

**Morphologische und immunologische Beschreibung
der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B und
vergleichende Messung der ziliären Schlagfrequenz
in verschiedenen Modellen unter Verwendung
von Testsubstanzen**

Corinna Böckenholt

2010

Pharmakologie und Toxikologie

**Morphologische und immunologische Beschreibung
der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B und
vergleichende Messung der ziliären Schlagfrequenz
in verschiedenen Modellen unter Verwendung
von Testsubstanzen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Corinna Böckenholt

aus Hamm

2010

Dekan: Prof. Dr. Andreas Hensel
Erster Gutachter: Prof. Dr. Eugen J. Verspohl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmidt

Tag der Disputation: 12.04.2010
Tag der Promotion: 12.04.2010

„Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit“

Albert Einstein

MEINER FAMILIE UND MEINEN FREUNDEN

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	Anatomie des menschlichen Atemtraktes	1
1.2	Mukoziliäres Transportsystem	4
1.3	Respiratorisches Sekret	5
1.4	Flimmerepithel	6
1.4.1	Struktur und Funktion der Zilien	7
1.4.2	Mikrovilli	9
1.5	Immunologie des Bronchialepithels	10
1.5.1	RANTES	11
1.6	Beeinflussung des Bronchialepithels durch Wirkstoffe	12
1.6.1	Salbutamol	12
1.6.2	Isoprenalin	13
1.6.3	Silymarin	14
1.6.4	Harpagosid	16
1.6.5	Xylometazolin	17
1.6.6	Benzalkoniumchlorid	18
1.6.7	Thymol	20
1.6.8	Myrtol	21
1.6.9	Ibudilast	22
1.6.10	Losartan	23
1.6.11	Vitamin D ₃	24
1.6.12	Aspecton®	25

1.7	Zielsetzung	26
2	<u>Material</u>	<u>28</u>
2.1	BEAS-2B Zelllinie	28
2.2	Rattentrachea-Explantate	29
2.3	Schweinetracheen	30
2.4	Chemikalien und Geräte	30
2.4.1	BEAS-2B Zellkultur	30
2.4.2	RANTES-ELISA	32
2.4.3	Dot Blot	34
2.4.4	CBF-Messung an isolierten Axonemen	36
2.4.5	CBF-Messung an Trachea-Explantaten	37
2.4.6	Fluoreszenzmikroskopie	38
2.4.7	Primärkultur von Epithelzellen der Schweinetrachea	38
2.4.8	Transmissionselektronenmikroskopie	40
3	<u>Tiere</u>	<u>41</u>
4	<u>Methoden</u>	<u>42</u>
4.1	BEAS-2B Zellen	42
4.1.1	Untersuchungen zur Zytotoxizität: Messung der LDH im Überstand	42
4.1.2	Immunologische Untersuchungen: Messung der RANTES-Konzentration im Überstand	44
4.1.3	Nachweis von Zilien auf den BEAS-2B Zellen	46
4.1.3.1	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der BEAS-2B Zellen	46

4.1.3.2	Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Dot Blot	47
4.1.3.3	Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen und der Schweinetrachea-Primärkultur mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie	49
4.1.3.4	Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein mittels Transmissionselektronenmikroskopie	50
4.2	Messung der CBF an Trachea-Ringen	52
4.3	Primärkultur von Epithelzellen der Schweinetrachea	54
4.4	CBF-Messung an isolierten Axonemen	56
4.5	EpiAirway™ Einsätze	57
4.5.1	Aufnahmen der auf den EpiAirway™ gewachsenen primären Bronchialepithel-Humanzellen	58
4.6	Statistik	59
5	<u>Ergebnisse</u>	60
5.1	BEAS-2B Zellen	60
5.1.1	Immunologische Untersuchungen: Messung der RANTES-Konzentration im Überstand	60
5.1.2	Untersuchungen zur Zytotoxizität: Messung der LDH im Überstand	70
5.1.3	Nachweis von Zilien auf den BEAS-2B Zellen	80
5.1.3.1	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der BEAS-2B Zellen	81
5.1.3.2	Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Dot Blot	85
5.1.3.3	Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Immunfluoreszenz	87

5.1.3.4	Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie	89
5.2	Messung der CBF an Trachea-Ringen	92
5.3	Weitere Modelle zur Messung der Ciliary Beat Frequency	101
5.3.1	Primärkultur von Epithelzellen der Schweinetrachea	101
5.3.2	CBF-Messung an isolierten Axonemen	104
5.3.3	EpiAirway TM Membranen	106
5.3.4	Vergleich der verschiedenen CBF-Messmethoden	110
5.4	Aufnahmen der auf den EpiAirwayTM gewachsenen primären Bronchialepithel-Humanzellen	112
<u>6</u>	<u>Diskussion</u>	<u>114</u>
6.1	Morphologische Charakterisierung der BEAS-2B Zellen	114
6.2	Vergleich der Methoden zur CBF-Messung	116
6.3	Immunologische und zytotoxische Untersuchungen	121
6.4	CBF-Messungen am Rattentrachea-Explantat	128
6.5	Biologische Relevanz der eingesetzten Substanzkonzentrationen	132
6.6	Ausblick	135
<u>7</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>137</u>
<u>8</u>	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>143</u>
<u>9</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>146</u>

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
ALI	Air-Liquid-Interface
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASM	airway smooth muscle cells
ATP	Adenosintriphosphat
BEAS-2B Zellen	Bronchialepithelzelllinie
BioStoffV	Biostoffverordnung
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBF	Ciliary Beat Frequency
CMC	kritische mizellare Konzentration
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAL4	Dynein light chain 4, axonemal
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EuAB	Europäisches Arzneibuch
FCS	fötales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
g	Erdbeschleunigung
G _s	stimulierendes Guaninnucleotid-bindendes Protein
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN- γ	Interferon- γ
LDH	Laktatdehydrogenase
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MIP-1 α / β	macrophage inflammatory protein
MLCK	Myosin-Leichtkettenkinase
NF κ B	nuclear factor-kappa B
PBS	phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PIPES	Piperazin-1, 4-(2-ethan-sulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A

RANTES	regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted
REM	Rasterelektronenmikroskop
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPP	Sörensen´s Phosphatpuffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

Hauptaufgabe des Bronchialepithels *in vivo* ist neben der immunologischen Abwehr die Reinigung und die mukoziliäre Clearance der Atemwege unter anderem durch die Zilienzellen und der damit verbundenen Ciliary Beat Frequency (CBF). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B im Hinblick auf ihre immunologischen Fähigkeiten sowie die morphologischen Eigenschaften näher charakterisiert werden. In vielen vorangegangenen Arbeiten wurde die Zelllinie aufgrund ihrer Eigenschaften bereits als Modell für immunologische Fragestellungen verwendet^[1-4]. Auch in dieser Arbeit werden derartige Untersuchungen durchgeführt. Des Weiteren wird untersucht, ob die BEAS-2B Zellen auch für Messungen der CBF geeignet oder gar nützlich sind. Die Ergebnisse sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit die BEAS-2B Zellen dem Bronchialepithel *in vivo* ähnlich sind. Ein weiterer Teil dieser Arbeit umfasst die Charakterisierung und Bewertung sowie den Vergleich und die Etablierung weiterer Ersatzmethoden für die Messung der CBF.

Da der Schwerpunkt dabei auf dem Atemtrakt liegt, wird im Folgenden ein kurzer Überblick über dessen Anatomie und Funktionen gegeben. Außerdem werden die verwendeten und auf ihre Wirkung hin untersuchten Substanzen bzw. Arzneistoffe näher charakterisiert.

1.1 Anatomie des menschlichen Atemtraktes

Den Atemtrakt des Menschen kann man funktionell in die oberen und unteren luftleitenden Atemwege sowie die gasaustauschenden Abschnitte unterteilen. Ähnlich wie die Haut sind sie zusammen mit der Lunge äußeren Einflüssen und den damit verbundenen Umwelttoxinen direkt ausgesetzt. Als erstes kommen die oberen Abschnitte der luftleitenden Atemwege mit ihnen in Kontakt. Dazu zählen neben der Nasenhöhle bzw. -nebenhöhle die Mundhöhle sowie der Rachen (Pharynx)^[5, 6].

