Bronchien von Probanden entnommen wurden, bestehen aus einzelnen Bronchialepithelzellen, Bronchialepithelstreifen und Schleim. In einem mehrstündigen Zeitraum bilden sich zusammenhängende Strukturen, es kommt zur Bildung humaner Bronchialepithel-Spheroide (siehe Abbildung 1 und 2).

Im Jahr 1958 wurden Bronchialepithel-Spheroide erstmals von Corssen et al. beschrieben [7]. Humane Bronchialepithel-Spheroide sind kugel- oder keulenförmige Gebilde, welche auf dem sie umgebenden Schleim um ihre eigene Achse rotieren. Rotationsbewegungen entstehen, da sich die zilientragende Seite des gewonnenen respiratorischen Epithels nach außen kehrt und die Oberfläche bildet, während im Inneren ein zystischer flüssigkeitsgefüllter Hohlraum entsteht. Bridges et al. punktierten diesen Hohlraum, wodurch es zu einem Kollaps der kugelförmigen spheroidalen Gebilde kam [5].

Aufgrund des von Natur aus koordinierten Zilienschlages rotieren die Spheroide auf dem sie umgebenden Schleim um ihre eigene Achse. [5, 7, 8, 12, 25, 41].

Humane Bronchialepithel-Spheroide reagieren im Verlauf der Kultivierung nicht mit einer Abnahme ihrer Zilienzahl, im Gegensatz zu respiratorischem Gewebe in konventionellen Monolayer-Kulturen, deren Zilienzahl im Laufe der Inkubation stark abnimmt [22, 41, 44].

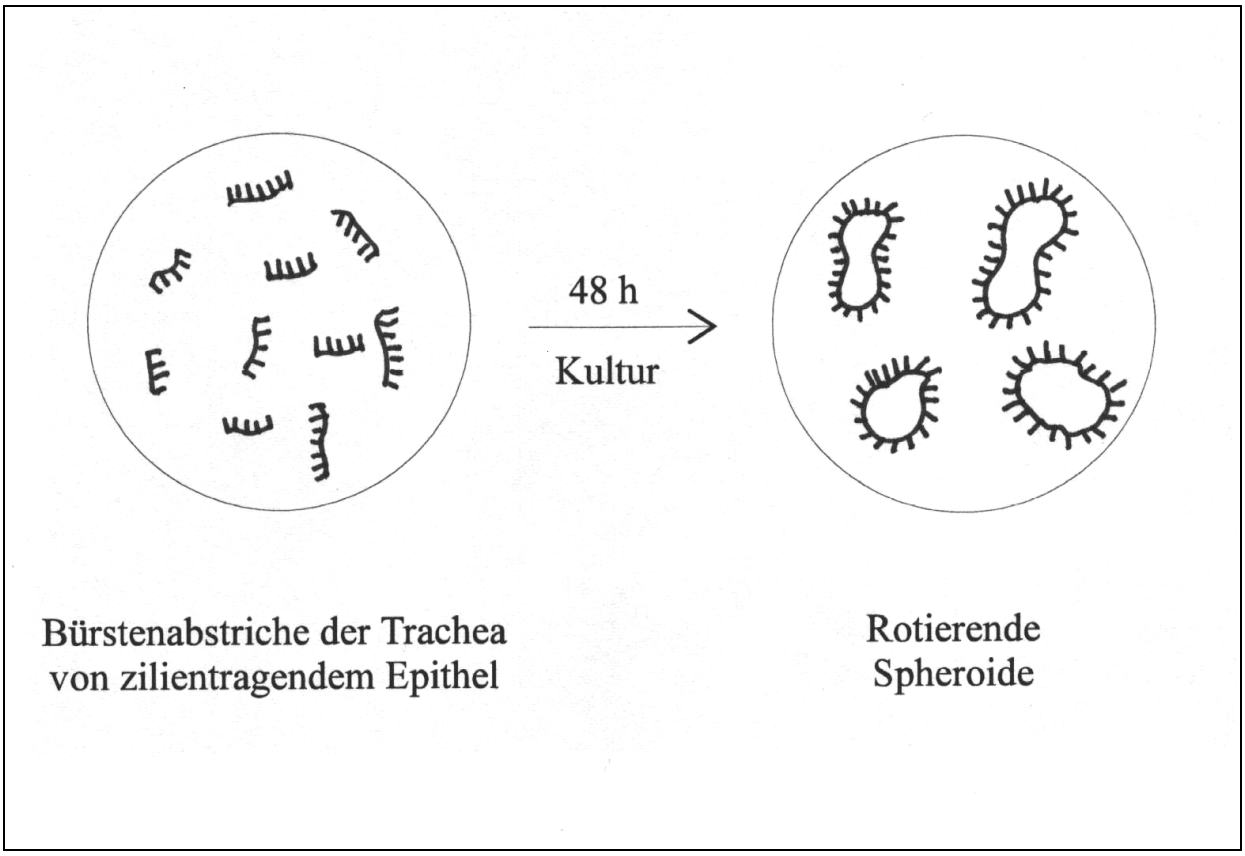


Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung der Kultivierung und Bildung von humanen Bonchialepithel-Spheroiden innerhalb eines Zeitraums von zwei Tagen.

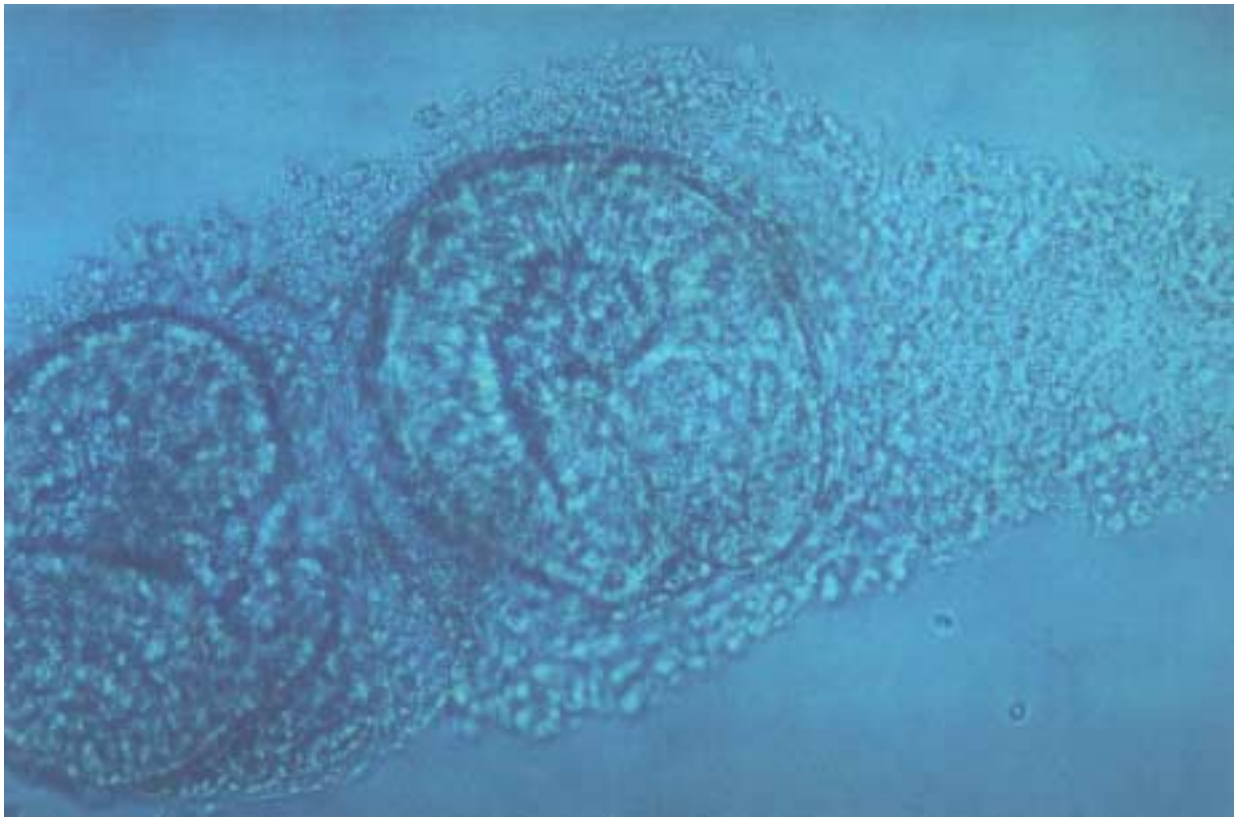


Abbildung 2 zeigt ein in Nährmedium rotierendes Spheroid im Phasenkontrastmikroskop bei ca. 750-facher Vergrößerung.

2.2. Erfassung der Rotationsfrequenzen von Bronchialepithel-Spheroiden

2.2.1. Messung der Rotationsfrequenzen

Die Messung der Umlauffrequenzen humaner Bronchialepithel-Spheroide kann jederzeit ohne großen technischen Aufwand erfolgen. Jedes Spheroid besitzt eine individuelle nichtsymmetrische Form, die es ermöglicht, den Beginn und das Ende einer einzigen Umdrehung unter dem Mikroskop zu beobachten.

Die Messung erfolgt, indem ein geeignetes Spheroid unter einem Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 35, Fa. Zeiss, Deutschland) beobachtet und die Zeit gestoppt wird, die es für eine definierte Anzahl an Umdrehungen (15 U) benötigt [8, 12].

Aus der Anzahl der Umdrehungen (U) und der dafür benötigten Zeit (t), welche im Sekundenbereich liegt, lässt sich die Rotationsfrequenz (R) berechnen:

$$R = U : t$$

2.2.2. Messapparatur zur Konstanthaltung der Temperatur

Eine doppelwandige Metallkammer, in deren Mitte sich die eigentliche Versuchskammer befindet, war mittels einer Schlauchverbindung an ein Wärmebad angeschlossen, welches etwa 30 Minuten vor Versuchsbeginn temperiert wurde (siehe Abbildung 3). Mit ihrem gläsernen Boden wurde die Metallkammer auf ein Phasenkontrastmikroskop gestellt, wobei die Lichtquelle des Mikroskops mit einem UV-Filter (Fa. Schott, Deutschland) abgedeckt wurde.
Eine Pumpe transportierte erwärmtes Wasser durch die Versuchskammer, sodass die Temperatur innerhalb der Kammer zwischen 36^0 C und 37^0 C lag. Durch ein permanent installiertes Temperaturmessgerät wurden diese Werte ständig überwacht. Kam es zu Temperaturschwankungen von mehr als $0{,}5^0$ C, wurde die Durchlaufgeschwindigkeit des erwärmten Wassers im Schlauchsystem verändert und somit der Temperaturwert wieder auf einen Wert zwischen 36^0 C und 37^0 C zurückgeregelt.

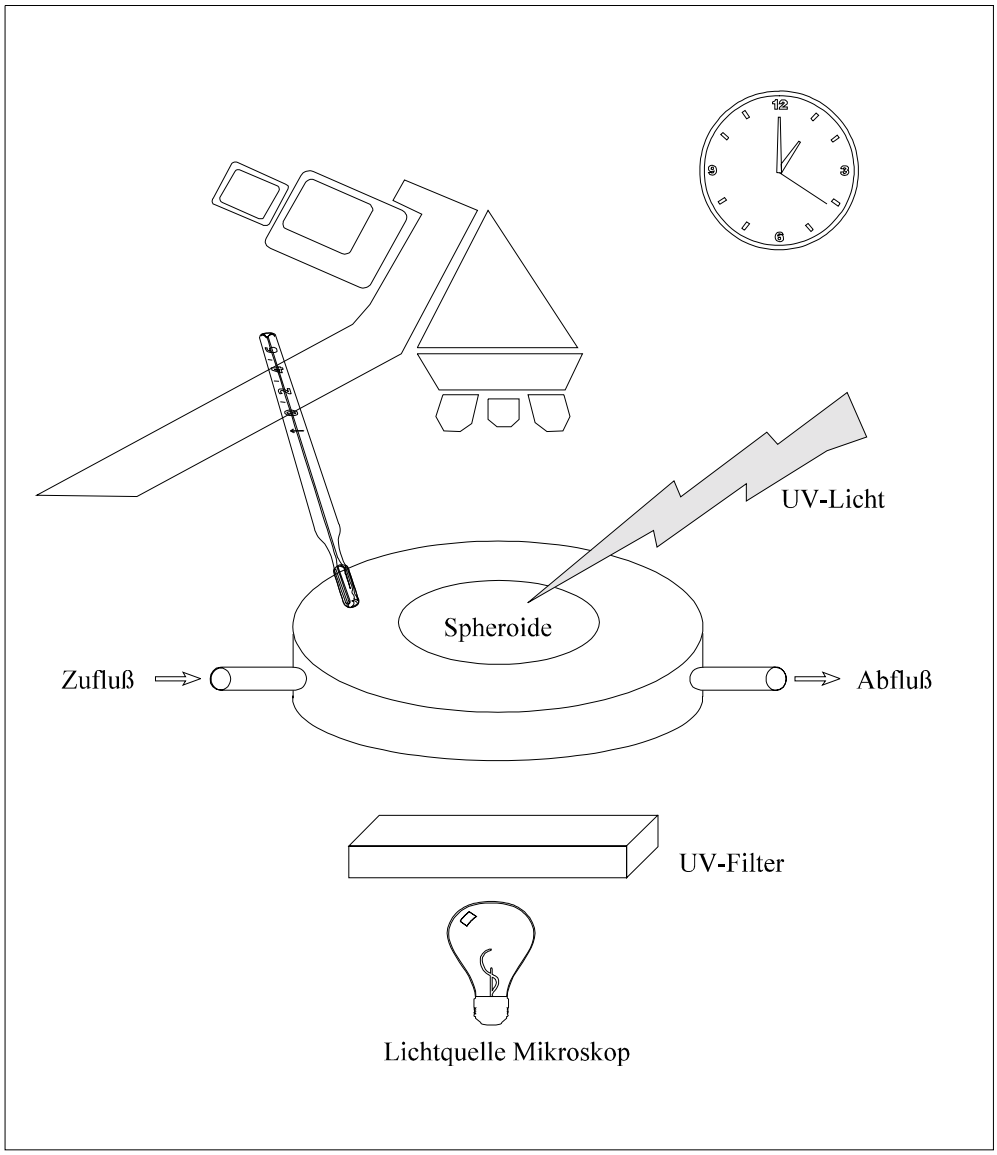


Abbildung 3 zeigt den Versuchsaufbau zur Messung der spheroidalen Umlauffrequenz. Spheroide wurden zusammen mit dem sie umgebenden Schleim in eine temperatur- und feuchtigkeitsregulierte Kammer überführt und unter einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet.