Zu den luftleitenden unteren Atemwegen gehören der Kehlkopf (Larynx), die Luftröhre (Trachea), die beiden Hauptbronchien (Bronchus principales dexter und sinister) sowie die Bronchiolen, die unterteilt werden in Endbronchien (Bronchioli terminales) und Respiratorische Bronchiolen (Bronchioli respiratorii). Der aus drei

großen Knorpeln geformte Larynx verschließt beim Schlucken den Kehldeckel, so dass der Eintritt von Speisestücken in die Luftröhre vermieden wird. Außerdem dient er der Stimmbildung. Der Kehlkopfeingang bildet die Grenze zwischen den oberen und den unteren Atemwegen^[7].

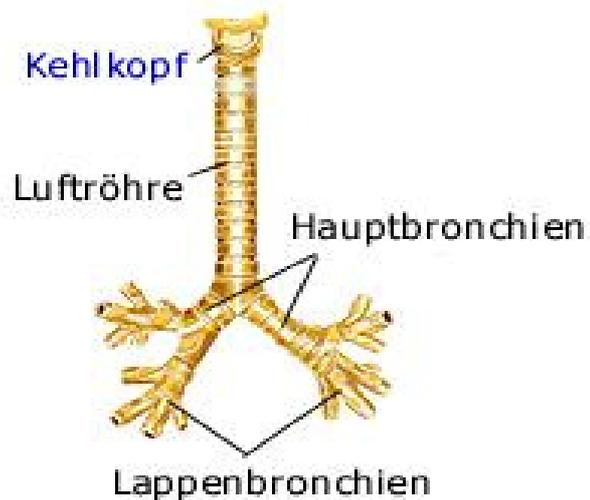


Abb. 1.1: Untere Atemwege^[8]

Die Trachea eines erwachsenen Menschen ist ca. 10-12 cm lang. Sie beginnt am Ringknorpel (Cartilago cricoidea) des Larynx und endet an der Bifurcatio tracheae, wo sie sich in zwei Hauptbronchien (Bronchi principales) aufspaltet und die beiden Lungenhälften mit Sauerstoff versorgt. Aufgebaut ist sie aus 16-20 elastischen und hufeisenförmigen Spangen aus hyalinem Knorpel (Cartilago trachealis), dazwischen liegender glatter Muskulatur, Binde- und Fettgewebe sowie Blutgefäßen. Die Knorpel dienen vor allem der Stabilisierung und verhindern so den Kollaps der Lumina. Da beim Schlucken die Trachea kurzfristig verlängert wird, ist es von Vorteil, dass die einzelnen Knorpelspannen scherengitterartig durch Bindegewebe und Kollagen verbunden sind. Die Trachea ist dadurch ungefähr 2-3 cm dehnbar. Die glatte Muskulatur kann über den Durchmesser der Luftwege die Luftverteilung regulieren. Die Trachea ist wie die anderen Bestandteile der luftleitenden Atemwege an der Innenseite mit einem Flimmerepithel ausgekleidet (siehe Abb. 1.2).

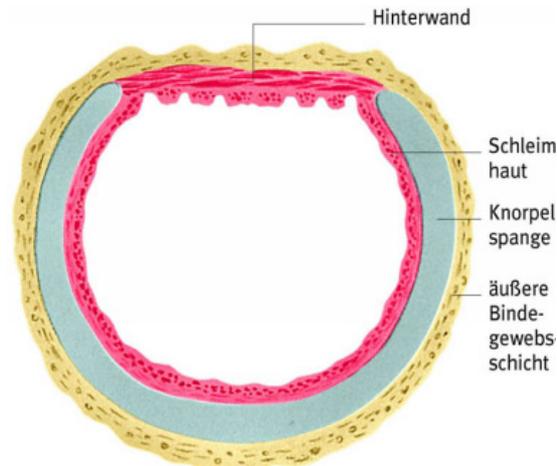


Abb. 1.2: Querschnitt durch die Trachea^[9]

Das Epithel besteht aus bis zu sechs verschiedenen Zelltypen. Typisch für das respiratorische Epithel ist das Vorhandensein von Becherzellen. Zusammen mit den submukösen Zellen bilden sie einen Schleim, der den Abtransport von Staub und anderen Fremdstoffen erleichtert. Außerdem tragen Flimmerzellen an ihrer apikalen Seite Zilien, die für den Abtransport von Schleim und Fremdstoffen oralwärts zuständig sind^[5, 6, 10].

Des Weiteren sind Epithelzellen mit Mikrovilli-Besatz, Sinneszellen, endokrine Zellen und Basalzellen vorhanden. In den verschiedenen Abschnitten der Luftwege können charakteristische Unterschiede des Epithels beobachtet werden. Zum einen nimmt die Höhe des Epithels entlang des Bronchialbaums ab, zum anderen ändert sich auch der Anteil der verschiedenen Zelltypen. Die Häufigkeit zilientragender Flimmerzellen sowie der Becherzellen nimmt entlang der Atemwege stetig ab^[11]. Während sie in der Trachea die beiden häufigsten Zellarten sind, fehlen die Becherzellen ab den Bronchioli terminales vollständig. Zilientragende Flimmerzellen findet man dagegen in geringerem Anteil auch noch in den unteren Aufzweigungen des Bronchialbaums. Auf diese Weise kann einer Schleimanhäufung in den Bronchiolen vorgebeugt werden^[7].

Die nachgeschalteten Bronchioli respiratorii weisen im Gegensatz dazu zunehmend Lungenbläschen (Alveolen) auf. Sie bilden den Endabschnitt der luftleitenden Atemwege und münden schließlich in die Alveolargänge mit den sie umgebenden Alveolen^[12] und somit in den gasaustauschenden Abschnitt des Atemtraktes. In den Alveolen, die hauptsächlich dem Gasaustausch dienen, befinden sich u. a. die

Clarazellen. Die Hauptaufgabe dieser Zellart besteht in der Surfactantproduktion. Dies ist ein oberflächenaktives Substanzgemisch, das in den Alveolen anstelle des Flimmerepithels Reinigungs- und Transportfunktionen übernimmt^[11]. Außerdem kann es über eine Reduktion der Oberflächenspannung eine Kollabierung der Alveolen verhindern^[12].

Neben der angenommenen rein mechanischen Funktion kann dem mehrreihigen Bronchialepithel auch eine immunologische Funktion zugeordnet werden. Es produziert unter anderem eine Reihe von Chemokinen und Zytokinen, wodurch eingeatmete Pathogene direkt beim ersten Kontakt bekämpft werden können^[13, 14].

Die Innervation der Atemwege erfolgt über das autonome Nervensystem, das sowohl sympathisch als auch parasympathisch gesteuert wird. Über β_2 -Rezeptoren der glatten Muskulatur wird nach Sympathikusaktivierung eine Bronchodilatation vermittelt. Der Einfluss des Parasympathikus wird über muskarinische Rezeptoren gesteuert und führt nach deren Aktivierung zu einer Bronchokonstriktion.

1.2 Mukoziliäres Transportsystem

Im Bereich der oberen Atemwege und des Tracheobronchialbaumes ist der wichtigste Eliminationsmechanismus das mukoziliäre Transportsystem. Am respiratorischen Sekret abgeschiedene Schadstoffe werden in der Trachea mit einer Geschwindigkeit von etwa 7-24 mm/min in Richtung Pharynx transportiert und vom Larynx aus verschluckt oder abgehustet. Ausschlaggebend für das mukoziliäre Transportsystem ist die zeitversetzte Schlagaktivität der Zilien respiratorischer Epithelien. Die Zilien knicken beim Erholungsschlag seitlich leicht ab, wodurch sie diese Bewegung vollständig in der Gel-Sol-Phase durchführen können (siehe Kapitel 1.3). Beim Wirkschlag strecken sich die Zilien, greifen mit ihren Spitzen in die oberflächliche Gel-Phase und schieben diese mit allen daraufgelagerten Fremd- und Schmutzpartikeln in Richtung Pharynx (siehe Abb. 1.3). Im unteren Teil der luftleitenden Atemwege übernehmen die Alveolen mit der Surfactantproduktion die Aufgabe der mukoziliären Clearance. Die Surfactantschicht breitet sich in Richtung niedrigerer Konzentrationen aus, so dass ein oralwärts gerichteter Transport gewährleistet ist^[12]. Die Reinigung des gesamten Bronchialsystems ist somit von der

Menge und Zusammensetzung des Sekretes sowie von der Unversehrtheit des Flimmerepithels und der Schlagfrequenz der Zilien abhängig^[5, 15].

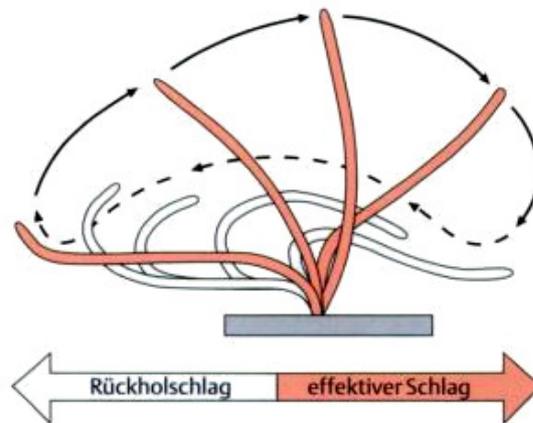


Abb. 1.3: Koordinierter Zilienschlag

1.3 Respiratorisches Sekret

Respiratorisches Sekret dient als mechanische Barriere. Als Säure-/Basepuffer kann es zahlreiche exogene und endogene Noxen abwehren.

Es enthält Wasser (95 %), Elektrolyte (1 %), Proteine (1 %), Phospholipide (u. a. Surfactant) und Carbohydrate (ca. 1 %)^[16, 17].

Respiratorisches Sekret bildet eine 10-16 µm dicke Schicht über den Geweben der Atemwege und besteht aus zwei Lagen^[18]. Die untere niedrigviskose periziliäre Flüssigkeitsschicht (Sol-Phase) wird vorrangig durch transepithelialen Ionen- und Wassertransport von Flimmerepithelien und Bürstensaumzellen gebildet^[19].

Die im Gegensatz dazu oberflächliche hochviskose Gel-Phase (mucus layer) weist einen hohen Anteil vernetzter Glykoproteine (Muzine) auf. Sie werden vorrangig von den submukösen Drüsen und den Becherzellen gebildet, die apikal Vesikel mit polysaccharidhaltigem Sekret enthalten und somit die Viskosität des Schleims steuern. Der gebildete Schleim dient in den Atemwegen als sogenannter „Nassfilter“, der auf seiner Oberfläche Stäube und anderen Schmutz sowie gasförmige Bestandteile aus der Atemluft festhält. In der Trachea beträgt die Dicke des gebildeten Schleimfilms ungefähr 10 µm.

1.4 Flimmerepithel

Die luftleitenden Atemwege sind mit dem Flimmerepithel ausgekleidet. Es setzt sich aus verschiedenen Zellarten zusammen und erfüllt unter anderem die wichtige Aufgabe der mukoziliären Clearance. Das bedeutet, dass das Flimmerepithel zum einen für die Bildung des schützenden Schleims und zum anderen für dessen oralwärts gerichteten Transport verantwortlich ist. Zudem müssen Staub und weiterer in die Atemwege gelangter Schmutz wieder abtransportiert werden, um anschließend abgehustet werden zu können. Die Zilienzellen, die in den oberen Atemwegen, in der Trachea und in den Bronchien den größten Anteil der Zellen ausmachen, besitzen auf ihrer Oberfläche ungefähr 200-300 Zilien/Zelle, die durch einen peitschenförmigen, kontrollierten und energieverbrauchenden Schlag Fremdstoffe und Schleim abtransportieren. Dieser Schleim, der in einer schützenden Sol-Gel-Schicht über den Zilien liegt, wird von den Becherzellen produziert^[6, 7].

Die Dicke und der Zilienbesatz des Flimmerepithels nimmt vom Kehlkopf bis zu den unteren Atemwegen kontinuierlich ab, bis in den Bronchiolen, den kleinsten Verästelungen in den Lungen, keine Zilien mehr vorhanden sind. Durch ein Basalkörperchen sind die Zilien mit der Zelle verbunden. Die kontinuierlichen, peitschenförmigen Zilienbewegungen sind Ergebnis eines energieverbrauchenden Prozesses (siehe Kapitel 1.4.1).

Eine angeborene oder erworbene Zilienfunktionsstörung ist Grundlage zahlreicher Krankheiten^[20-23]. Zu den bekanntesten zählt die primäre Ziliendyskinesie, mit zum Teil beträchtlichen Abnormalitäten bzw. mangelhafter Anlage der Dyneinarme^[24-28] und damit eingeschränkter mukoziliärer Clearance. Bei der Mukoviszidose (Zystische Fibrose) sind die Zilien in Bronchien und Nase zwar strukturell und funktionell normal, dennoch kommt es aufgrund einer veränderten Schleimzusammensetzung und einer entzündungsbedingten Zerstörung des Bronchialepithels zu einem gestörten Schleimtransport^[29-31].

Weiter besteht eine Vielzahl anderer Lungenerkrankungen und inhalativer Schädigungsmöglichkeiten, die zu einem Verlust der normalen Zilienfunktion führen. Hierzu gehören Infektionen der oberen Atemwege, das Krankheitsbild des Asthma bronchiale, mechanische Traumen wie Intubation, Bronchoskopie sowie längere Beatmung mit reinem Sauerstoff. Auch mangelhafte Anfeuchtung bzw. zu kalte Atemluft, z. B. durch fehlende Nasenatmung, kann zur Zilienschädigung im

Bronchialbereich führen. Ebenfalls führt inhalatives Rauchen innerhalb von 20-30 Minuten zu einem Verlust der Zilienaktivität^[5, 32]. Eine Störung oder Verlust der Zilienaktivität kann teilweise aber auch durch andere Reinigungsmechanismen, wie das Husten, ersetzt werden^[5].

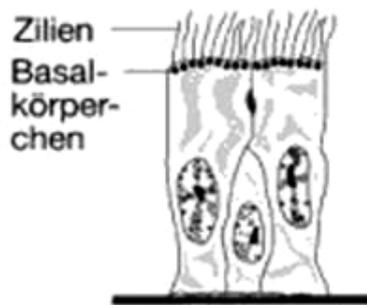


Abb.1.4: Schematische Zeichnung eines Flimmerepithels^[33]

1.4.1 Struktur und Funktion der Zilien

Zilien, auch Kinozilien genannt, sind ca. 6-12 μm lang und haben einen Durchmesser von etwa 0,3 μm . Im Gegensatz zu den Mikrovilli, die für die Oberflächenvergrößerung zuständig sind, sind sie länger und dicker. Im Flimmerepithel stehen die Zilien immer in Gruppen zusammen und bilden so einen Zilienrasen. Geißeln, die in ihrem Feinbau den Zilien durchaus ähneln, kommen im Gegensatz dazu ausschließlich einzeln vor. Sie dienen der Fortbewegung einzelner Lebewesen. Durch ATP-Verbrauch sind Zilien aktiv beweglich und in den Atemwegen für den Transport von Flüssigkeiten und Partikeln zuständig. Sie schlagen bei einem erwachsenen und gesunden Menschen mit ca. 10-15 Herz, das bedeutet mit 600-900 Schlägen pro Minute. Die Schlagkraft der Zilien reicht zusammen mit der Adhäsivität des mukösen Schleims aus, um Partikel bis zu einer Größe von 0,5 mm Durchmesser zu transportieren. Dieses System ist somit äußerst nützlich bei der Abwehr von Bakterien und eingeatmeter Fremdstoffe. Solange das Flimmerepithel und das Zusammenspiel mit dem Schleim nicht geschädigt sind, können sich Bakterien nicht festsetzen und nicht durch das Epithel dringen. Eine andere Abwehr von Bakterien besteht aus den im Schleim enthaltenen neutrophilen

Granulozyten und Makrophagen, die alleine oder im Zusammenwirken mit Immunglobulinen die Bakterien abtöten.