2.2.3. Verdunklung und UV-Lichtbestrahlung

Der Versuchsaufbau befand sich in einem abgedunkelten Raum, der nur durch eine herkömmliche Infrarotlampe beleuchtet wurde. Diese Vorsichtsmaßnahme diente dazu, eine vorzeitige Aktivierung der zu untersuchenden Stoffe zu vermeiden. Schräg über der Versuchskammer wurde eine UV-Lampe (UV-6 SL, Herolab GmbH, Wiesloch, Deutschland) der Wellenlänge $\lambda \approx 340$ nm angebracht, die bei Bedarf aktiviert werden konnte.

2.3. Versuchsstoffe

2.3.1. Caged-Produkte

Hierbei handelt es sich um Moleküle, deren chemische Wirksamkeit im Grundzustand durch kovalente Bindung von Seitengruppen blockiert ist. UV-Lichtbestrahlung induziert durch eine photochemische Reaktion die Abspaltung der angehängten Seitengruppen, also die Umwandlung der Substanz in einen chemisch wirksamen Zustand.

2.3.1.1. Chemischer Hintergrund und Wirkmechanismus

Caged-Produkte sind veränderte Biomoleküle: Durch kovalente Bindung einer Caging-Gruppe, häufig einer Nitrobenzylgruppe, an das Biomolekül wird dessen chemische Wirksamkeit blockiert. Die Caging-Gruppe kann durch UV-Lichtbestrahlung abgespalten werden und gibt somit das chemisch aktive Biomolekül frei [1, 4, 36, 38].

Anforderungen an Caging-Gruppen:

- sie sollen das jeweilige Biomolekül nicht verändern
- sie sollen das Biomolekül bei der Abspaltung rasch freigeben

- die Caging-Gruppe soll chemisch inert sein, das heißt, sie soll weder mit dem Biomolekül noch mit dem zu untersuchenden System nach der Photolyse in Verbindung treten oder dort Veränderungen hervorrufen
- die Wellenlänge (λ) für eine Photolyse muss größer als 300 nm sein, da ansonsten Schäden an Aminosäuren drohen

2.3.1.2. Aufbau und Wirkungsweise von Caged-Isoproterenol

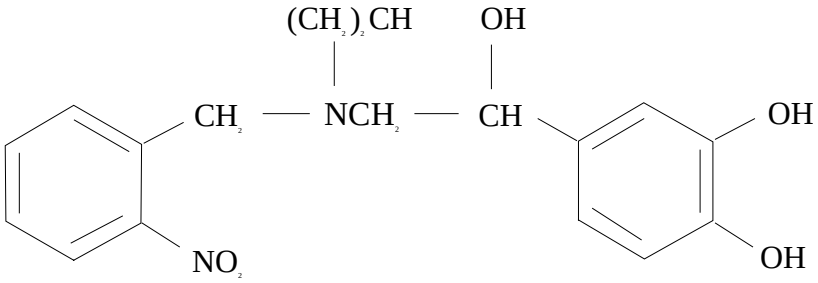


Abbildung 4 zeigt die Strukturformel von Caged-Isoproterenol [36]

N-(2-nitrobenzyl)-L-Isoproterenol (Mo Bi Tec, Göttingen Deutschland) hat die chemische Formel C_{18} H_{21} N_2 O_5 (siehe Abbildung 4), ist in Dimethylsulfoxidlösung (DMSO, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) löslich und kann nach diesem Vorgang in wässrigen Lösungen weiter verdünnt werden. Die Arbeitslösung sollte nach Herstellerinformationen weniger als 1 % DMSO enthalten, da ab dieser Konzentration mit zytotoxischen Effekten zu rechnen ist.
An den Wirkstoff Isoproterenol werden 2-Nitrobenzylgruppen durch kovalente Bindung angehängt und bei Bedarf durch UV-Lichtbestrahlung ($\lambda \approx 340$ nm) abgespalten. Hierbei entstehen das Abspaltungsprodukt 2-Nitrosobenzaldehyd und die Substanz Isoproterenol in ihrer wirksamen Form (siehe Abbildung 5) [37].

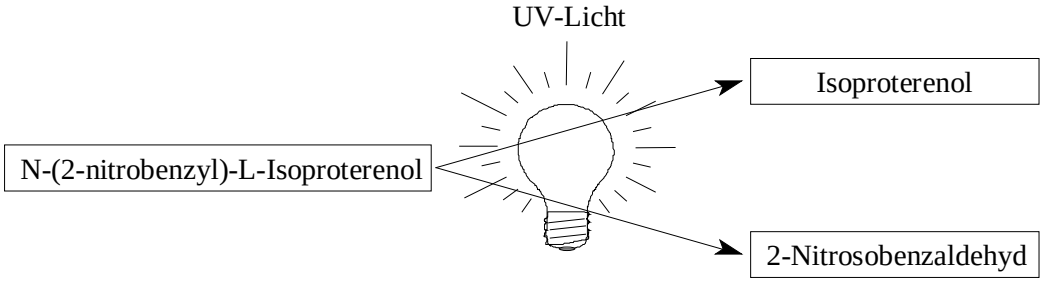


Abbildung 5 zeigt schematisch die Photolyse des Caged-Isoproternol. Das inaktive Caged-Isoproterenol wird der Versuchslösung zugesetzt. Durch UV-Lichtbestrahlung kann das Isoproterenol zu einem beliebigen Zeitpunkt ohne mechanische Einwirkung bei der Applikation freigesetzt werden. Als Nebenprodukt bei der Photolyse entsteht 2-Nitrosobenzaldehyd.

Caged-Isoproterenol ermöglicht es, von ein und derselben Probe einen Ausgangswert ohne β-sympathomimetische Wirkung zu erhalten, und daran anschließend zu einem genau definierten Zeitpunkt die Freisetzung von Isoproterenol auszulösen und die Aktivitätsänderung der Probe zu beobachten.

Isoproterenol hat die Summenformel $C_{11}\ H_{17}\ N\ O_3$ und entspricht dem β-Rezeptor-Agonisten Isoprenalin. Es ist dem Noradrenalin verwandt und ein direktes, nicht selektives Sympathomimetikum (siehe Abbildung 6).

Isoproterenol besitzt geringe α-sympathomimetische und starke β-sympathomimetische Wirkung. Die Affinität zu β_1- und β_2-Rezeptoren ist gleich groß. Isoproterenol führt auf Grund seiner β_2-agonistischen Wirkung zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur der Bronchien, des Uterus und der Arteriolen, während seine β_1-agonistische Wirkung zu kardiogenen Effekten wie positiver Chronotropie, positiver Ionotropie und positiver Dromotropie führt [53]. Die Substanz Isoproterenol ist in flüssigen Lösungen einer langsamen Zersetzung unterworfen, sodass Versuche möglichst rasch nach Herstellung der Lösung stattfinden sollten.

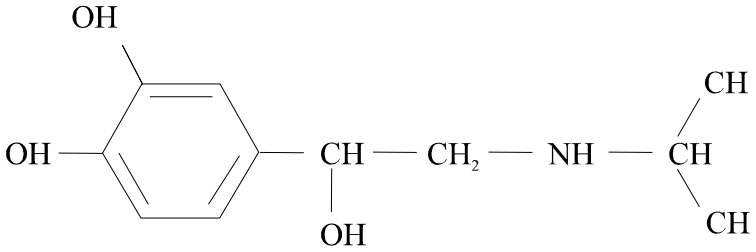


Abbildung 6 zeigt die Strukturformel von Isoproterenol [52].

Das in dieser Arbeit zur Anwendung gelangte Caged-Isoproterenol war das einzig derzeitig verfügbare Caged-Produkt mit β_2-sympathomimetischer Wirkung.

2.3.2. Aufbau von Nitrobenzaldeyhd

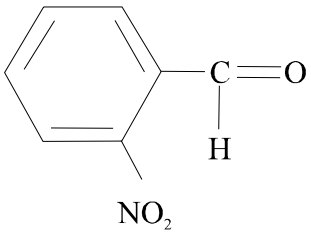


Abbildung 7 zeigt die Strukturformel von Nitrobenzaldehyd [51].

Die Summenformel von Nitrobenzaldehyd lautet: $C_7 H_5 N O_3$ (siehe Abbildung 7).
Nitrobenzaldeyhd wurde für diese Versuchsreihe gewählt, da es zu dem Abspaltungsprodukt 2-Nitrosobenzaldehyd aus der Versuchsreihe mit Caged-Isoproterenol eine starke chemische Affinität aufweist, nicht flüchtig ist und im Gegensatz zu 2-Nitrosobenz-aldehyd als isoliertes Produkt zur Verfügung steht. Laut toxikologischen Angaben handelt es sich bei Nitrobenzaldehyd um eine gesundheitsschädigende Substanz, die bei Berührung, Ingestion oder bei Einatmung irreversible Schäden an einzelnen Organsystemen wie Haut, Auge oder Bronchialsystem verursachen kann [33, 45, 51].

2.3.3. Aufbau von Dimethylsulfoxid

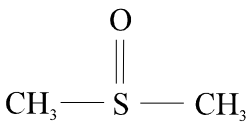


Abbildung 8 zeigt die Strukturformel von Dimethylsulfoxid [50].

Dimethylsulfoxid (DMSO) hat die Summenformel $C_2 H_6 S O$ (siehe Abbildung 8). Es ist ein Lösungsmittel, das zur Kryokonservierung von Zelllinien und zur Lösung von lipophilen Substanzen verwendet wird. Im klinischen Gebrauch fand es Anwendung als Mukolytikum, da es die Viskosität des im Tracheobronchialbaum befindlichen Mukus herabsetzt [58]. Es handelt sich um eine potenziell toxische Stoffverbindung. DMSO kann bei längerer Inkubation von vitalem Gewebe in mehr als 1 % DMSO-haltigen Arbeitslösungen eine Zellmembranschädigung hervorrufen. Bei Haut- und Schleimhautkontakten kann es zu allergischen und pseudoallergischen Reaktionen kommen [50].

2.4. Messung und Auswertung

Da Bronchialepithel-Spheroide auf jegliche Art von mechanischer oder thermischer Manipulation mit einer Veränderung ihrer Rotationsfrequenz reagieren, wurde die Versuchsapparatur in einem verdunkelten Raum unter einer Abzugshaube auf einem erschütterungsfreien Tisch installiert. Etwa 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Wasserbad auf die erforderliche Temperatur von 36^0 C bis 37^0 C erwärmt. Anschließend wurde im gleichen, nur durch Infrarot-Licht beleuchteten Raum aus einer Stammlösung die gerade benötigte Konzentration des Wirkstoffs hergestellt. 200 µl des Wirkstoffs wurden in die Versuchskammer eingebracht. Fünf bis zehn Spheroide wurden von ihren Agarplatten vorsichtig abpipettiert und in die Versuchs-

kammer überführt. Nach einer Adaptationszeit von etwa fünf Minuten wurde ein geeignetes, das heißt ein deutlich asymmetrisches, gut zu beobachtendes Spheroid ausgewählt. Im Anschluss daran wurde die erste Messung, die so genannte Ausgangswertbestimmung vorgenommen. Es wurden 15 spheroidale Umdrehungen beobachtet und die dazu benötigte Zeit gemessen. Nach erfolgter Ausgangswertbestimmung wurde die UV-Lampe aktiviert, welche den gesamten Inhalt der Kammer bestrahlte.

In zweiminütigen Abständen wurden nun über einen Zeitraum von insgesamt 18 Minuten an dem ausgewählten Spheroid Messungen vorgenommen.

Die Spheroide wurden jeweils nur für einen einzigen Versuch verwendet.

Für jeden Versuch wurden die Inkubationslösungen frisch aus der tiefgefrorenen Stammlösung hergestellt, da laut Herstellerangaben eine chemische Instabilität bei längerer Lagerung der Versuchslösung nicht ausgeschlossen werden kann [37].

2.5. Versuchsdurchführung

Nach einer durchschnittlichen Kultivierungszeit von sieben Tagen wurden die Spheroide den Versuchen zugeführt. Als Auswahlkriterium wurde gefordert, dass die jeweilige Probe mindestens zehn auf ausreichend Mukus rotierende Spheroide enthielt. Die Beurteilung der Proben erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop.

Die Experimente erfolgten in den vier Abschnitten A bis D, entsprechend den jeweils zur Anwendung gelangten Wirkstoffen:

A: Kontrollgruppen

Kontrollgruppe I (BEGM und UV-Lichtbestrahlung; Anzahl der Versuche n=10)

Kontrollgruppe II (BEGM, DMSO und UV-Lichtbestrahlung; n=10)

B: Versuchsgruppen mit Caged-Isoproterenol

Versuchsgruppe I (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; n=10)

Versuchsgruppe II (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; n=10)

Versuchsgruppe III (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; n=10)

C: Versuchsgruppen mit photolysiertem Caged-Isoproterenol

Versuchsgruppe IV (photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; n=5)

Versuchsgruppe V (photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; n=5)

Versuchsgruppe VI (photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; n=5)

D: Versuchsgruppen mit Nitrobenzaldehyd

Versuchsgruppe VII (Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-3} mol/l; n=5)

Versuchsgruppe VIII (Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-4} mol/l; n=5)

Die Zuordnung des jeweiligen Wirkstoffes erfolgte in jedem der vier Versuchsabschnitte durch randomisierte Auswahl. Die zur Anwendung gebrachte Stoffkonzentration wurde durch Losverfahren zugewiesen. Die Auslosungen wurden durch eine an den Experimenten nicht beteiligte Person vorgenommen.