Ein weiterer Wirkort der Zilien stellt neben dem respiratorischen Epithel der Trachea und Bronchien das auskleidende Epithel der Eileiter (Tuba uterina) dar. Dort dienen sie vor allem dem gerichteten Transport der Eizelle zur Gebärmutter (Uterus). Neben den bereits in Kapitel 1.4 genannten Erkrankungen, die auf einen Defekt der Zilien im respiratorischen Epithel zurückzuführen sind, kann ein möglicher Grund für die Infertilität der Frau eine Zilienfunktionsstörung im Eileiter sein. Da allerdings auch Frauen mit immobilen Zilien, z. B. im Rahmen einer primären Ziliendyskinesie, schwanger werden können, ist der störungsfreie Ablauf der Zilienbewegungen anscheinend nicht ausschlaggebend für eine erfolgreiche Befruchtung^[34].

Jede Zilie ist in einem Basalkörperchen, auch Kinetosom genannt, im Epithel verankert. Charakteristisch für Zilien ist die Anordnung der Mikrotubuluspaare. Im Zilienschaft gruppieren sich neun Mikrotubuluspaare (DubleTTen) ringförmig um ein zentrales Tubuluspaar. Zusammen bilden sie das Axonem, den Achsenfaden. Ein typischer Querschnitt einer Zilie zeigt somit das charakteristische $9 \times 2 + 2$ Muster. Die äußeren Tubuluspaare bestehen dabei aus jeweils einem A- und B-Tubulus und besitzen eine gemeinsame Kontaktstelle. Vom A-Tubulus gehen dabei jeweils ein äußerer und innerer Dyneinarm aus, die eine ATPase-Aktivität besitzen und somit für die Beweglichkeit der gesamten Zilien verantwortlich sind. Der A-Tubulus des jeweiligen Tubuluspaares ist mit dem B-Tubulus des benachbarten Tubuluspaares durch eine Nexinbrücke verbunden (siehe Abb. 1.5). In Anwesenheit von ATP treten die Dyneinarme mit dem benachbarten Paar in Verbindung^[5, 7, 33] und sorgen zusammen mit den radiären Speichen, die zu den beiden zentralen Tubuli ausgerichtet sind, für ein Abknicken des Zilienschafts.

Neben dem axonemalen Dynein ist das Tubulin, das die Grundstruktur der Mikrotubuli bildet, ein weiteres essenzielles Protein der Axonemstruktur. Das Tubulin besteht aus einer α - und β -Untereinheit. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Zilienmarker zur Überprüfung der BEAS-2B Zelllinie im Hinblick auf das Vorhandensein von Zilien genutzt.

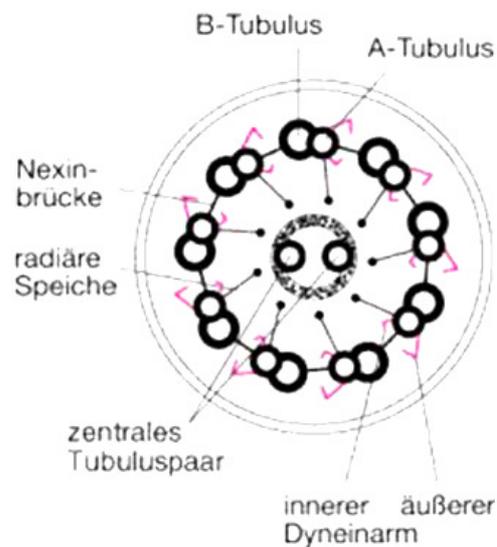


Abb. 1.5: Elektronenmikroskopischer Zilienquerschnitt^[33]

1.4.2 Mikrovilli

Im Gegensatz zu den Zilien dienen Mikrovilli als fingerförmige Ausstülpungen der Vergrößerung der Zelloberfläche. In großer Anzahl kommen sie im Dünndarm vor, wo sie eine Dicke von 100 nm und eine Länge von 2 nm besitzen. Aber auch im Bronchialepithel stellen sie eine häufige Struktur dar^[7]. Im Gegensatz zu den Zilien bestehen sie nicht aus Mikrotubuli, sondern aus längsverlaufenden Aktinfilamenten, die untereinander durch Fibrin- und Villinbrücken und durch laterale Verankerungsproteine mit der Plasmamembran verbunden sind. Mikrovilli stehen im Allgemeinen so dicht zusammen, dass sie im Lichtmikroskop als Bürstensaum wahrgenommen werden^[6, 7, 33].

Mit den Mikrovilli eng verwandte Strukturen sind die Stereozilien. Sie unterscheiden sich ebenso wie diese von den Kinozilien durch fehlende Mikrotubuli. Stattdessen sind auch sie aus Aktinfilamenten aufgebaut und besitzen ebenfalls keine Basalkörperchen. Im Vergleich zu den Mikrovilli sind sie jedoch meistens länger und sind häufig zu einem Schopf verklebt. Stereozilien kommen vor allem auf den Sinneszellen des Innenohres vor^[35].

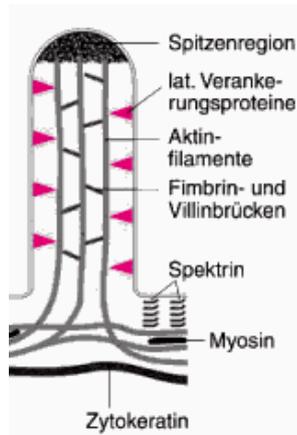


Abb. 1.6: Molekularbiologischer Aufbau eines Mikrovillus^[33]



Abb.1.7: Schematische Zeichnung eines Bürstensaums^[33]

1.5 Immunologie des Bronchialepithels

Neben der Reinigung der Atemwege von Staub, Schleim und anderen Schmutzpartikeln haben die Zellen des Bronchialepithels die Aufgabe der immunologischen Abwehr^[6, 11, 36]. Bei Eintritt von Bakterien oder Allergenen in die Atemwege werden unter anderem eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen im Flüssigkeitsfilm oder den Schleimplaques aktiviert. Diese sind in der Lage, alleine oder zusammen mit Immunglobulinen, vor allem dem IgA, sowie Komplement oder Lysozym, die Bakterien abzutöten. Durch dieses im Detail noch nicht nachvollzogene Zusammenspiel proinflammatorischer Peptide kann die Einwanderung und Rekrutierung weiterer Mediatoren und damit die pathogenetische Grundlage für spätere Entzündungsreaktionen verhindert werden. Zentrale Konsequenz einer entstehenden Entzündung wäre eine Schädigung des Bronchialepithels^[37-41]. Nachfolgend könnten exogene sowie endogene Noxen direkt die dadurch freiliegende Basalmembran schädigen und somit zu einer bronchialen Hyperreagibilität sowie zur Funktionsbeeinträchtigung der mukoziliären Clearance führen. Dies hätte wiederum eine weitere Zerstörung der lokalen immunologischen Abwehr- und Barrierefunktion des Bronchialepithels zur Folge^[42]. Das Bronchialsystem mit seinen vielfachen und aufeinander abgestimmten immunologischen Kompetenzen stellt somit eine erste komplexe Abwehr von Noxen

dar, welche es durch sinnvoll eingesetzte Therapeutika zu schützen und zu unterstützen gilt.

1.5.1 RANTES

RANTES (regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted) ist ein Chemokin und gehört zu der CCL5-Familie. Dabei steht das CC für eine der vier bekannten Chemokinfamilien, die im Unterschied zu den anderen chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen bzw. T-Zellen wirkt. Diese Nomenklatur wird im Fall eines Liganden um ein L, und im Fall eines Rezeptors durch ein R ergänzt. Durch die angehängte Ziffer wird das Chemokin benannt und kann einer Bezeichnung eindeutig zugewiesen werden.

RANTES wird von T-Zellen, vom Endothel und von Blutplättchen gebildet. Die Rezeptoren, an denen RANTES andockt, sind CCR1, CCR3 und CCR5 und befinden sich auf eosinophilen Granulozyten^[43, 44] bzw. Makrophagen und anderen Zellen des blutbildenden Systems. RANTES lockt, wie die CC-Chemokine MCP-1, MIP-1 α und - β , vor allem Monozyten, Eosinophile und T-Lymphozyten an. Allerdings wirkt RANTES nicht auf Neutrophile. Eosinophile Granulozyten wiederum können selbst unter bestimmten Umständen Chemokine wie RANTES, Eotaxin oder IL-8 sezernieren und sorgen auf diese Weise nicht nur für ihre eigene Akkumulation^[45], sondern auch für die anderer Zellen wie T-Lymphozyten, Monozyten und basophiler sowie neutrophiler Granulozyten. Da den eosinophilen Granulozyten eine bedeutende Rolle im Voranschreiten des Entzündungsgeschehen zugesprochen wird, kann u. a. das Symptom der bronchialen Hyperreagibilität damit erklärt werden^[46]. Die Aktivierung von RANTES führt darüber hinaus zur Invasion von T-Helferzellen^[47] und ebenso zu einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Eosinophilen^[42]. Das Chemokin nimmt somit einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf vieler Atemwegserkrankungen^[48, 49]. RANTES wird vermehrt von Patienten mit Asthma gebildet und ist direkt am weiteren Krankheitsverlauf beteiligt^[50].

Als Indiz für einen protektiven Effekt der betreffenden Substanzen am Bronchialepithel, sollen im Rahmen dieser Arbeit Substanzen und Wirkstoffe auf ihre

RANTES-reduzierenden Eigenschaften am Modell der BEAS-2B Zellen untersucht werden.

1.6 Beeinflussung des Bronchialepithels durch Wirkstoffe

Heutzutage stehen viele Arzneistoffe zur Verfügung, die das Bronchialepithel positiv beeinflussen können. Bei Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale wird mittels β_2 -Sympathomimetika eine Bronchodilatation hervorgerufen, um potenziell tödliche Atemwegsobstruktionen zu verhindern. Eine weitere positive Wirkung dieser Substanzklasse stellt die bereits von vielen Arbeitsgruppen gezeigte Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz dar^[51-54]. Im Rahmen dieser Arbeit sollen weitere Substanzen mit dem Potential der CBF-Erhöhung gefunden und dokumentiert werden. Diese Therapeutika könnten bei Atemwegserkrankungen die mukoziliäre Clearance günstig beeinflussen und somit den Abtransport von Viren, Bakterien und Schmutz beschleunigen. Des Weiteren sind Krankheitsbilder bekannt, wie die primäre Ziliendyskinesie, bei denen aufgrund verschiedener Ziliendefekte nur eine verminderte oder keine mukoziliäre Clearance möglich ist^[26-28]. Auch Patienten mit diesen Krankheitsbildern, bei denen die Zilienschlagfrequenz vermindert ist, könnten von Arzneistoffen profitieren, die die CBF erhöhen.

1.6.1 Salbutamol

Salbutamol wird als selektives β_2 -Sympathomimetikum eingesetzt. β_2 -Rezeptoren befinden sich sowohl an der Uterusmuskulatur als auch an der Bronchial- und Trachealmuskulatur^[55, 56]. Da die Stimulation der β_2 -Rezeptoren über ein G_s -Protein die Adenylylcyclase (AC) aktiviert, führt dies zu einer vermehrten Bildung von cAMP. Da cAMP in der glatten Muskulatur über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und einer Hemmung der Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK) zu einer Dilatation führt, wird Salbutamol zur Behandlung akuter und chronisch obstruktiver Atemwegserkrankungen als Bronchospasmolytikum eingesetzt. Die Applikation des Salbutamols kann inhalativ, oral sowie parenteral erfolgen.

Effekte, die darüber hinaus eine Erhöhung der CBF verursachen, konnten schon die Arbeitsgruppen Devalia *et al.* und Rusznak *et al.*^[51] nachweisen. Sie postulieren

einen Wirkungsmechanismus, der über die β_2 -Rezeptoren eine Erhöhung des intrazellulären Adenosinmonophosphat (AMP) und dadurch eine CBF-Erhöhung bedingt.

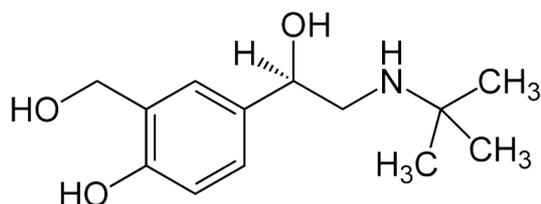


Abb. 1.8: Strukturformel des (R)-Salbutamols

Da der CBF-erhöhende Effekt des Salbutamols in mehreren Arbeiten bestätigt wurde, soll das β_2 -Sympathomimetikum im Folgenden dazu dienen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten und charakterisierten CBF-Modelle auf ihre Funktionalität und Richtigkeit zu überprüfen. Außerdem sollen die von der Arbeitsgruppe Hallsworth *et al.* an Primärzellen der glatten Atemwegsmuskulatur gezeigten RANTES-beeinflussenden Eigenschaften^[57] auch an den BEAS-2B Zellen überprüft werden. Um darüber hinaus membranschädigende Einflüsse des Salbutamols an den Zellen ausschließen zu können, wird ein Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt.

1.6.2 Isoprenalin

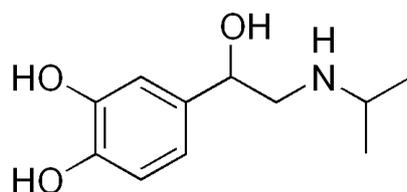


Abb. 1.9: Strukturformel des Isoprenalins

Mit Isoprenalin (Isoproterenol) steht seit Anfang der 1940er Jahre der erste selektive β -Rezeptor-Agonist zur Behandlung des Asthma bronchiale zur Verfügung.

Allerdings gehört er noch nicht der Generation der β_2 -selektiven Sympathomimetika an, da er an allen β -Rezeptoren agonistisch wirkt. Daraus resultiert als kardiovaskulärer Haupteffekt eine Senkung des peripheren Widerstandes, gefolgt von einem Abfall des diastolischen Blutdrucks und einem Anstieg des Herzminutenvolumens. Isoprenalin wirkt positiv inotrop und könnte im kardiovaskulären Notfall zur Herzfrequenzsteigerung appliziert werden. Auf die glatte Muskulatur wirkt Isoprenalin vasodilatierend. Am deutlichsten ausgeprägt ist diese Wirkung an der bronchialen- und der gastrointestinalen glatten Muskulatur^[58]. Eine mögliche Indikation des Isoprenalins wäre neben einer erwünschten Herzfrequenzerhöhung auch die Bronchodilatation der Atemwege bei Atemwegserkrankungen, wie z. B. dem Asthma. Allerdings stehen in der heutigen Therapie Substanzen zur Verfügung, die selektiv den β_2 -Rezeptor agonisieren und damit nicht die unerwünschten kardialen Wirkungen über den β_1 -Rezeptor aufweisen^[58]. Die Arbeitsgruppe Miyabayashi *et al.* konnte zeigen, dass Isoprenalin nach 48stündiger Inkubation von BEAS-2B Zellen die RANTES-Freisetzung nach vorheriger Stimulation der Zellen mit einem Mix aus TNF- α und IL-1 β senken kann^[2]. In der Arbeitsgruppe von Lopez-Vidriero *et al.* wurde ebenfalls ein günstiger Effekt auf die CBF von Rattentrachea-Explantaten postuliert^[59]. Im Rahmen dieser Arbeit werden diese Ergebnisse mit den hier beschriebenen und verwendeten Methoden überprüft, um so einen Vergleich für eigene Ergebnisse herstellen zu können. Da das Isoprenalin in flüssigen Zubereitungen einem langsamen Abbau unterworfen ist, sollten die frisch hergestellten Lösungen zeitnah verwendet werden.