2.5.1. Kontrollgruppen

2.5.1.1. Kontrollgruppe I: Bronchial Epithel Growth Medium und UV-Lichtbestrahlung (n=10)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Zugabe von 200 µl BEGM ohne weitere Zusätze in die Versuchskammer
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer mit oben genannter Lösung
- Einhaltung einer Adaptationszeit von fünf Minuten
- Messung des Ausgangswertes für die Rotationsfrequenzen
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.1.2. Kontrollgruppe II: Bronchial Epithel Growth Medium, 0,5 % Dimethylsulfoxid und UV-Lichtbestrahlung (n=10)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Ansetzung einer Lösung aus BEGM und 0,5 % DMSO
- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Einhaltung einer Adaptationszeit von fünf Minuten
- Messung des Ausgangswertes für die Rotationsfrequenzen
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2. Versuchsgruppen

2.5.2.1. Versuchsgruppe I: Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=10)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Ansetzen einer Stammlösung der Konzentration von 10^{-2} mol/l des Caged-Isoproterenol in BEGM; Lösung der Trockensubstanz des Caged-Isoproterenols in DMSO (0,5 % DMSO-Gehalt der Stammlösung)
- Verdünnung der Stammlösung des Caged-Isoproterenols auf 10^{-3} mol/l
- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Einhaltung einer Adaptationszeit von fünf Minuten
- Messung des Ausgangswertes für die Rotationsfrequenzen
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden

- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2.2. Versuchsgruppe II: Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=10)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Verdünnung der unter 2.5.2.1. beschriebenen Stammlösung des Caged-Isoproterenols auf 10^{-4} mol/l
- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Einhaltung einer Adaptationszeit von fünf Minuten
- Messung des Ausgangswertes für die Rotationsfrequenzen
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2.3. Versuchsgruppe III: Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; (n=10)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Verdünnung der unter 2.5.2.1. beschriebenen Stammlösung des Caged-Isoproterenols auf 10^{-5} mol/l
- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Einhaltung einer Adaptationszeit von fünf Minuten
- Messung des Ausgangswertes für die Rotationsfrequenzen
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden

- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2.4. Versuchsgruppe IV: Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=5)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Verdünnung der unter 2.5.2.1. beschriebenen Stammlösung des Caged-Isoproterenols auf 10^{-3} mol/l
- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Messung der Rotationsfrequenzen der Spheroide ohne Adaptationszeit und ohne vorherige Ausgangswertbestimmung, da der aktive Stoff nach UV-Lichtbestrahlung schon in der Versuchskammer freigesetzt war.
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2.5. Versuchsgruppe V: Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=5)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Verdünnung der unter 2.5.2.1. beschriebenen Stammlösung des Caged-Isoproternol auf 10^{-4} mol/l
- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer

- Messung der Rotationsfrequenzen der Spheroide ohne Adaptationszeit und ohne vorherige Ausgangswertbestimmung, da der aktive Stoff nach UV-Lichtbestrahlung schon in der Versuchskammer freigesetzt war
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2.6. Versuchsgruppe VI: Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; (n=5)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Verdünnung der unter 2.5.2.1. beschriebenen Stammlösung des Caged-Isoproterenols auf 10^{-5} mol/l
- Zugabe von 200 µl dieser Versuchslösung in die Versuchskammer
- UV-Lichtbestrahlung der Versuchskammer für 15 Sekunden
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Messung der Rotationsfrequenzen der Spheroide ohne Adaptationszeit und ohne vorherige Ausgangswertbestimmung, da der aktive Stoff nach UV-Lichtbestrahlung schon in der Versuchskammer freigesetzt war
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2.7. Versuchsgruppe VII: Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=5)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Ansetzen einer Stammlösung der Konzentration 10^{-2} mol/l des Nitrobenzaldehyd in BEGM; Lösung der Trockensubstanz des Nitrobenzaldehyd in DMSO (0,5 % DMSO-Gehalt der Stammlösung)
- Verdünnung der Stammlösung des Nitrobenzaldehyd auf 10^{-3} mol/l

- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Messung der Rotationsfrequenzen der Spheroide ohne Adaptationszeit und ohne vorherige Ausgangswertbestimmung, da der aktive Stoff schon in der Versuchskammer vorhanden war
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.5.2.8. Versuchsgruppe VIII: Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=5)

Ansatz der Versuchslösung und Versuchsablauf:

- Verdünnung der unter 2.5.2.7. beschriebenen Stammlösung des Nitrobenzaldehyd auf 10^{-4} mol/l
- Zugabe von 200 µl dieser Lösung in die Versuchskammer
- Einbringen der Spheroide in die Versuchskammer
- Messung der Rotationsfrequenzen der Spheroide ohne Adaptationszeit und ohne vorherige Ausgangswertbestimmung, da der aktive Stoff schon in der Versuchskammer vorhanden war
- Messung der Rotationsfrequenzen in Abständen von zwei Minuten über einen Zeitraum von 18 Minuten

2.6. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels „Sigma Stat for Windows, Version 2.03, Copyright 1992-1997, SPSS Inc (USA).

Für multiple Vergleiche abhängiger Variablen wurde der One Way Repeated Measures Analysis of Variance (One Way RM ANOVA) verwendet. Einzelne Messungen wurden hierbei gegen die Kontrollgruppe verglichen (Bonferroni t-Test).

Bei nicht Bestehen des Normalitäts-Tests gelangte der Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks (RM ANOVA on Ranks) zur Anwendung. Einzelne Messungen wurden hierbei nach der Dunnet`s Method mit der Kontrollgruppe verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollgruppe I: Einfluss von UV-Licht auf die Rotationsfrequenzen von Bronchialepithel-Spheroiden

Durch die Versuche der Kontrollgruppe I sollte überprüft werden, ob UV-Lichtbestrahlung die Rotationsfrequenzen der Spheroide verändert, das heißt entweder stimulierende oder schädigende Einflüsse auf Bronchialepithelien hat.

Kontrollgruppe I
Medium und UV-Lichtbestrahlung; (n=10)

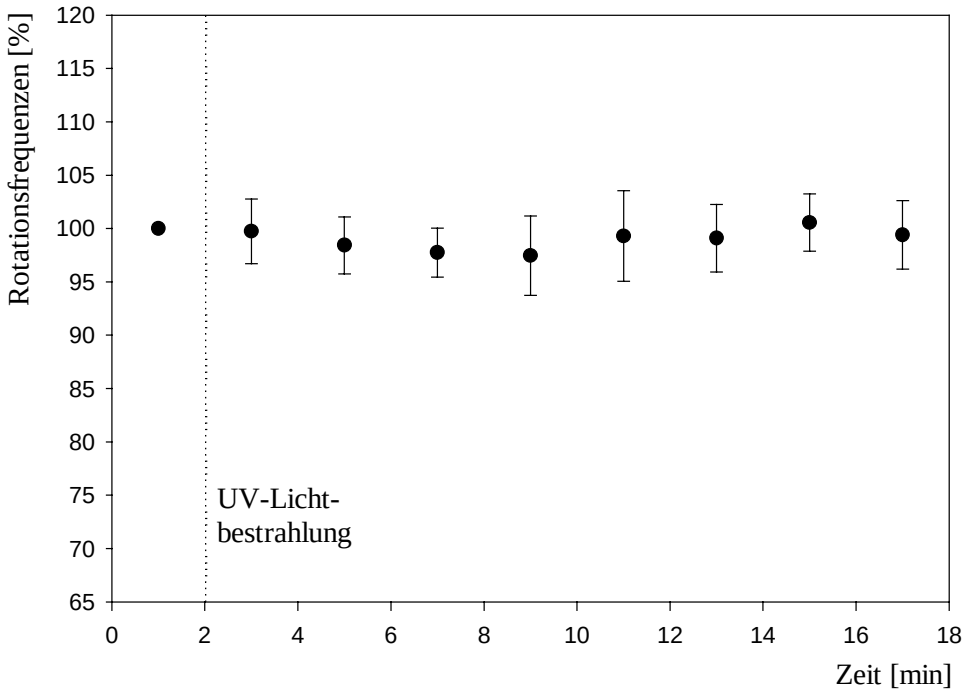


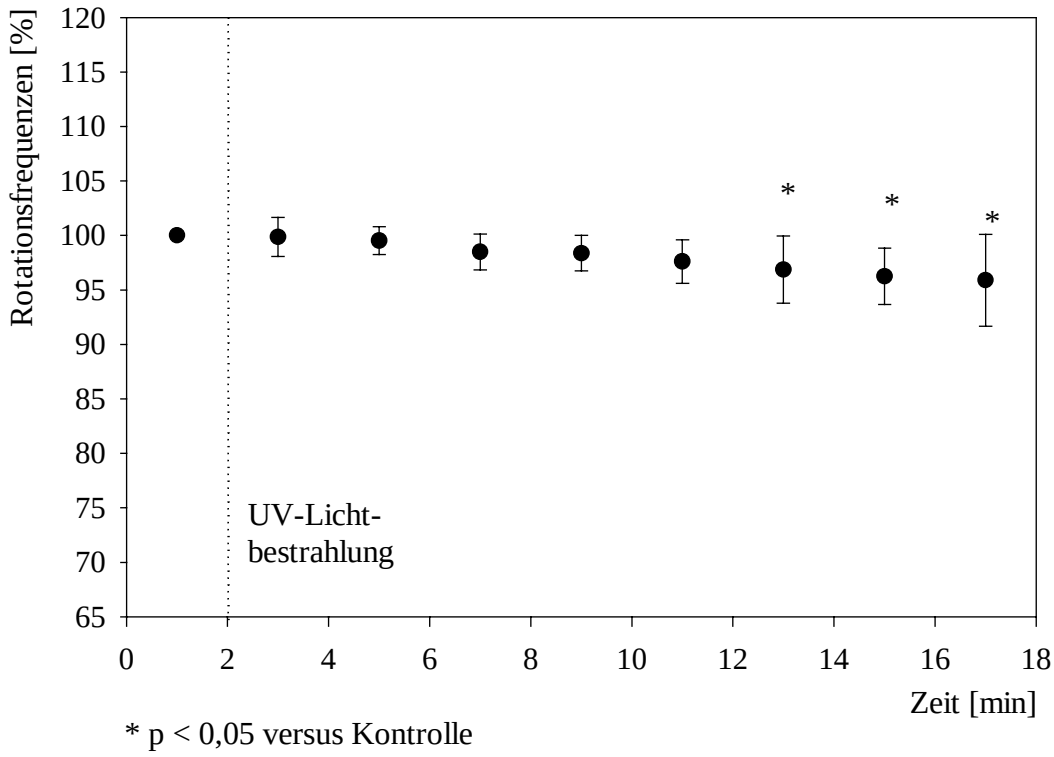
Abbildung 9 zeigt die Rotationsfrequenzen der Versuche aus Kontrollgruppe I vor und nach UV-Lichtbestrahlung in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit (x-Achse) bei einer gleichbleibenden Temperatur von 37° C. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Innerhalb der Versuche in Kontrollgruppe I, in welcher Spheroide in BEGM-Lösung in die Versuchskammer eingebracht und UV-Lichtbestrahlung ausgesetzt wurden, zeigten sich im Beobachtungszeitraum keine statistisch signifikant nachweisbaren Veränderungen der Rotationsfrequenzen (One Way RM ANOVA) (siehe Abbildung 9).

3.2. Kontrollgruppe II: Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die Rotationsfrequenzen von Bronchialepithel-Spheroiden

Mit den Versuchen der Kontrollgruppe II sollte überprüft werden, ob ein Gehalt von 0,5 % DMSO in der Versuchslösung die spheroidalen Rotationsfrequenzen verändert.

Kontrollgruppe II
Medium, DMSO und UV-Lichtbestrahlung; (n=10)



* p < 0,05 versus Kontrolle

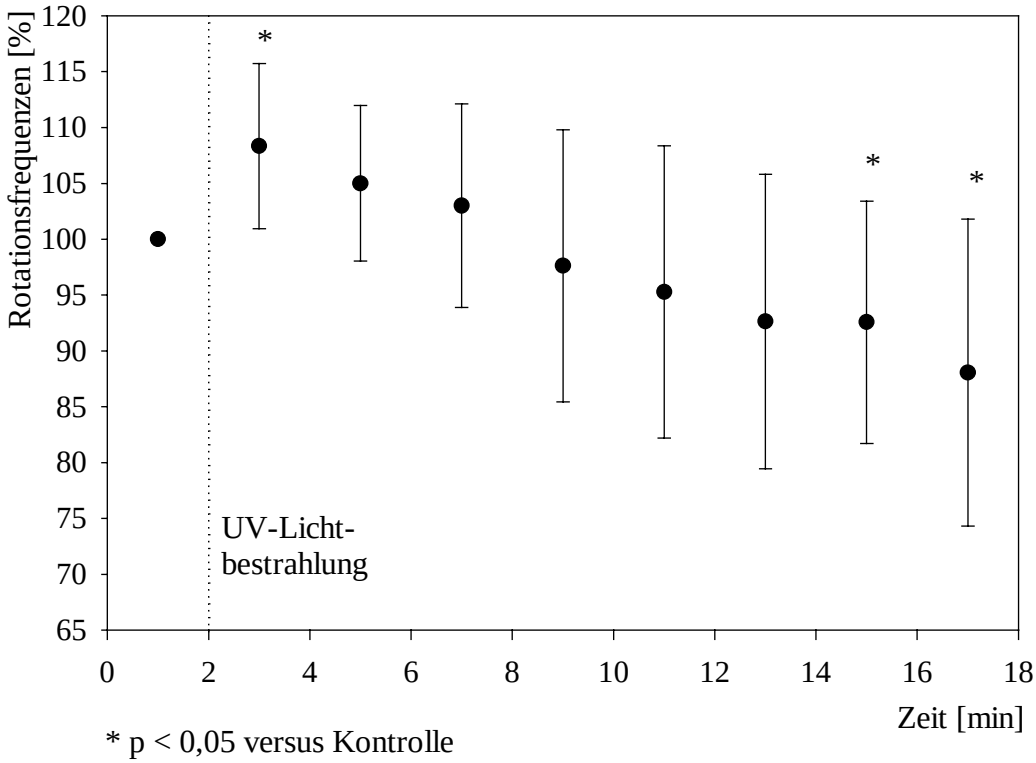
Abbildung 10 zeigt die Rotationsfrequenzen der Versuche aus Kontrollgruppe II vor und nach UV-Lichtbestrahlung in Abhängigkeit von der Beobachtungszeit (x-Achse) bei einer gleichbleibenden Temperatur von 37°C. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Innerhalb der Versuche von Kontrollgruppe II, bei welchen der Versuchslösung 0,5 % DMSO beigefügt war, kam es zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Rotationsfrequenzen. Die Vergleiche der Werte zu den Zeitpunkten t = 13, 15 und 17 Minuten ergaben im Vergleich zum Kontrollwert t = 1 Minute mit $p<0,05$ einen statistisch signifikanten Unterschied (RM ANOVA on Ranks, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe nach Dunnett) (siehe Abbildung 10).

3.3. Versuchsgruppen I bis III: Rotationsfrequenzänderungen in den Versuchsgruppen mit Caged-Isoproterenol

Mit den Experimenten in den Versuchsgruppen I bis III sollte überprüft werden, ob sich die Rotationsfrequenzen der Bronchialepithel-Spheroide durch Zugabe von Caged-Isoproterenol in die Versuchslösung verändern.