1.6.3 Silymarin

Silymarin ist ein Gemisch verschiedener Flavanonderivate (Flavonolignane). Mit einem vom DAB geforderten Anteil von 1,5-3 % (DAB mind. 1,5 %, berechnet als Silibinin) ist es Hauptbestandteil der Arzneidroge *Silybum marianum* (L.) GARTN., der Mariendistel. Alle zu arzneilichen Zwecken verwendeten Extrakte werden auf den Silymaringehalt normiert. Die Droge besteht aus den vom Pappus befreiten, 6-7 mm langen und ca. 3 mm breiten Früchten^[60]. Die Flavonolignane sind ausschließlich in der Fruchtwand der Pflanze lokalisiert. Den größten Anteil des Silymarins machen die beiden Diastereomerenpaare Silybin A und B und Isosilybin A und B aus (ca.

50 %). Deren Gemische werden als Silibinin und Isosilibinin bezeichnet. Jeweils ein weiteres Viertel der Inhaltsstoffe des Silymarin bezieht sich auf die Verbindungen Silychristin und Silydianin^[61].

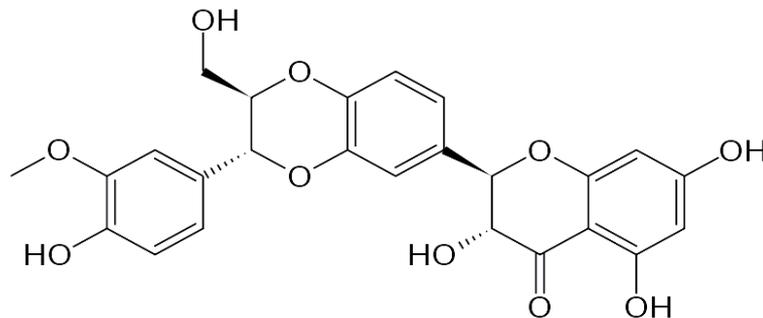


Abb. 1.10: Strukturformel des Silibinins

Weitere Inhaltsstoffe mit geringen Anteilen an dem Vielkomponentengemisch sind u. a. die 3-Desoxyverbindungen von Isosilybin (Silandrin), Silydianin (Silimonin) und Silychristin^[62]. Neben einem Gesamtanteil von ca. 20-30 % fettem Öl und ca. 25-30 % Eiweiß gehören zu den Inhaltsstoffen Taxifolin, Quercetin, Dihydrokämpferol, Apigenin sowie Naringin. Aufgrund der Zusammensetzung ist Silymarin schlecht wasserlöslich und wird daher im Rahmen dieser Arbeit zum Vergleich der erzielten Ergebnisse sowohl im wässrigen Medium als auch in Ethanol gelöst.

Übliche Anwendungsbereiche von Silymarin sind die Prophylaxe und Therapie akuter oder chronischer, z. B. durch Medikamente oder Alkohol induzierter, toxischer Leberschäden. Allerdings ist bei dieser Indikation die Gabe von ethanolischen Auszügen der Droge bzw. die Verabreichung von Trockenextrakten von besonderer Wichtigkeit, da ansonsten die für eine antihepatotoxische Wirkung notwendige Dosis (2-3 mal täglich 140 mg Silymarin, oral) nicht erreicht wird^[63]. Als Teezubereitung kommt die Droge lediglich bei leichten dyspeptischen Beschwerden zum Einsatz^[62, 64].

Der Wirkungsmechanismus des Silymarins wurde bereits in vielen Arbeitsgruppen untersucht und zahlreiche Arbeiten konnten einen antiinflammatorischen, antiproliferativen und protektiven Effekt sowie Radikalfänger- und Antioxidans-Eigenschaften der Droge belegen^[65-69]. Im besonderen Maße wurden die hepatoprotektiven Eigenschaften des Silymarins bzw. des Hauptisomers Silibinin untersucht und von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt^[70-73]. Neuere Untersuchungen

konnten zudem einen hemmenden Einfluss des Silymarins auf das Wachstum einiger Tumorarten zeigen^[74-77]. Ein Wirkungsmechanismus über die Hemmung des NFκB wird dafür verantwortlich gemacht^[78, 79].

In der Arbeitsgruppe um Matsuda *et al.* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Silymarin β-Zellen des Pankreas vor schädlichen Zytokineinwirkungen schützen kann^[80].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Silymarin ebenfalls protektive Eigenschaften am Bronchialepithel aufweisen und darüber hinaus die CBF günstig beeinflussen kann.

1.6.4 Harpagosid

Der Hauptbestandteil von *Harpagophytum procumbens* DC. und *Harpagophytum zeyheri* L. DECNE., der Teufelskralle, ist mit 1-3 % das Iridoidglucosid Harpagosid. Inzwischen sind die sekundären Speicherwurzeln von *Harpagophytum zeyheri* L. DECNE. neben denen von *Harpagophytum procumbens* DC. als gleichwertige Droge im Arzneibuch zugelassen. Nach Arzneibuch ist ein Gehalt der Droge von mind. 1,2 % Harpagosid gefordert. Andere Iridoide, die allerdings in geringeren Anteilen in der Droge enthalten sind, sind p-Cumaroyl-harpagid, Procumbid sowie Harpagid^[81]. Ferner kommen Phenolglykoside und sehr gut wasserlösliche Substanzen, wie Kohlenhydrate vor.

Von der Kommission E für die Indikationen Appetitlosigkeit, dyspeptische Beschwerden und zur unterstützenden Therapie degenerativer Erkrankungen des Bewegungsapparates zugelassen, wird Harpagosid in der heutigen Therapie vorzugsweise in Form eines Trockenextraktes angewendet. Aufgrund der Bitterwirkung der enthaltenen Iridoide wirkt es bei Appetitlosigkeit und dyspeptischen Beschwerden^[62]. Dass Harpagosid einen hemmenden Einfluss auf das Entzündungsgeschehen bei degenerativen Erkrankungen hat und somit analgetische und antiphlogistische Wirkungen zeigt, konnte in einigen Arbeiten belegt werden^[82-84]. Harpagosid blockiert die Biosynthese einiger Mediatoren, die für die Entzündungsreaktion essenziell sind, z. B. die Cysteinyl-Leukotriene und Prostaglandine^[85].

Da für Harpagosid auch ein ähnlicher Wirkmechanismus wie für Silymarin postuliert wird, nämlich die Verringerung der durch LPS induzierten iNOS und COX-2 Expression über Inhibierung von NF κ B^[84, 86], soll das Iridoidglucosid im Rahmen dieser Arbeit weiterhin auf seine protektiven und CBF-beeinflussenden Eigenschaften am Bronchialepithel untersucht werden.

1.6.5 Xylometazolin

Xylometazolin ist eines der am häufigsten verwendeten Imidazolin-Derivate. Im Handel erhältlich sind Nasengele, Nasensprays und Nasentropfen mit Konzentrationen von 0,025 % (für Säuglinge), 0,05 % (für Kinder zwischen 2 und 6 Jahren) und 0,1 % für Erwachsene. Xylometazolin wird aufgrund der vasokonstriktischen Eigenschaften als nasenschleimhautabschwellendes Mittel eingesetzt.

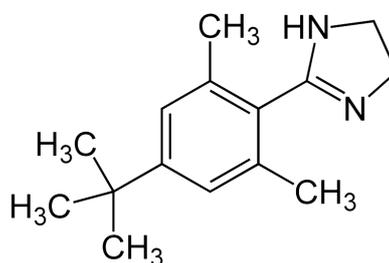


Abb. 1.11: Strukturformel des Xylometazolins

Als α -Sympathomimetikum greift es an α -Adrenorezeptoren an, die eine Kontraktion der arteriellen Gefäße der Schleimhaut und somit ein lokales Abschwellen bewirken. Eine weitere Anwendung findet Xylometazolin in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde häufig in Verbindung mit Lokalanästhetika. Durch Verminderung der raschen Elimination aufgrund der Vasokonstriktion kann so die Wirkdauer der Lokalanästhetika verlängert werden. Die in Rhinologika am häufigsten verwendeten Wirkstoffe zur topischen Anwendung sind neben Xylometazolin die Imidazolin-Derivate Naphazolin und Oxymetazolin. Da der CBF-beeinflussende Effekt dieser Wirkstoffe bereits von anderen Arbeitsgruppen überprüft wurde^[87-89], soll im Rahmen

dieser Arbeit darüber hinaus der Einfluss auf die RANTES-Freisetzung sowie auf die LDH-Aktivität am Modell der BEAS-2B Zellen untersucht werden.

1.6.6 Benzalkoniumchlorid

Im Europäischen Arzneibuch ist Benzalkoniumchlorid offizinell und einer der wichtigsten Vertreter der kationischen Tenside.

Neben seiner Verwendung als wirksamen Bestandteil in einigen Arzneistoffzubereitungen, wie z. B. in Dorithricin[®] Lutschtabletten, wird Benzalkoniumchlorid überwiegend als Konservierungsmittel eingesetzt.

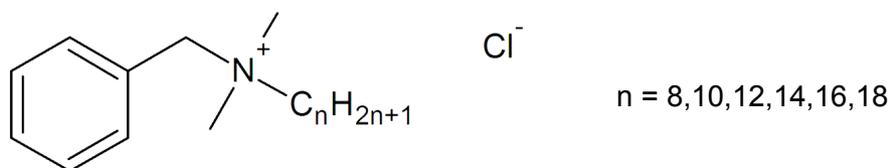


Abb. 1.12: Strukturformel des Benzalkoniumchlorids

Es gehört chemisch zur Gruppe der quaternären Ammoniumverbindungen^[90] und ist ein kationisches Tensid. Es ist hygroskopisch und sehr leicht löslich in Wasser. Benzalkoniumchlorid wird bis heute in zahlreichen Nasen- und Augentropfen, Wundsalben, medizinischen Pflasterverbänden als Konservierungsmittel sowie als Desinfektionsmittel für chirurgische Instrumente verwendet. Schon seit 1935 wird es auf diese Art und Weise eingesetzt^[91]. In den handelsüblichen Konzentrationen von 0,005 % bis 0,02 % soll es in diesen Arzneistoffzubereitungen mikrobielle Verunreinigungen in den Applikationsbehältern vermeiden. Die Effektivität als Konservierungsmittel wird allerdings seit längerem diskutiert. So konnte die Arbeitsgruppe um Joynson *et al.*^[92] zeigen, dass ein Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* noch bei einer Benzalkoniumchlorid-Konzentration von 0,058 % überlebensfähig ist^[88]. Zum Vergleich: die üblichen, handelsfähigen Nasensprays sind mit einer Konzentration von 0,02 % Benzalkoniumchlorid als antimikrobieller

Hilfsstoff versetzt. In diesen Nasensprays könnten demnach Bakterienstämme wie der von *Pseudomonas aeruginosa* nicht abgetötet werden und zu Infektionen führen. Die Wirkung der kationischen Tenside, also auch des Benzalkoniumchlorids, beruht darauf, dass sie in wässrigen Lösungen positiv geladene, grenzflächenaktive Ionen bilden und bei niedrigen Konzentrationen als molekulare Lösung vorliegen^[93]. Überschreitet die Tensidkonzentration allerdings einen bestimmten Wert, die sogenannte kritische Mizellkonzentration (CMC), ändern sich daraufhin die physikalischen Eigenschaften der Tensidlösung, woraufhin die einzelnen Tensidmoleküle assoziieren und sogenannte Mizellen bilden. Mizellen sind kugelförmige Aggregate und bestehen aus nach innen gewandten und damit eingeschlossenen hydrophoben Köpfen und einer nach außen gerichteten hydrophilen Grenzzone. Durch seine grenz- bzw. oberflächenaktive Eigenschaft kann das kationische Tensid die Zellpermeabilität von Bakterien und Hefen durch Interaktion mit Proteinen und Lipiden in ihren Membranen verändern und sie somit unschädlich machen^[94-96]. Da der zilienschädigende Effekt des Benzalkoniumchlorids schon in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte^[88, 96], ist der Einsatz dieses Konservierungsmittels in Arzneimittelzubereitungen, insbesondere in denen zur Anwendung im Nasen- und Bronchialepithel, sehr umstritten. Schon seit langer Zeit wird der reduzierte Gebrauch bzw. ein Ersatz des Benzalkoniumchlorids in derartigen Applikationen empfohlen und gefordert. Mit Hilfe neuerer Applikationstechniken, wie dem COMOD[®]-System, kann die Verwendung eines Konservierungsmittels in der Arzneimittelzubereitung vollständig umgangen werden. Aufgrund des besonderen Aufbaus des Applikators bei diesen Systemen können keine Keime oder andere Verschmutzungen von außen in das System gelangen. Doch die Verwendung solcher speziellen Applikatoren ist deutlich teurer als der traditionelle Applikationsweg. In der Praxis haben sich die modernen Systeme nicht im erhofften Maße bewährt. In der Apotheke präferieren die Patienten weiterhin die preiswerteren, konservierungsmittelhaltigen Produkte.

Um einen Vergleich zu bereits von mehreren Arbeitsgruppen bestätigten Ergebnissen ziehen zu können, wird im Folgenden der Einfluss von Benzalkoniumchlorid auf das CBF-Modell der Rattentrachea überprüft. So sollen Aussagen über Objektivität, Verlässlichkeit und Validität des Modells getroffen werden können. Des Weiteren soll der Effekt auf die RANTES-Freisetzung und auf die LDH-Aktivität in BEAS-2B Zellen untersucht werden.

1.6.7 Thymol

Thymol ist neben Carvacrol Hauptbestandteil der Arzneistoffdroge *Thymi herba* (Ph. Eur.). Laut Europäisches Arzneibuch werden die ganzen, von den getrockneten Stängeln abgestreiften („abgerebelten“) Blätter und Blüten von *Thymus vulgaris* L. (Echter Thymian) und *Thymus zygis* L. (Spanischer Thymian) verwendet^[97]. Es wird ein Gesamtgehalt an ätherischem Öl von mindestens 12 ml/kg gefordert, wovon beide isomeren Monoterpene Thymol (20-50 %) und Carvacrol (3-10 %) als Hauptbestandteile mindestens 40 % ausmachen müssen^[97]. Die Zusammensetzung des ätherischen Öls der beiden Stammpflanzen ist ähnlich, allerdings stark von der Herkunft des verwendeten Drogenmaterials abhängig. Weitere Bestandteile sind Labiatengerbstoffe, Flavonoide, Triterpene sowie Biphenyle^[61].

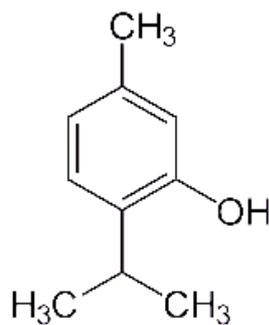


Abb. 1.13: Strukturformel des Thymols

Zugelassene und klinisch belegte Indikation der Droge ist die Therapie der Entzündung des oberen Respirationstraktes^[98, 99]. Das Thymianöl wirkt dabei unter anderem sekretolytisch, sekretomotorisch, broncholytisch und leicht desinfizierend^[100-102], wobei die Wirkungsmechanismen noch nicht im Einzelnen untersucht sind. Die bronchospasmolytische und zum Teil sekretomotorische Wirkung des Thymians kann einerseits durch die bereits nachgewiesene agonistische Wirkweise an β_2 -Rezeptoren erklärt werden^[103]. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe um Meister *et al.* eine spasmolytische Wirkung von Thymianextrakten mit definiertem Anteil an ätherischen Ölen und Flavonoiden an der isolierten Trachea des Meerschweinchens nachweisen^[104]. Allerdings konnten Begrow *et al.* zeigen, dass diese spasmolytische Wirkung des Thymianextraktes nicht allein von dem

Hauptbestandteil Thymol hervorgerufen wird, sondern auch andere im Extrakt enthaltene Bestandteile beteiligt sein müssen^[102, 105].