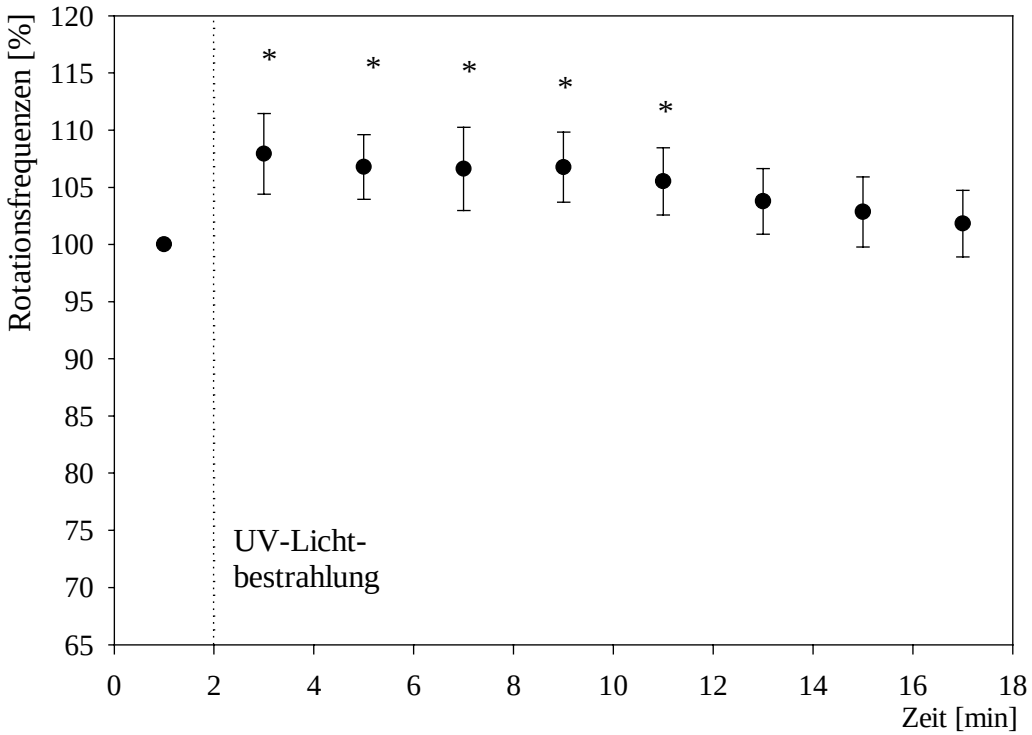
Versuchsgruppe I
Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=10)



* p < 0,05 versus Kontrolle

Abbildung 11a zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe I, bei welchen die Versuchslösung Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l enthielt, vor und nach UV-Lichtbestrahlung über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

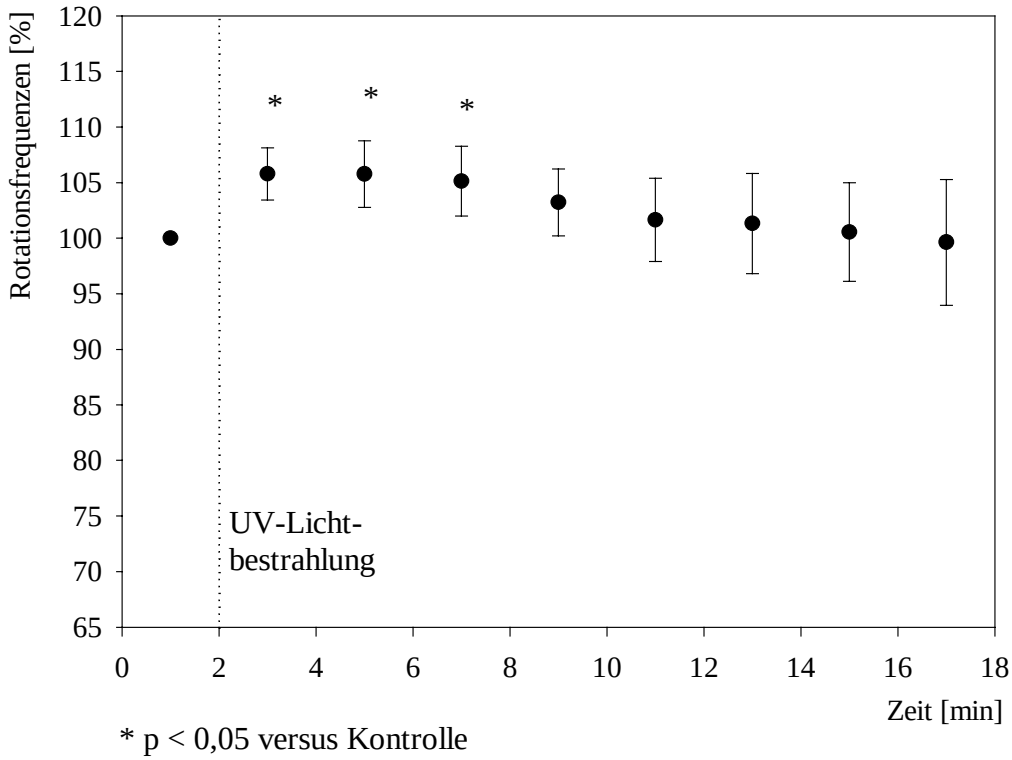
Versuchsgruppe II
Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=10)



* p < 0,05 versus Kontrolle

Abbildung 11b zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe II, bei welchen die Versuchslösung Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l enthielt, vor und nach UV-Lichtbestrahlung über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Versuchsgruppe III
Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; (n=10)



* p < 0,05 versus Kontrolle

Abbildung 11c zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe III, bei welchen die Versuchslösung Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l enthielt, vor und nach UV-Lichtbestrahlung über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Die Experimente der Versuchsgruppe I (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l) zeigten einen Anstieg der Rotationsfrequenzen zu Versuchsbeginn. Der Ausgangswert wurde zum Zeitpunkt t = 3 Minuten mit $p < 0,05$ statistisch signifikant überschritten. Im weiteren Verlauf kam es zu den Zeitpunkten t = 15 und 17 Minuten zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Rotationsfrequenzen im Vergleich zum Ausgangswert t = 1 Minute (One Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test) (vergleiche Abbildung 11a).

In Versuchsgruppen II (Caged Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l) kam es zu einem statistisch signifikantem Anstieg der Rotationsfrequenzen im Vergleich zur Ausgangsfrequenz innerhalb des Zeitraums t = 3 bis 11 Minuten (One Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test) (vergleiche Abbildung 11b).
Die Experimente der Versuchsgruppe III (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l) zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg der Rotationsfrequenzen zu den Zeitpunkten t= 3, 5 und 7 Minuten (One Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test) und kehrten im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraums in die Nähe des Ausgangswertes von 100% zurück (siehe. Abbildungen 11c).
Der Vergleich der Versuchsgruppen I bis III (Caged-Isoproterenol der Konzentrationen 10^{-3} bis 10^{-5} mol/l) untereinander ergab statistisch signifikante Unterschiede bei Versuchsgruppe I versus Versuchsgruppe II und bei Versuchsgruppe I versus Versuchsgruppe III zum Zeitpunkt t = 3 Minuten.. Zwischen Versuchsgruppe II und Versuchsgruppe III konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt werden (One Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test).

3.4. Rotationsfrequenzänderungen in den Versuchsgruppen mit photolysiertem Caged-Isoproterenol

Die chemische Substanz Caged-Isoproterenol wurde vor Versuchsbeginn einer UV-Lichtbestrahlung von 15 Sekunden ausgesetzt. Das Versuchsverhalten der Spheroide wurde dann ohne Adaptationszeit beobachtet, da Cage-Stoff und Isoproterenol auf Grund der UV-Lichtbestrahlung schon am Anfang des Experiments voneinander getrennt in der Versuchslösung vorlagen und somit von Beginn des Experimentes an eine Wirkung der einzelnen Stoffkomponenten auf die Proben zu erwarten war.

Versuchsgruppe IV
Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=5)

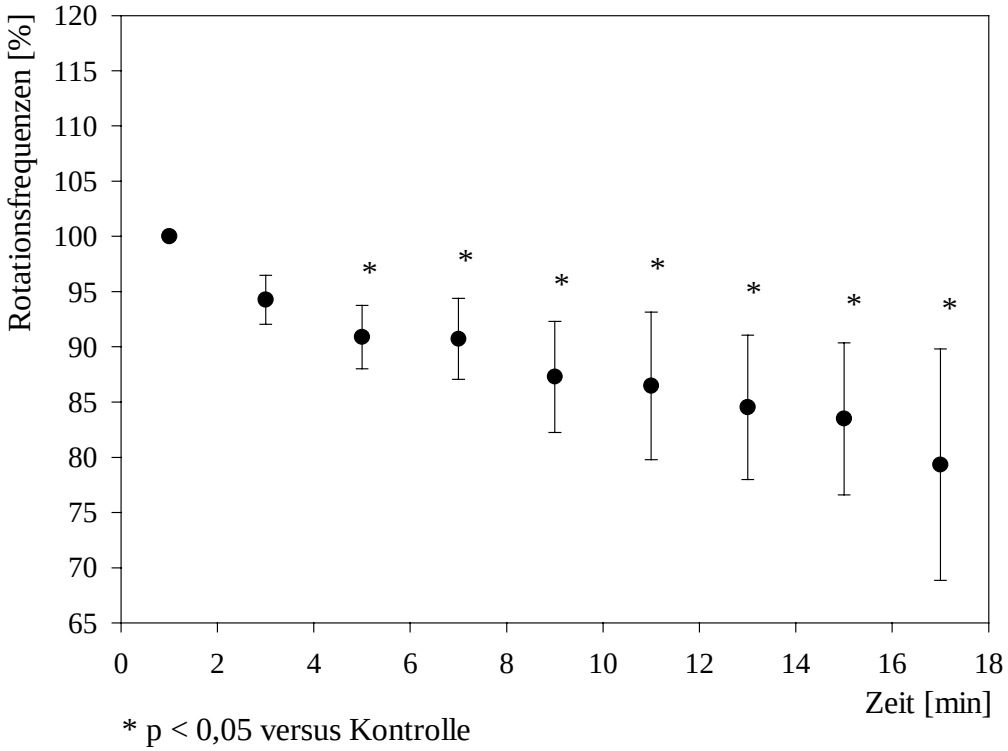


Abbildung 12a zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe IV, bei welchen die Versuchslösung photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l enthielt, über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Versuchsgruppe V
Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l; (n=5)

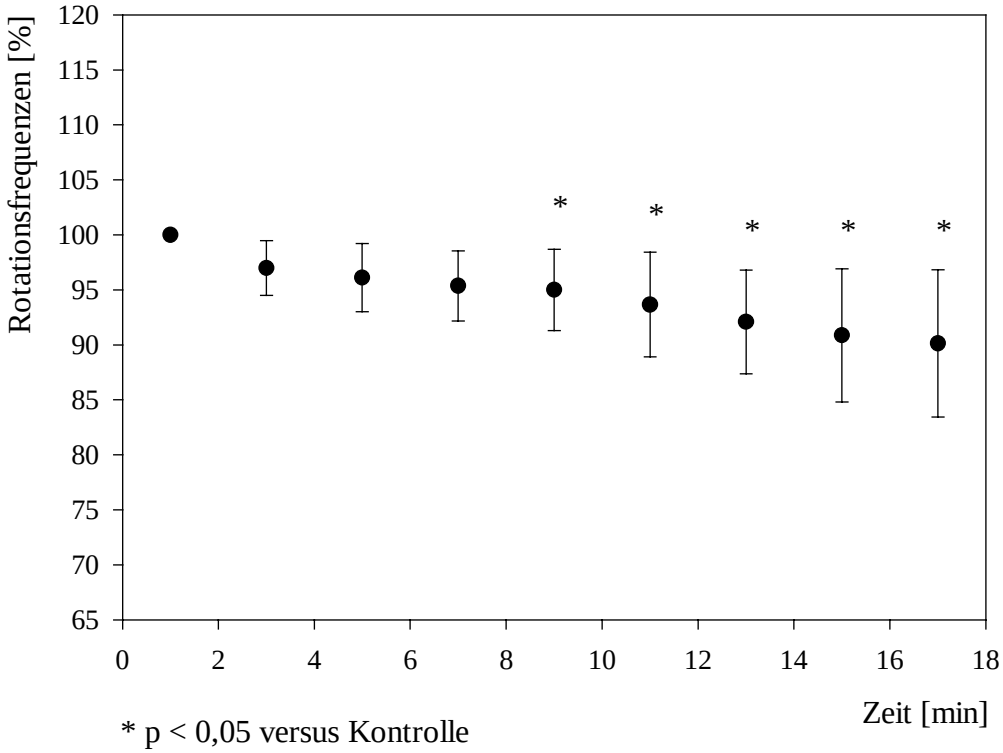


Abbildung 12b zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe V, bei welchen die Versuchslösung photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} mol/l enthielt, über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Versuchsgruppe VI
Photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l; (n=5)

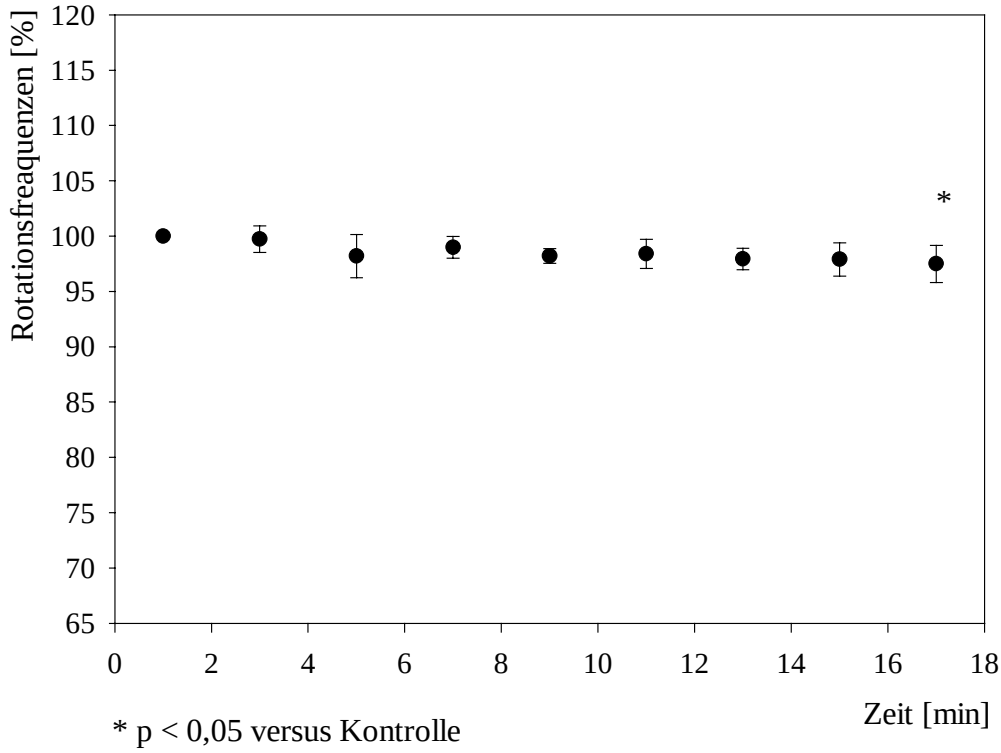


Abbildung 12c zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe VI, bei welchen die Versuchslösung photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l enthielt, über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Die Experimente der Versuchsgruppe IV (photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l) zeigten bei der Auswertung einen statistisch signifikanten Abfall der Rotationsfrequenzen zu den Zeitpunkten t = 5 bis 17 Minuten (One Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test) (vergleiche Abbildungen 12a).
Bei den Versuchen der Versuchsgruppe V (photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentrationen 10^{-4} mol/l) zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede (Abfall der Rotationsfrequenzen) zur Ausgangs-Rotationsfrequenz zu den Zeitpunkten t = 9 bis 17 Minuten (One

Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test) (siehe Abbildung 12b)

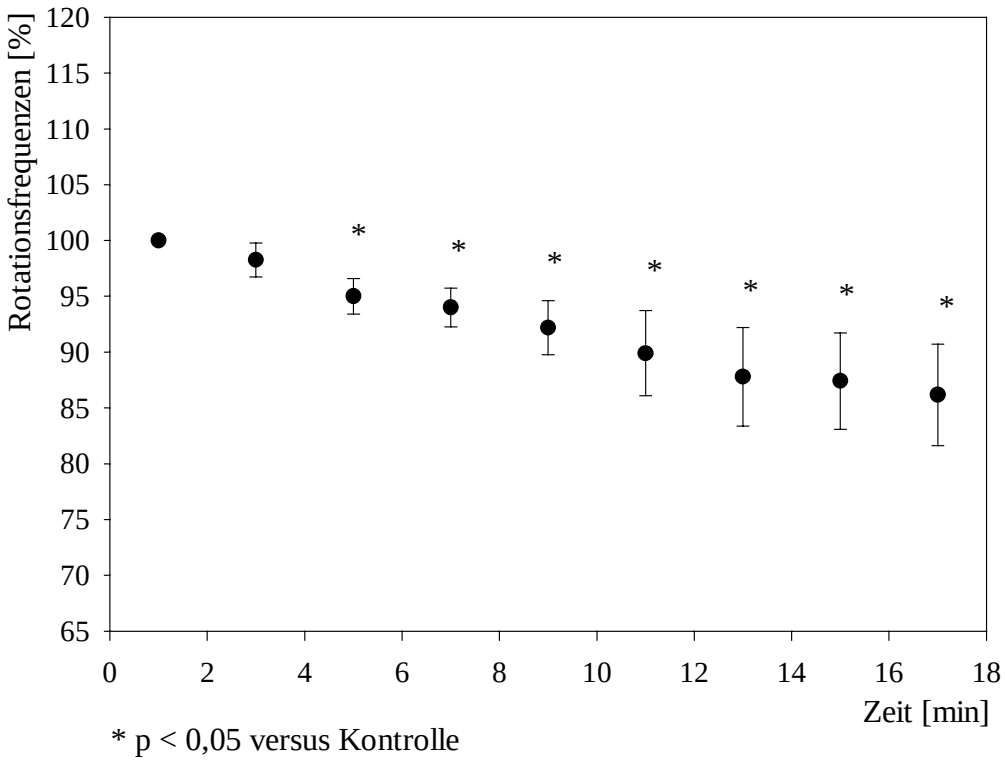
Die Auswertung der Versuchsgruppe VI (photolysiertes Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l) zeigte eine statistisch signifikante Abnahmen der Rotationsfrequenz zum Zeitpunkt t = 17 Minuten im Vergleich zur Ausgangs-Rotationsfrequenz (One Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test) (vergleiche Abbildung 12c)

Bei allen Experimenten der Versuchsgruppen IV bis VI kam es zu statistisch signifikanten Abfällen der Rotationsfrequenzen.

3.5. Einfluss von Nitrobenzaldehyd auf die spheroidalen Rotationsfrequenzen

Da der Cage-Stoff 2-Nitrosobenzaldehyd nicht als isoliertes Produkt zur Verfügung stand, wurde für diese zusätzliche Versuchsreihe ein dem 2-Nitrosobenzaldehyd chemisch nahe verwandter Stoff, das Nitrobenzaldehyd verwendet (siehe 2.3.2). Da Nitrobenzaldehyd von Beginn des Experimentes an in der Versuchslösung vorhanden war, fanden die Versuche ohne Einhaltung einer Adaptationszeit statt.

Versuchsgruppe VII
Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-3} mol/l; (n=5)



* $p < 0,05$ versus Kontrolle

Abbildung 13a zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe VII, bei welchen die Versuchslösung Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-3} mol/l enthielt, über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

Versuchsgruppe VIII
Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-4}mol/l; (n=5)

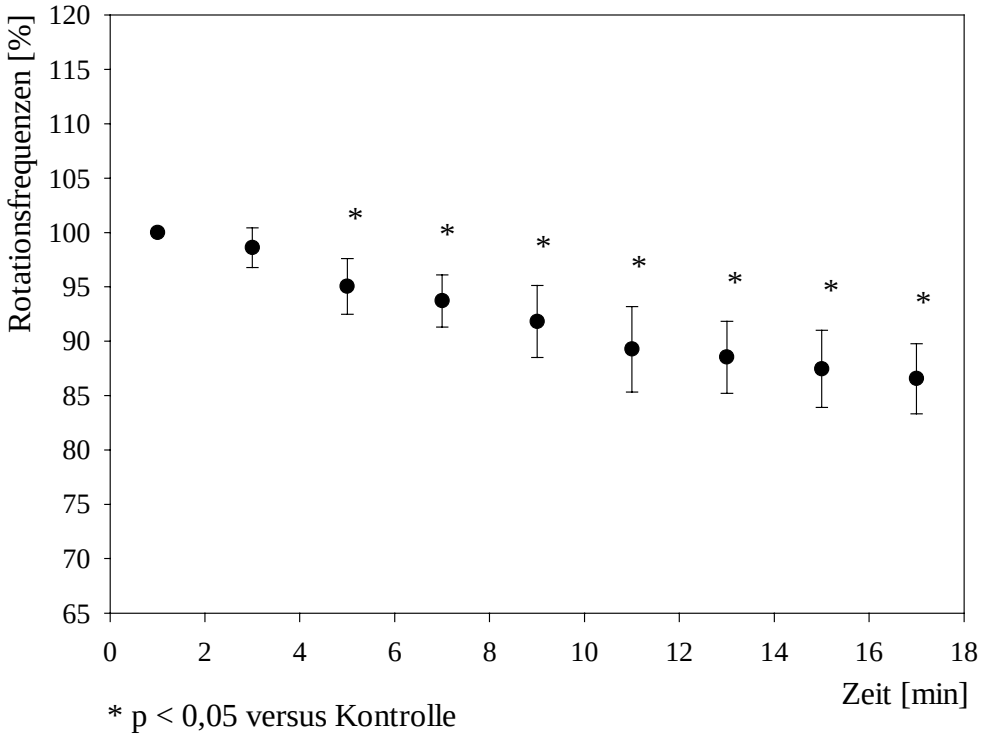


Abbildung 13b zeigt die Rotationsfrequenzänderungen der Versuche aus Versuchsgruppe VIII, bei welchen die Versuchslösung Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-5} mol/l enthielt, über einen Beobachtungszeitraum von 18 Minuten. Angabe der Rotationsfrequenzen in % vom Ausgangswert (Mittelwert ± Standardabweichung).

In den Versuchsgruppen VII und VIII (Nitrobenzaldehyd der Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-4} mol/l) zeigte sich, dass es bei beiden Gruppen zu einem statistisch signifikanten Abfall der Rotationsfrequenzen zu den Zeitpunkten t = 5 bis 17 Minuten kam (One Way RM ANOVA, multipler Vergleich gegen die Kontrollgruppe, Bonferroni t-Test) (vergleiche Abbildung 13a und 13b).

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Materialien und Methoden

4.1.1. Spheroide

Spheroide stellen eine nicht adhärente Form der Kultivierung respiratorischer Epithelien dar. Bei der in dieser Arbeit dargestellten Methode erfolgt die Erfassung der ziliären Funktion des respiratorischen Gewebes durch die Messung der Rotationsfrequenzen. Die Rotationsfrequenzbeurteilung humaner Bronchialepithel-Spheroide dient somit als Maß der Aktivität der ziliären Funktion des respiratorischen Gewebes. 1958 zeigten Corssen et al. erstmals, dass es sich um ein System handelt, welches mit einfachen Mitteln wie Mikroskop und Stoppuhr zu erfassen ist [7, 8].

Jorissen et al. entwickelten 1989 eine Methode, Spheroide aus proteolytisch aufgespaltenen Gewebsproben nach Polypektomien aus dem Bereich der Conchae nasales inferiores zu kultivieren [25].

Bridges et al. kultivierten Bronchialepithel-Spheroide aus Bürstenabstrichen der Nasenschleimhaut [5].

Aufgrund der eigenen Erfahrungen wurde die Kultivierungsmethode von Bridges et al. an der Medizinischen Klinik der LMU modifiziert, indem auf die Verwendung eines Rüttelinkubators verzichtet wurde und andere Kulturmedien zum Einsatz gelangten. Der wesentlichste Unterschied besteht in der Region der Probengewinnung: Während Bridges et al. Bürstenabstriche der Nasenschleimhaut verwendeten, werden an der Medizinischen Klinik der LMU, bedingt durch die Durchführung von Bronchoskopien, Proben aus den Hauptbronchien entnommen. Es ist nicht auszuschließen, dass die Rotationsfrequenzen der Spheroide sich abhängig vom Ort der Probenentnahme unterscheiden. Die Probenentnahme erfolgte auf Grund dieser Tatsache für sämtliche Proben unserer Versuchsreihen immer aus dem rechten oder linken Hauptbronchus. Mit den gezüchteten Spheroiden starteten Gamarra et al. Versuche zur In-vitro-Untersuchung der mukoziliären Funktion, indem sie Experimente zur Temperaturabhängigkeit

der spheroidalen Rotationsfrequenz durchführten [12]. Diese Resultate waren vielversprechend und entsprachen den Ergebnissen, die bei Beobachtungen der ziliären Schlagfrequenz gemacht wurden [16, 23, 28, 34]. Deshalb sollten als nächstes Versuche zur Beeinflussbarkeit der Rotationsfrequenz durch pharmakologische Wirkstoffe durchgeführt werden.

Ein Problem der Versuchsdurchführung stellte die starke Beeinflussbarkeit der Spheroide durch mechanische Manipulation, also Erschütterung oder Transport der Petrischalen, Pipettiervorgänge oder Verdampfen der Nährsuspension in der Kammer dar. Weder Jorissen et al. noch Bridges et al. gingen in Ihren Publikationen auf diese Schwierigkeiten ein; der Schwerpunkt ihrer Arbeiten lag nicht im Versuchsbereich, sondern erstreckte sich auf die Beobachtung der ziliären Funktion bei konstanten Umgebungsbedingungen.

Einzig Corssen et al. führten Experimente an Spheroiden mit Narkotika in einer Perfusionskammer durch, haben dabei aber das Problem der mechanischen Beeinflussbarkeit nicht erwähnt [8].

Im Rahmen der von uns in diesem Projekt durchgeführten Vorversuche stellten wir jedoch fest, dass die Stabilität des Versuchssystems für direkte Pipettiervorgänge nicht ausreicht. Auf die Idee, bestimmte Konzentrationen des Wirkstoffes mittels Pipettierungsvorgang in die Versuchskammer einzubringen, musste somit verzichtet werden. Aus diesem Grund erschien uns die Durchführung der Versuche mit einem Caged-Stoff als sinnvolle Alternative.

Eine weitere Quelle der Beeinflussung der spheroidalen Rotationsfrequenzen stellt die Vormedikation der betreffenden Versuchsperson und die Zusammensetzung des bronchialen Mukus dar. Die möglichen Auswirkungen der Vormedikation versuchten wir durch eine Mindestkulturzeit von sieben Tagen auszuschalten, da je nach Halbwertszeit nach dieser Zeitspanne keine die Zilien betreffende Restmedikamentenwirkung mehr vorhanden sein dürfte, und außerdem auch nicht mehr mit einer fortschreitenden Down-Regulation von β-Rezeptoren zu rechnen ist [2]. Die Beeinflussung der Rotationsfrequenzen durch die mukoidale Zusammensetzung und unterschiedliche Krankheitsbilder stellt einen weiteren zu beachtenden Aspekt dar. Es ist nicht auszuschließen, dass die Schleimproduktion der Clara-Zellen unter Kultivierungsbedingungen abnimmt, im Extremfall sogar ganz eingestellt wird [24]. Aus diesen Gründen wurde nach Probenentnahme immer darauf geachtet, nur Bürstenabstriche, die eine ausreichende Menge an Mukus enthielten, der Kultivierung zuzuführen, um so sicherzustellen, dass den Spheroiden ausreichend Rotationsmedium zur Verfügung stand.

Nach unseren Beobachtungen ist die Streubreite der Rotationsfrequenzen ebenso wie die ziliäre Tätigkeit herkömmlicher Proben von Individuum zu Individuum sehr groß, bleibt aber bei Proben eines Spenders nahezu konstant. Daraus ergeben sich Rotations-Frequenzunterschiede bei Proben gleicher Größe, die von unterschiedlichen Spendern stammen. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den von Hesse et al. zur Schlagfrequenz von respiratorischem Flimmerepithel gemachten Beobachtungen [16].
Der Vorteil in der Verwendung von Bronchialepithel-Spheroiden liegt in der einfachen Art der Probengewinnung und dem relativ einfachen Kultivierungsverfahren. Die Methode, Bürstenabstriche von respiratorischen Epithelien zu entnehmen, hinterlässt keine vernarbenden Gewebsdefekte, sodass dieser Eingriff als bedeutend weniger invasiv als etwa eine Zangenbiopsie anzusehen ist.

4.1.2. Kultivierungsmethoden

Die Bürstenabstriche der Hauptbronchien wurden, nachdem sie gewaschen waren, zur Kultivierung auf agarbeschichtete Multiwellplatten überführt, auf welche zusätzlich 200 µl BEGM pipettiert wurde. Die Agarbeschichtung und serumfreies Kulturmedium (BEGM) wurden gewählt, um Zelladhäsionen an die Multiwellplatten zu verhindern und einer Abnahme der Zilienzahl und einer Ziliendegeneration entgegenzuwirken [14].
Der Einsatz von BEGM weist folgende Vorzüge auf: Es handelt sich um serumfreies wässeriges Medium, welches weder pH-kontrolliert noch gepuffert werden muss. Die Herstellung der Lösung ist einfach zu realisieren. Dem gelieferten Medium werden lediglich Supplement Packs zugesetzt, welche Antibiotika, Antimykotika und Nährstoffe im Sinne von Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Insulin und andere Hormone enthalten [42].
Wässriges Medium wie BEGM schließt einen negativen Effekt des Nährmediums im Sinne erhöhter Viskosität auf die ziliäre Tätigkeit aus.
Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um eine Beeinflussung der Spheroide durch Veränderungen der Osmolarität, des pH-Wertes oder Nährstoffmangel zu verhindern. Zur Vermeidung von bakteriellem oder mykotischem Befall der Kulturen wurden die Multiwellplatten routinemäßig einmal wöchentlich gewechselt.

4.1.3. Versuchskammer

Die Versuchskammer der ersten Versuchsreihe, mit welcher Gamarra et al. die Temperaturabhängigkeit der Spheroide untersuchten, wurde weiterentwickelt [12]. Es entstand eine doppelwandige, von temperiertem Wasser durchspülte metallische Kammer, in deren Mitte sich eine gläserne Versuchskammer befand. Auf den Boden der Versuchskammer wurden die Proben aufgebracht und die Kammer nach UV-Lichtbestrahlung durch einen gläsernen Deckel komplett verschlossen (siehe Abbildung 3). Durch diese Maßnahme wurde die Probe gegen Verdunstung und damit einhergehende Änderungen der Osmolarität und des pH-Wertes geschützt, sodass eine Beeinflussung der Experimente durch Veränderungen dieser Art ausgeschlossen werden konnte [17, 35].
Der Versuchsaufbau wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop auf einem erschütterungsfreien Tisch installiert, sodass die Spheroide gleich am Ort der Versuchsdurchführung umpipettiert wurden und sich dort adaptieren konnten.

4.1.4. Caged-Produkte

Caged-Produkte sind Stoffe, deren chemische Wirksamkeit im Grundzustand durch kovalente Bindung von Seitengruppen blockiert ist und deren Wirksamkeit erst durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda \approx 300$ - 400 nm hergestellt werden kann. Diese Bestrahlungswellenlänge bringt den Vorteil mit sich, dass eine Benutzung der Substanzen in Räumen mit gedämpftem Licht möglich, und in diesem Wellenlängenbereich nicht mit Schäden durch UV-Licht an Aminosäuren zu rechnen ist [9, 36, 37]. Der Einsatz von Caged-Produkten stellt die Möglichkeit dar, in kürzester Zeit Konzentrationsunterschiede eines Wirkstoffes durch UV-Lichtbestrahlung herbeizuführen, ohne mechanische Manipulationen wie zum Beispiel Pipettiervorgänge an den jeweiligen Proben ausführen oder Perfusionskammern benutzen zu müssen.
Die Aktivierung durch UV-Licht kann sowohl über Laser als auch über Bogenlampen geschehen, wobei sich Bogenlampen auf Grund ihrer langen Aktivierungszeit nicht für Versuche zur schnellen Kinetik eignen. In unseren Versuchsreihen, die nicht der schnellen Kinetik zuzuord-

nen sind, sind Bogenlampen zum Einsatz gekommen, da sich die vorgenommenen Messungen im Sekunden- bis Minutenbereich abspielten [49].

Zur exakten Durchführung von Experimenten werden an Caged-Produkte folgende Bedingungen gestellt: Sie sollen das jeweilige Biomolekül nicht verändern, es nach der Photolyse rasch verlassen, chemisch inert sein und weder mit dem jeweiligen Biomolekül noch mit dem zu untersuchendem System oder Stoff in Verbindung treten oder dort Veränderungen hervorrufen.

Diese Forderungen an Caged-Produkte werden jedoch nicht immer erfüllt, was zum Beispiel bei Versuchen mit Caged-Stoffen, die als Abspaltungsprodukt 2-Nitro-sobenzaldehyd enthalten, nachgewiesen worden ist. Seitengruppen können mit dem Wirkstoff, also in unserem Fall Isoproterenol, oder anderen Komponenten wie in unseren Experimenten den Zilien, interagieren [1, 37]. Diese vor Versuchsbeginn unkalkulierbaren Wechselwirkungen können dazu führen, dass neuerliche Versuchsreihen zur Verifizierung der Wirkung des Cage-Stoffes notwendig werden. In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grund der Resultate hinsichtlich der Rotationsfrequenzveränderungen in Versuchsgruppe IV bis VI (photolysiertes Isoproterenol der Konzentrationen 10^{-3} bis 10^{-5} mol/l) eine ergänzende Versuchsreihe mit dem Cage-Stoff 2-Nitro-sobenzaldehyd geplant. Da jedoch das Abspaltungsprodukt 2-Nitrosobenzaldehyd nicht als isolierter Stoff zu beziehen war, musste ein Ersatzstoff mit größtmöglicher chemischer Affinität gefunden werden. In unserem Fall gelangte Nitrobenzaldeyhd in den neuerlichen Versuchsreihen (Versuchsgruppe VII und VIII) zur Anwendung, da es eine starke chemische Verwandtschaft zu 2-Nitrosobenzaldehyd aufweist, nicht flüchtig ist und zudem als isoliertes Produkt zur Verfügung steht.

4.1.5. Versuchsdurchführung

Die einzelnen Experimente wurden folgendermaßen beurteilt: Anhand von Oberflächenmerkmalen eines zuvor ausgewählten Spheroids wurden 15 Umdrehungen gezählt und die dazu benötigte Zeit per Hand mit einer Stoppuhr gemessen.
Der Versuchsaufbau konnte zur Kontrolle der Messung über ein Zweitokular an eine Videokamera angeschlossen werden, mit welcher der Versuch aufgezeichnet werden konnte. Diese Variation des Versuchsaufbaus ermöglichte eine Kontrolle der per Hand gemessenen Werte im Vergleich zur eingeblendeten Stoppuhr auf der Videodokumentation, sodass ein systemischer Fehler im Beobachtungszeitraum ausgeschlossen werden konnte.
Trotz der Möglichkeit, in Räumen mit gedämpften Licht zu arbeiten, haben wir uns für die komplette Abdunklung des Versuchsraumes und die Abdeckung der Lichtquelle des Mikroskops durch einen UV-Filter entschieden, um etwaige Beeinträchtigungen im Sinne von verfrüht ausgelöster Aktivierung von vornherein auszuschließen.
Die UV-Lampe wurde nach Adaptation und Ausgangswertbestimmung der Proben bei Bedarf für etwa fünfzehn Sekunden aktiviert, sodass sichergestellt war, dass die Photolyse des Caged-Produktes auf jeden Fall in Gang gesetzt worden war.
Abweichend von den Experimenten innerhalb der Kontrollgruppen und der Versuche mit nicht photolysiertem Caged-Isoproterenol konnte bei den Versuchsreihen mit photolysiertem Isoproterenol bzw. Nitrobenzaldehyd die Adaptationszeit von fünf Minuten nicht eingehalten werden, da der Wirkstoff von Anfang an in der Versuchskammer enthalten war, das heißt von einer sofortigen Wirkung des Stoffes auf das Bronchialepithel ausgegangen werden musste.

4.2. Vergleich mit der konventionellen Beurteilung der ziliären Funktion respiratorischer Epithelien

Die konventionelle Beurteilung der ziliären Funktion, erfolgt in der Regel nach einer der Standardmethoden, wovon exemplarisch im Folgenden drei aufgeführt sind:

Photoverstärkermethode: Der Zilienschlag einzelner fokussierter Zilien wird mittels Photoverstärker registriert. Die Schlagfrequenz kann optisch dargestellt und dann gemessen werden [55].

Videobeobachtung: Beobachtung einzelner fokussierter Zellen eines angezüchteten Zellverbandes über ein Interferenzmikroskop und Aufzeichnung der beobachteten ziliären Aktivität mittels Videokamera [27].

In-vivo-Beobachtung: In-vivo-Beobachtung der ziliären Funktion des nasalen Flimmerepithels freiwilliger Probanden mittels oben beschriebener Photoverstärkermethode [29].

Die Beurteilung der ziliären Funktion nach diesen Methoden basiert auf direkter Beobachtung der ziliären Tätigkeit einzelner Zilien, das heißt Umgebungseinflüsse wie etwa die Beschaffenheit des Umgebungsmediums können das Ergebnis nicht verfälschen.

Daneben ist die Applikation pharmakologischer oder toxischer Substanzen bei adhärenten Zellkulturen leichter zu handhaben, da sie nicht wie Bronchialepithel-Spheroide sensibel auf mechanische Manipulationen reagieren.

Nachteile der konventionellen Beurteilungsmethoden sind zum einen der erforderliche umfangreiche apparative Aufwand bei der Versuchsdurchführung und zum anderen das große Maß an Zeit, das die Vorbereitung dieser Methoden und deren Durchführung, vor allem dann, wenn die Versuchsdurchführung direkt an die Probenentnahme anschließt, beansprucht. Ein weiteres Problem stellt die Abhängigkeit des mukoziliären Transportsystems von funktionierendem Ionen- und Wassertransport dar. Werden die entnommenen Proben des respiratorischen Flimmerepithels kultiviert, kommt es zu Ziliendegeneration schon nach wenigen Tagen der Inkubation und auch die Mukusproduktion wird unter Kulturbedingungen nahezu vollständig eingestellt [20, 22, 23, 24].

Dies bedeutet, dass die Ergebnisse aus Beobachtungen der ziliären Funktion von In-vitro-Kulturen nur bedingt mit den Resultaten von In-vivo-Beobachtungen vergleichbar sind.

Die Verwendung von Bronchialepithel-Spheroiden dagegen weist vielfältige Vorzüge auf. So ist bereits die Probengewinnung wesentlich einfacher zu realisieren als bei den herkömmlichen Methoden.

Was ihre Kultivierbarkeit anbelangt, sind sie wesentlich stabiler. Sie können mit geringem Aufwand gezüchtet werden und die Kulturen sind relativ lange haltbar: für einen Zeitraum von mindestens vier Wochen sind an Bronchialepithel-Spheroiden keine degenerativen Veränderungen nachgewiesen [22, 41].

Ein weiterer Aspekt, der für die Verwendung von Bronchialepithel-Spheroiden spricht, ist die relativ hohe Ausbeute bei der Gewinnung versuchstauglicher Zellproben. In unseren Versuchsreihen wurden im Zeitraum von Januar bis Oktober 1996 insgesamt 91 Proben entnommen von denen 73 (rund 80 %) für Versuche verwendet werden konnten. Diese Ausbeute von rund 80 % versuchstauglicher Proben bedeutet ein sehr gutes Ergebnis in Anbetracht der häufig sehr schwerwiegenden Grunderkrankungen des Patientenkollektives, bestehend aus Patienten mit hauptsächlich malignen, aber auch Patienten mit benignen, autoimmunen oder postentzündlichen Erkrankungen. Gründe für den Verlust von knapp 20 % des Probenmaterials liegen in bakterieller oder mykotischer Besiedlung oder zu geringer Materialmenge der Gewebeproben.

Die Tatsache, dass auch rheologische Eigenschaften des Mukus und die Interaktion zwischen Schleim und ziliärer Tätigkeit an jeder einzelnen Probe beobachtet werden kann, stellt einen weiteren Vorteil gegenüber den herkömmlichen Kultivierungsverfahren dar, bei welchen lediglich die Funktion der Zilien erfasst wird. Dies könnte zu einem späteren Zeitpunkt, zum Beispiel bei einer Anwendung im klinischen Bereich einen Vorteil für einzelne Patienten bedeuten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass am Modell der Bronchialepithel-Spheroide mit geringen Kosten und niedrigem apparativem Aufwand innerhalb von 48 Stunden eine Aussage zur Rotationsfrequenz bzw. indirekt zur ziliären Tätigkeit einer entnommenen Probe gemacht werden kann. Die Resultate kommen den Ergebnissen aus In-vivo-Beobachtungen deutlich näher als dies bei den Aussagen aus der Beurteilung der ziliären Funktion nach herkömmlichen Methoden der Fall ist.

Im Einsatz des Modells der Bronchialepithel-Spheroide könnte sich für die Zukunft eine mögliche Anwendung zur Beurteilung der mukoziliären Funktion des respiratorischen Epithels einzelner Patienten ergeben.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Ergebnisse in den Kontrollgruppen

4.3.1.1. Ergebnisse in Kontrollgruppe I

Die Werte der einzelnen Versuche innerhalb von Kontrollgruppe I (BEGM und UV-Lichtbestrahlung) zeigten keine signifikanten Veränderungen der Rotationsfrequenzen. Diese Ergebnisse bestätigen noch einmal die Aussagen von sämtlichen mit Bronchialepithel-Spheroiden arbeitenden Studiengruppen, dass nach einer Stabilisierungsphase der Spheroide in einer Versuchskammer mit gleichbleibender Temperatur die Rotationsfrequenzen über einen langen Zeitraum unverändert bleiben (vergleiche Abbildung 9) [5, 12].
Außerdem konnte mit den Versuchen in Kontrollgruppe I gezeigt werden, dass der Einsatz von UV-Lichtbestrahlung mit einer Wellenlänge von 300 nm oder mehr keine Schäden an respiratorischen Epithelien verursacht. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen von Muralidharan et al., welche den selben Schluss für Endothel bei ihren Experimenten gezogen haben [9, 37].

4.3.1.2. Ergebnisse in Kontrollgruppe II

Die Rotationsfrequenzen der Versuche in Kontrollgruppe II (BEGM, 0,5% DMSO und UV-Lichtbestrahlung) zeigten eine statistisch signifikante Abnahme der Rotationsfrequenzen zu den Zeitpunkten t = 13, 15 und 17 Minuten.
Im direkten Vergleich der Rotationsfrequenzen von Kontrollgruppe I (ohne Zusatz von DMSO) zu den Rotationsfrequenzen der Kontrollgruppe II (mit Zusatz von DMSO) konnten somit Unterschiede der spheroidalen Rotationsfrequenzen nachgewiesen werden. Diese Veränderungen der Rotationsfrequenzen von Kontrollgruppe I zu Kontrollgruppe II zeigen, dass DMSO auch in Konzentrationen unter 1 % Veränderungen der ziliären Tätigkeit hervorruft (vergleiche Abbildung 10).
Der Effekt war jedoch gering vor allem in den ersten 13 Minuten. Deswegen hielten wir ihn bezüglich der Auswirkungen auf die Versuche mit Isoproterenol für relativ vernachlässigbar.
Dieses Ergebnis wird von Muralidharan et al. bestätigt: die Toxizität des Lösungsmittels DMSO ist bei ihren Versuchen in ähnlicher Weise beschrieben [38].

4.3.2. Ergebnisse der Versuchsgruppen mit Caged-Isoproterenol

Aufgrund von Literaturangaben über die Beeinflussbarkeit der ziliären Funktion respiratorischer Epithelien in adhärenten Zellkulturen durch Sympathomimetika gingen wir von der Annahme aus, dass auch humane Bronchialepithel-Spheroide durch die Gabe von β_2- Sympathomimetika positiv in ihrer Rotationsfrequenz beeinflussbar sein müssten [6, 10, 26, 30, 48, 55]. In den verschiedenen Arbeitsgruppen, die mit herkömmlichen Zellkulturen arbeiteten, wurde zur Stimulierung der ziliären Schlagfrequenz Isoprenalin, Salmbutamol, Salmetrol oder Terbutalin in Konzentrationen von 10^{-2} mol/l bis 10^{-6} mol/l verwendet.
Da in unseren Vorversuchen die Zugabe von Wirkstoffen in die Inkubationskammer gleichzeitig mit einer unvermeidbaren deutlich manifesten mechanischen Stimulation von Spheroiden einherging fiel die Entscheidung ein Caged-Produkt zu verwenden. Als einziges Sympathomimetikum mit β_2-Wirkung stand nur Caged-Isoproterenol zur Verfügung. In Anlehnung an die

von Ingels et al. mit Isoproterenol durchgeführten Experimente wurden unsere Versuche mit Konzentrationen des Caged-Isoproterenol von 10^{-3} mol/l bis 10^{-5} mol/l durchgeführt [19].

Im Gegensatz zur erwarteten länger andauernden Rotationsfrequenzsteigerung kam es bei allen angewendeten Konzentrationen des Caged-Isoproterenols zwar zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Rotationsfrequenzen, im Anschluss daran kam es jedoch in Versuchsgruppe I (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l) zu einem schnellen Abfall der Rotationsfrequenzen unter den Ausgangswert (100 %). In den Versuchsgruppen II und III (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-4} und 10^{-5} mol/l) kam es ebenfalls zu einem Anstieg der Rotationsfrequenzen, welche sich im weiteren Versuchsverlauf aber dann relativ schnell den Ausgangswerten annäherten, diese jedoch nicht unterschritten (vergleiche Abbildung 11a bis 11c). Die Ergebnisse unserer Versuche mit Caged-Wirkstoff standen im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen; jedoch waren letztere bei direkter Applikation des Wirkstoffes gemacht worden. Bei den in der Literatur erwähnten Experimenten war stets ein Anstieg der ziliären Schlagfrequenz verzeichnet, welcher nach Abklingen der Stoffwirkung zu seinem Ausgangswert zurückgekehrt war, dieses Niveau aber nicht, wie bei Versuchsgruppe I (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l) unterschritten hatte [6, 10, 19, 48, 55]. Die Beobachtung, dass die Rotationsfrequenzen der Versuchsgruppe I ihren Ausgangswert innerhalb der Versuchsdauer unterschritten, führte uns zu der Frage nach der Ursache der Rotationsfrequenzminderung. Die Ergebnisse der Versuchsgruppen I bis III, und auch die Tatsache das eine konzentrationsabhängige Steigerung der Rotationsfrequenzen von Versuchsgruppe III (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-5} mol/l) zu Versuchsgruppe I (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} mol/l) nur andeutungsweise gezeigt werden konnte, veranlassten uns zur Bildung der Arbeitshypothese, dass die Stoffe der photolysierten Versuchslösung (Isoproterenol und 2-Nitrosobenzaldehyd) sowohl einen stimulierenden als auch einen reduzierenden Effekt durch etwaige Nebenprodukte der Photolyse auf die Rotationsfrequenzen der Spheroide haben könnten.

Nach Literaturrecherchen kamen wir zu dem Schluss, dass die Caging-Gruppe 2-Nitrosobenzaldehyd Verursacher dieser Veränderungen sein könnte [1]. Deshalb entschlossen wir uns, das Caged-Isoproterenol schon vor Versuchsbeginn UV-Lichtbestrahlung auszusetzen und eine weitere Versuchsreihe mit dem so vorbehandelten, also bereits photolysierten Caged-Isoproterenol anzuschließen.

4.3.3. Ergebnisse der Versuchsgruppen mit photolysiertem Caged-Isoproterenol

Die in den Versuchsgruppen I bis III (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} bis 10^{-5} mol/l) gemachten oben beschriebenen Beobachtungen veranlassten uns, eine Versuchsserie zu starten, bei welcher der Caged-Stoff aktiviert wurde, bevor er in Kontakt mit den Spheroiden in der Versuchslösung gebracht wurde.

Der zu testende Stoff Caged-Isoproterenol wurde vor Versuchsbeginn einer UV-Lichtbestrahlung von 15 Sekunden ausgesetzt und dann sofort in die Versuchskammer eingebracht. Die Adaptationszeit entfiel, die Messung begann zum Zeitpunkt der Einbringung der Spheroide in die Versuchskammer (vergleiche Versuchsdurchführungen aus 2.5.2.4. bis 2.5.2.6). Bei allen Konzentrationen (10^{-3} mol/l bis 10^{-4} mol/l) des photolysierten Isoproterenols kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Rotationsfrequenzen (vergleiche Abb. 12a bis c). Diese Beobachtungen waren erstaunlich, da Isoproterenol als zilienschlagstimulierendes β_2-Sympathomimetikum in der Versuchslösung enthalten war. Die Annahme einer Inaktivität des Wirkstoffes Isoproterenol war durch die kurze Zeitspanne zwischen UV-Lichtbestrahlung und Versuchsdurchführung ausgeschlossen und hätte den in Versuchsreihe I bis III (Caged-Isoproterenol der Konzentration 10^{-3} bis 10^{-5} mol/l) gemachten Beobachtungen gänzlich widersprochen. Deshalb werteten wir diese Ergebnisse als Indiz dafür, dass die bis dahin von uns noch nicht näher beachtete Caging-Gruppe 2-Nitrosobenzaldehyd reduzierende Wirkung auf die Rotationsfrequenzen zu haben scheint.

Diese nicht voraussehbaren Resultate legten den Gedanken nahe, dass der Cage-Stoff 2-Nitrosobenzaldehyd in direkten Kontakt mit den Spheroiden tritt und deren ziliäre Aktivität einschränkt oder eventuell schädigende Wirkungen auf die Zilien selbst besitzt.

Im Anschluss daran entstand die Forderung, den bisherigen Versuchen noch eine weitere Versuchsserie mit dem isolierten Cage-Stoff anzuschließen. Das Problem bei der Durchführung dieser Idee lag darin, dass es sich bei dem Abspaltungsprodukt 2-Nitrosobenzaldehyd des Caged-Isoproterenols um eine flüchtige Verbindung handelt, die nicht als isolierter Stoff zur Verfügung steht.

Mehre Möglichkeiten der erneuten Versuchsdurchführung standen zur Diskussion:

- Die Durchführung einer Versuchsreihe mit Isoproterenol und einem anderen Cage-Stoff. Dies war jedoch nicht realisierbar, da eine derartige Verbindung nicht zur Verfügung stand.

- Start von neuen Versuchsreihen mit anderen Caged-Produkten, welche ebenfalls 2-Nitrosobenzaldehyd als Caging-Gruppe besitzen und deren Wirkstoff ebenfalls β_2-sympathomimetische Wirkung besitzt. Aber auch derartige Verbindungen standen nicht zur Verfügung.
- Ansetzen einer Versuchsreihe mit einem Caged-Produkt, dessen Wirkstoff eine bekannte Wirkung auf Bronchialepithel hat und dessen Caging Gruppe auch 2-Nitrosobenzaldehyd ist. Diese Forderungen traf nur auf Caged-Propranolol, einen β-Blocker ohne intrinsische Aktivität zu. Dieser jedoch schied zur Durchführung erneuter Experimente ebenfalls aus, da Propranolol erwiesenermaßen die ziliäre Schlagfrequenz negativ beeinflusst. Dies hätte bedeutet, dass eine sichere Zuordnung des zu erwartenden Effekts der Rotationsfrequenzminderung weder dem Propranolol noch dem 2-Nitrosobenzaldehyd möglich gewesen wäre.
- Als letzte Alternative stand die Suche nach einem Stoff, welcher der Caging-Gruppe 2-Nitrosobenzaldehyd vom chemischen Verhalten und chemischen Aufbau her sehr ähnlich ist. Im Laufe unserer Recherchen kristallisierte sich Nitrobenzaldehyd als für unsere Zwecke am besten geeignete Substanz heraus.

Diese Überlegungen führten zu unserer Entscheidung eine weitere Versuchsreihe mit dem Wirkstoff Nitrobenzaldehyd durchzuführen.

4.3.4. Ergebnisse der Versuchsgruppen mit Nitrobenzaldehyd

Die Versuche mit Nitrobenzaldehyd wurden in der in 2.5.2.7. beschriebenen Weise ohne Adaptationszeit durchgeführt und ausgewertet. Die Rotationsfrequenzen der Spheroide nahmen in beiden Versuchsgruppen VII und VIII (Nitrobenzaldehyd der Konzentration 10^{-3} bzw. 10^{-4} mol/l) von Beginn der Experimente bis zu deren Abschluss kontinuierlich ab und waren in beiden Konzentrationen ab dem Zeitpunkt t = 5 Minuten statistisch nachweisbar (vgl. Abb. 13a bis b). Diese Beobachtungen bestätigten die Vermutung, dass Nitrobenzaldehyd eine stark zytotoxische Wirkung auf respiratorische Epithelien ausübt.

Eine zweite interessante Beobachtung war, dass es bei längeren Inkubationszeiten (> 30 Minuten) zu einem irreversiblen Stillstand der Spheroide in der Versuchslösung kam. Die ziliäre

Tätigkeit der Spheroide setzte nach Versuchsende, mehrmaligem Waschen mit BEGM und erneuter Inkubation im Brutschrank nicht wieder ein. Daraus zogen wir den Schluss, dass es zu einer irreversiblen Schädigung der Zilien durch Nitrobenzaldehyd kam.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zielsetzung der Arbeit war es zu untersuchen, ob die Messung der Rotationsfrequenzen an humanen Bronchialepithel-Spheroide in pharmakologischen Versuchen, eine Aussage über die ziliäre Funktion des bronchorespiratorischen Epithels zulässt. Die Stimulierbarkeit der Rotationsfrequenzen von Bronchialepithel-Spheroiden wurde durch Gabe von β_2-sympathomimetischen Substanzen untersucht.

Spheroide sind kugel- oder keulenförmige Gebilde, die sich aus Bronchialepithelstreifen, die im eigenen Schleim kultiviert werden und sich innerhalb von 48 Stunden zusammenballen und um ihre eigene Achse rotieren. Die zilientragende Seite des gewonnenen respiratorischen Epithels kehrt sich nach außen und bildet die Oberfläche, während im Inneren ein flüssigkeitsgefüllter zystischer Hohlraum entsteht. Aufgrund des von Natur aus in eine Richtung weisenden Zilienschlages rotieren die Spheroide auf dem sie umgebenden Schleim um ihre eigene Achse, stellen aber ein durch mechanische Manipulation leicht zu beeinflussendes System dar. Diese Tatsache macht es notwendig den Spheroiden die zu untersuchende Wirksubstanz in einer Art und Weise zuzuführen, bei der es zu keiner mechanischen Beeinflussung der Rotationsfrequenzen kommen kann.

Caged-Produkte stellen hierfür die geeignete Stoffgruppe dar. Es handelt sich dabei um Moleküle, deren chemische Wirksamkeit durch angehängte Seitengruppen blockiert wird. Erst durch Bestrahlung mit UV-Licht wird das Caged-Produkt in seinen Aktivitätszustand überführt und ist so in der Lage, zu einem genau definierbaren Zeitpunkt und ohne mechanische Manipulationen Wirkungen an den Spheroiden auszulösen.

Die Wirkung des applizierten Caged-Produktes auf die Spheroide kann durch wiederholte Beobachtungen des Rotationsverhaltens und seiner Veränderungen innerhalb eines bestimmten Zeitraums beurteilt werden.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die mit Caged-Isoproterenol in den Konzentrationen 10^{-3} mol/l bis 10^{-5} mol/l (Versuchsgruppe I bis III) in Kontakt gebrachten Spheroide zeigten nach Freisetzung des Wirkstoffes Isoproterenol durch UV-Lichtbestrahlung alle eine anfängliche Steigerung ihrer Rotationsfrequenzen. Im weiteren Versuchsverlauf kam es jedoch konzentrationsabhängig entweder zu einem schnellen Abfall der Rotationsfrequenzen unter den Ausgangswert (siehe Abbildung 11a) oder zu einer Annäherung der Rotationsfrequenzen an den Ausgangswert (siehe Abbildung 11b und 11c).

   Die Wirkung einer β_2-sympathomimetischen Substanz auf die Rotationsfrequenzen kann durch Beobachtung des Rotationsverhaltens der Spheroide beurteilt werden und lässt auf Grund der Rotationsfrequenzänderungen einen indirekten Rückschluss auf die ziliäre Tätigkeit zu.
2. Vor Versuchsbeginn photolysiertes Isoproterenol der Konzentrationen 10^{-3} mol/l bis 10^{-5} mol/l (Versuchsgruppen IV bis VI), das ebenfalls in einer Versuchsreihe getestet wurde, verursachte bei allen Proben der jeweiligen Konzentrationen einen Abfall der Rotationsfrequenzen (vergleiche Abbildung 12a bis 12c).
3. Experimente mit Nitrobenzaldehyd, einem dem Abspaltungsprodukt 2-Nitrosobenz-aldehyd sehr ähnlichen Stoff, führten in den Konzentrationen 10^{-3} mol/l und 10^{-4} mol/l (Versuchsgruppen VII und VIII) zu einem statistisch signifikanten Abfall der Rotationsfrequenzen. Bei Inkubationszeiten von mehr als 30 Minuten kam es zu einem irreversiblen Stillstand der Rotation. Diese Ergebnisse zeigen, dass von einem toxischen Effekt auf die Spheroide durch das Seitenprodukt der Cage-Abspaltung ausgegangen werden muss.

Schlussfolgerung auf Grund dieser Ergebnisse :

Die Resultate zeigen, dass das Modell der Spheroide durch pharmakologische Substanzen beeinflussbar ist. Es handelt sich hier um eine einfach durchzuführende Methode zur Beurteilung der mukoziliären Funktion.

Ausblick auf zukünftige Fragestellungen:

- Weitere Versuche mit Spheroiden und sympathomimetischen Substanzen in einer Perfusionskammer könnten die beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der vergleichbaren Einsatzmöglichkeiten von Bronchialepithel-Spheroiden mit herkömmlich kultiviertem zilientragendem Bronchialepithel untermauern.
- Da es bei einigen Säugetierarten, eventuell auch bei humanen Proben, zu unterschiedlicher ziliärer Aktivität in den einzelnen Abschnitten des Tracheobronchialbaums kommt, müsste überprüft werden, ob die Eigenschaften von aus der Nasenschleimhaut gewonnenen Spheroiden mit jenen aus dem tieferen Tracheobronchialbaum stammend vergleichbar sind. In einer neuen Versuchsreihe sollte deswegen das Rotationsfrequenzverhalten von Spheroiden, welche sich aus Tracheal- oder Bronchialschleimhaut gebildet haben, mit solchen, die sich aus Nasenschleimhaut gebildet haben, verglichen werden. Für den Fall, dass sich in einer solchen Untersuchung keine wesentlichen Abweichungen der spheroidalen Rotationsfrequenzen ergeben, wäre es in Zukunft möglich, durch die Untersuchung von Bürstenabstrichen der Nasenschleimhaut qualifizierte Aussagen zur ziliären Funktion des gesamten respiratorischen Epithels zu machen. Dies würde für den einzelnen Patienten bedeuten, dass die Durchführung der Probengewinnung noch einfacher und weniger belastend als zum jetzigen Zeitpunkt wäre.
- Eine weitere interessante Fragestellung wäre, inwieweit sich Proben lungengesunder Patienten von Patientenproben mit bestimmten Erkrankungen des Respirationstraktes im Hinblick auf die spheroidalen Rotationsfrequenzen unterscheiden.
- Die Versuchsreihen könnten um andere pharmakologische Wirkstoffe und Umweltschadstoffe erweitert werden. Zum einen könnten die Ergebnisse aus solchen Versuchen mit Spheroiden dann mit Ergebnissen herkömmlicher Kultivierungsmethoden verglichen werden. Zum anderen stünden durch die relativ einfache Probengewinnung und Kultivierung Spheroide in größerer Menge zur Verfügung als bei herkömmlichen Kulturen.

6. Verwendete Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
BEGM	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität, München
MG	Molekular Gewicht in g/l
n	Anzahl
µ	Mikro / 10^{-6}
One Way RM ANOVA	One WAY Repeated Measures Analysis of Variance
RM ANOVA on Ranks	Friedman Repeated Messures Analysis of Variance on Ranks
R	Rotationsfrequenz
Stabw.	Standardabweichung
t	Zeit in Sekunden oder Minuten
TBC	Tuberkulose
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett

7. Literaturverzeichnis

1 Adams, S. R, Tsien, R. Y.: Controlling cell chemistry with caged compounds. Annu. Rev. Physiol. 55 (1993) 755-784.

2 Barnes, P. J.: Beta-adrenergic receptors and their regulation. Am. J. Crit. Care Med. 152 (1995) 838-860.

3 Bharat, J., Rubistein, I., Robbins, R. A., Leise, K. L.,. Sisson, J. H: Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 191 (1993) 83-88.

4 Boyle, W. A., Muralidharan, S., Maher, G. M., Nerbonne, J.: Vascular actions of „caged“ phenylephrine analogs depend on the structure and site of attachment of the 2-nitrobenzyl group. J. Photochem. and Photobiol 14 (1997) 233-244.

5 Bridges, M. A., Walker, D., Harris, R., Wilson, B., Davidson, G.: Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues. Biochem. Cell Biol. 1991 Feb-Mar; 69 (2-3): 102-8.

6 Clarke, S. W., Lopez-Vidriero, M. T.: The effect of beta 2 agonist on the activity of human bronchial cilia in vitro. Physiologist 25 (1982) 183-185.

7 Corssen, G., Allen, Ch.: Comparison of toxic effects of various local anesthetic drugs on human ciliated epithelium in vitro. Tex. Rep. Biol. & Med. 16 (1958) 194.

8 Corssen, G., Allen, Ch: Cultured human respiratory epithelium: its use in the comparison of the cytotoxic properties of local anesthetics. Anesthesiology 21 (1960) 237-243.

9 Mc Cray, J. A., Trentham, D.: Properties and uses of photoreactive caged compounds. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 18 (1989) 239-70.

10 Devalia, J. L., Sapsford, R. J., Rusznak, C, Toumbist, M. J., Davies, R. J.: The effects of Salmeterol and Salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells in vitro. Pulm. Pharmacol. 1992 Dec; 5 (4): 257-63.

11 Fabel, H.: Struktur und Funktion der Atemorgane. In: Fabel, H., Pneumologie. 2. Aufl. pp. 3-13. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1989.

12 Gamarra, F., Grundler, S., Wehling, M., Huber, R. M.: Etablierung eines Modells zur In-vitro-Untersuchung der mukoziliären Funktion am humanen Bronchialepithel: Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit. Atemw.-Lungenkrkh. 20 (1994) 378-379.

13 Hahn, H. L., Kleinschrot, D, Hansen, D.: Nicotine increases ciliary beat frequency by a direct effect on respiratory cilia. Clin. Investig. 1992 Mar-Apr; 70 (3-4): 244-51.

14 Held, M., Borde, A., Jany, B.: Humane tracheobronchiale Epithelzellen in serumfreier Primärkultur. Pneumologie 47 (1993) 391.

15 Helleday, R., Huberman, D., Blomberg, A., Stjernberg, N., Sandström, T.: Nitrogen dioxide exposure impairs the frequency of the mucociliary activity in healthy subjects. Eur. Respir. J. 1995 Oct; 8 (10) :1664-1668.

16 Hesse, H., Mizera, W., Kasparek, R., Konietzko, N.: Eine Methode zur Messung der Ziliarfrequenz aus Bürstenbiopsien der menschlichen Bronchialschleimhaut. Klin. Wochenschr. 1981 Feb 2; 59 (3): 135-40.

17 Horstmann, G., Iravani, J., Melville, G., Richter, H.: Influence of temperature and decreased water content of inspired air on the ciliated bronchial epithelium. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 1977 Jul-Aug; 84 (1-2): 124-31.

18 Huberman, D, Hakansson, C. H., Mercke, U., Toremalm, G.: Intra- and extracellular activity of ciliated cells. Acta Physiol. Scand. 1977 Jan;99(1):42-7.

19 Ingels, K. J., Meeuwsen, F., Graamans, K., Huizing, E.: Influence of sympathetic and parasympathetic substances in clinical concentrations on human nasal ciliary beat. Rhinology 1992 Sep; 30 (3): 149-59.

20 Ingels, K. J., Kortmann, M., Nijziel, M., Graamans, K., Huizing, E.: Factors influencing ciliary beat measurements. Rhinology 1991 Mar; 29 (1): 17-26.

21 de Jong, P. M., van Sterkenburg, M. A., Kempenaar, J. A., Mulder, A. A.: Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1994 Mar; 10 (3): 271-277.

22 Jorissen M, Bessems, A.: Normal ciliary beat frequency after ciliogenesis in nasal epithelial cells cultured sequentially as monolayer and in suspension. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 1995 Jan; 115 (1): 66-70.

23 Jorissen, M., Bessems, A.: Influence of culture duration and ciliogenesis on the relationship between ciliary beat frequency and temperature in nasal epithelial cells. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 1995; 252 (8): 451-454.

24 Jorissen, M., van Schueren, B., van Berghe, H.,.Cassiman, J.: Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. Eur. Respir. J. 1991 Feb; 4 (2): 210-217.

25 Jorissen, M., van Schueren, B., van Berghe, H., Cassiman, J.: The preservation and regeneration of cilia on human nasal epithelial cells cultured in vitro. Arch. Otorhinolaryngol. 1989; 246 (5): 308-314.

26 Kanthakumar, K., Cundell, D. R., Johnson, M., Wills, P. J., Taylor, G. W.,. Cole, P. J, Wilson, R.: Effect of Salmeterol on human nasal epithelial cell ciliary beating: inhibition of the ciliotoxin Pyocyanin. Br. J. Pharmacol. 1994 Jun; 112 (2): 493-498.

27 Kienast, K., Knorst, M., Riechelmann, H., Schellenberg, J., Müller-Quernheim, J., Ferlinz, R.: In-vitro Untersuchungen zur Schlagfrequenz ziliarer Zellverbände nach Kurzzeitexposition mit SO_2 und NO_2. Med. Klin. 1993 Sep 15; 88 (9): 520-524.

28 Konietzko, N., Nakhosteen, J. A., Mizera, W., Kasparek, R., Hesse, H.: Ciliary beat frequency of biopsy samples taken from normal persons and patients with various lung diseases. Chest 1981 Dec; 80 (6 Suppl): 855-857.

29 Lindberg, S. , Runer, T.: Method for in vivo measurement of mucociliary activity in the human nose. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. (1994) 103: 558-566.

30 Lopez-Vidriero, M. T., Jacobs, M., Clarke, S.: The effect of Isoprenaline on the ciliary activity of an in vitro preparation of rat trachea. Eur. J. Pharmacol. 1985 Jun 19; 112 (3): 429-432.

31 Lopez-Vidriero, M. T.: Airway mucus; production and composition. Chest 1981 Dec; 80 (6 Suppl): 799-804.

32 Lopez-Vidriero, M. T.: Respiratory mucus. Lancet. 1986 Aug 9;2 (8502): 339.

33 Marquardt, H.: Chemische Kanzerogene: Struktur und Wirkung. In: Marquardt, H., Schäfer, S.: Lehrbuch der Toxikologie. 1. Aufl. pp. 495-503.Wissenschaftsverlag, Mannheim-Leipzig-Wien-Zürich 1994.

34 Mercke, U., Hakansson, C. H., Toremalm, N. G.: The influence of temperature on mucociliary activity. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 78 (1976): 444-450.

35 Mercke, U., Toremalm, N. G.: Air humidity and mucociliary activity. Ann. Otol. 85 (1976): 32-37.

36 Molecular Probes: Product information Sheet. Photoactivatable („caged“) Probes. Technical Assistance, Customer Services. MP 1037 08/19/94.

37 Muralidharan, S., Nerbonne, J.: Photolabile „caged“ adrenergic receptor agonists and related model compounds. J. Photochem. and Photobiol. 27 (1995): 123-137.

38 Muralidharan, S., Mahler, M. G., Boyle, W., Nerbonne, J.: „Caged“ phenylephrine: Development and application to probe the mechanism of α-receptor-mediated vasoconstriction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993): 5199-5203.

39 Olseni, L., Wollmer, P.: Immediate effects of ethanol on mucociliary clearance in healthy men. Respiration 1992; 59 (3) :151-154.

40 Panzer, B., Deitmer, T., Scheffler, R.: Untersuchungen der ziliaren Motilität bei Allergikern und Nicht-Allergikern unter Zugabe von inhalativen Allergenen. In: Mösges, Schlöndorff: Topische Therapie der allergischen Rhinitis. Biermann Verlag FRG:pp 31-34.

41 Pedersen, P. S., Frederiksen O., Holstein-Rathlou, N., Larsen, P., Qvortrup, K.: Ion transport in epithelial spheroids derived from human airway cells. Am. J. Physiol. 1999 Jan; 276 (1 Pt 1): L75-80.

42 Promo-Cell: Bronchial Epithelial Cell Growth Medium. Customer Services. PromoCell GmbH. 1998 Heidelberg

43 Rautiainen, M., Matsune, S., Sakamoto, K., Hanamure, Y., Ohyama, M.: Ciliary beat of cultured human respiratory cells studied with differential interference microscope and high speed video system. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 112 (1992): 845-851.

44 Rautiainen, M., Matsune, S., Yoshitsugu, M, Ohyama, M.: Degeneration of human respiratory cell ciliary beat in monolayer cell cultures. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 1993; 250 (2): 97-100.

45 Richter, E.: Aromatische Amine. In: Marquardt, H., Schäfer, S.: Lehrbuch der Toxikologie. 1. Aufl. pp. 495-503. Wissenschaftsverlag, Mannheim-Leipzig-Wien-Zürich 1994.

46 Robson, A. M.,. Smallman, L. A, Drake-Lee, A. B.: Factors affecting ciliary function in vitro: a preliminary study. Clin. Otolaryngol. 17 (1992): 125-129.

47 Rusznak C, Sapsford, R. J., Devalia, J. L, Davies, R. J.: Circadian rhythms in ciliary beat frequency of human bronchial epithelial cells, in vitro. Respir. Med. 1994 Jul; 88 (6): 461-463.

48 Rusznak, C., Sapsford, R. J., Devalia, J., Davies, R. J.: Influence of salbutamol and salmetrol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells. Thorax 47 (1992) 782P.

49 Short Technical Reports: Photoactivation of Caged Compounds in Single Living Cells: An Application to the Study of Cell Locomotion. BioTechniques 23:268-274 (1997)

50 Sigma-Aldrich: Product Description. Dimethylsulfoxide. Technical Assistance, Customer Services 1998.

51 Sigma-Aldrich: Product Description. Nitrobenzaldehyde. Technical Assistance, Customer Services 1998.

52 Sigma-Aldrich: Product Description. Isoproterenol. Technical Assistance, Customer Services 1998.

53 Starke, K., Palm, D.: Pharmakologie adrenerger und noradrenerger Systeme. In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K: Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl. pp. 157-164. Wissenschaftsverlag, Mannheim-Leipzig 1993.

54 Tamaoki, J., Chiyotani, A., Sakai, N., Konno, K.: Stimulation of ciliary motility mediated by atypical ss-adrenoceptor in canine bronchial epithelium. Life Sci. Vol 53 (1993): 1509-1515.

55 Thomas, A., Petro, W., Konietzko, N.: Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmik der Schlagfrequenz menschlicher Nasenzilien bei Lungengesunden und Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung. Einschließlich der adrenergen Stimulation durch Terbutalin. Pneumologie. 1993 Sep; 47 (9): 526-530.

56 Wanner, A, Sielczak, M., Mella, J., Abraham, W.: Ciliary responsiveness in allergic and nonallergic airways. J. Appl. Physiol. 1986 Jun; 60 (6): 1967-1971.

57 Wanner, A., Salathe, M., O´Riordan: Mucociliary clearance in the airways. Am. J. Respir. Crit Care Med. 1996 Dec;154(6 Pt 1):1868-902.

58 Zuniga, A., Burdach, R., Rubio, S.: Dimethyl sulfoxide therapy in bronchiolitis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975 Jan 27; 243: 460-467.

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor R. M. Huber Leiter der Pulmonologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das zur Verfügung gestellte Thema.

Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. F. Gamarra für die Betreuung dieser Arbeit und seine Unterstützung bei Fragen und Problemen bedanken.

Ein großes Dankeschön mochte ich auch an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labors richten, die immer bereit waren mich zu unterstützen und mir bei Schwierigkeiten mit Rat und Tat zur Seite standen

9. Lebenslauf

Zur Person	Ingrid Stocker, geboren am 21.01.69 in München Tulbeckstr.51, 80339 München, Tel.: 089/ 54072976 verheiratet; ein Sohn, eine Tochter
Schule	1979 – 1985 Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Icking; Abschluss: Oberstufenreife
Ausbildung	1985 – 1988 Ausbildung zur Kaminkehrerin bei Fa. Fischer in München; Abschluss: Gesellenbrief
Zweiter Bildungsweg	1988 – 1990 Berufsoberschule Technik in München; Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife 1990 – 1991 Französischkurs am Institut Francais; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium	1991 – 1999 Medizinstudium an der LMU München WS 1991 bis SS 1999, davon zwei Semester Babypause
Praktisches Jahr	Chirurgie**:** Kreiskrankenhaus Starnberg. Gynäkologie**:** Kreiskrankenhaus Starnberg Innere Medizin**:** Klinikum Großhadern der LMU München, Medizinische Klinik III
Beruf	AIP in der Praxis Dr. Stumpfe