Im Folgenden soll überprüft werden, ob Thymol einen nachweisbaren Effekt auf die CBF in den beschriebenen Modellen ausübt und es darüber hinaus die RANTES-Freisetzung bzw. die LDH-Aktivität der BEAS-2B Zellen beeinflusst.

1.6.8 Myrtol

Myrtol ist ein ätherisches Öl und wird als Substanzgemisch im Europäischen Arzneibuch auf einen Gehalt von mindestens 25 % Cineol, 25 % Limonen und 6,7 % α -Pinen standardisiert.

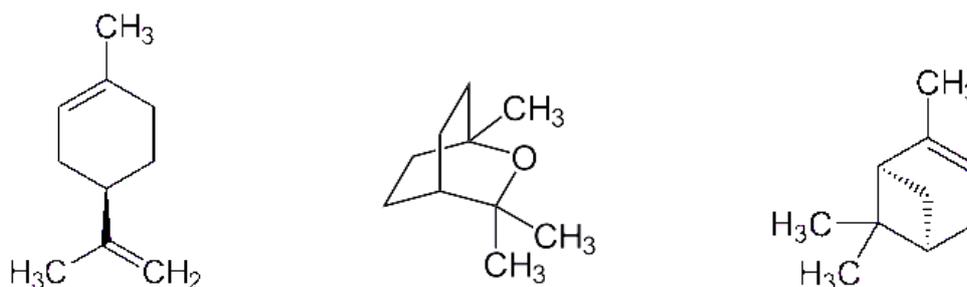


Abb. 1.14: Strukturformeln von (R)-(+)-Limonen, 1,8-Cineol, (+)- α -Pinen

Aufgrund der Zusammensetzung ähnelt es dem Eukalyptusöl, allerdings ist die genaue botanische Herkunft bisher unbekannt. Während vor einiger Zeit noch davon ausgegangen wurde, dass das ätherische Öl aus dem immergrünen Strauch der Myrte (*Myrtus communis*) gewonnen werden kann^[106], nimmt man heutzutage allerdings Abstand von dieser Theorie^[15]. Es wird eher davon ausgegangen, dass das ätherische Öl ein Destillationsprodukt aus ätherischem Eukalyptus- und Citrusöl ist und auf die drei Hauptkomponenten standardisiert wird^[107]. Über die Anwendung des Myrtols als Expektorans bei Sinusitis und Bronchitis in Form von magensaftresistenter Kapseln wurden bereits einige Studien durchgeführt, die eine mukolytische und sekretomotorische Wirkung postulieren^[108-110]. Myrtol erhöht demnach aufgrund einer Funktionssteigerung der serösen Drüsenzellen im Bronchialepithel die Bildung von dünnflüssigem Sekret und stoppt im Gegensatz

dazu die Schleimproduktion der mukösen Zellen. So kommt es zu einer positiven Gleichgewichtsverschiebung hin zur Neubildung eines weniger viskosen Schleims und durch einen sekretolytischen Wirkungsmechanismus zu einer Volumenvermehrung des Bronchialsekretes. Aufgrund dieser Wirkweise kann eine funktionierende mukoziliäre Clearance wiederhergestellt werden^[111].

Da die Therapie mit ätherischen Ölen in jedem Fall eine lokale Reizwirkung auf die Schleimhäute ausübt, können die submukösen Drüsen, die vegetativ innerviert sind, durch Reizung der Magenschleimhaut reflektorisch über den Nervus vagus angeregt werden. Diese Reizung erklärt den sekretolytischen Effekt auf die Bronchialschleimhaut.

Ein frühzeitiger Einsatz der Sekretolytika verringert aufgrund der Bildung von dünnflüssigem und physiologisch zusammengesetztem Sekret in den Atemwegen die Gefahr eines Sekretstaus und damit einer bakteriellen Sekundärinfektion^[111].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll neben der Wirkung des Myrtols auf die ziliäre Schlagfrequenz auch der Einfluss auf die RANTES-Freisetzung und die ausgelöste Zytotoxizität überprüft werden.

1.6.9 Ibudilast

Ibudilast, ein Hemmstoff der Phosphodiesterase (PDE), dilatiert aufgrund seines Wirkungsmechanismus die Bronchien und könnte somit in der Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen eingesetzt werden^[112-114]. Von Huang *et al.* wird eine selektive Hemmung der Phosphodiesterase 4 postuliert^[115], die vor allem die antiinflammatorischen Wirkungen des Ibudilast erklären sollen. Andere Arbeitsgruppen, wie die um Kishi *et al.* zeigten des Weiteren eine Hemmung der Phosphodiesterasen 3 und 5^[114], die wiederum für die Blutplättchenaggregation sowie der Vasodilatation verantwortlich sein sollen. Allerdings ist der Wirkstoff in Deutschland nicht zugelassen, wird aber in Japan erfolgreich in der Asthmatherapie eingesetzt^[114]. Da dem Ibudilast neben einer antiinflammatorischen Wirkung bereits in der Arbeitsgruppe von Ganbo *et al.* ein stimulierender Effekt auf die ziliäre Schlagfrequenz nachgewiesen werden konnte^[116], soll in dieser Arbeit der Wirkstoff lediglich auf seine Beeinflussung der RANTES-Freisetzung aus den BEAS-2B Zellen und auf eine mögliche zytotoxische Wirkung hin untersucht werden. Als

Therapieoption in der Asthmatherapie würde eine dem Ibudilast zugeschriebene Hemmung der RANTES-Freisetzung einen zusätzlichen Gewinn bedeuten. Das Chemokin, welches gerade bei Asthma und anderen Atemwegserkrankungen vermehrt freigesetzt wird (siehe Kapitel 1.5.1), könnte auf diese Weise gehemmt und nachfolgende Kaskaden unterbunden werden.

1.6.10 Losartan

Als Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist greift Losartan in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ein. Als der erste, 1995 in den USA zugelassene Vertreter dieser Wirkstoffgruppe gehört es zu den selektiven AT₁-Rezeptor-Antagonisten. Sie blockieren die Bindung von Angiotensin-II-Agonisten an AT₁-Rezeptoren in Membranen verschiedener Gewebe und hemmen dort alle bekannten Wirkungen des Angiotensin II^[117].

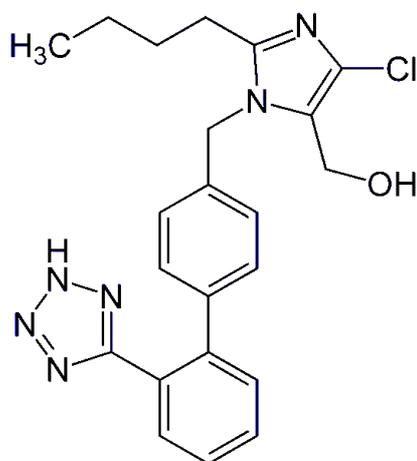


Abb. 1.15: Strukturformel des Losartans

Hauptwirkung ist neben der Sekretionshemmung des Aldosterons die durch direkte Angiotensin-II-Blockade vermittelte Blutdrucksenkung^[58]. Zugelassene Indikation des Losartans ist die Hypertonie und die Behandlung der Herzinsuffizienz^[118]. Die Arbeitsgruppe Laudanno *et al.* postulierte für Losartan zusätzlich einen antiinflammatorischen sowie protektiven Effekt auf den Gastrointestinaltrakt^[119]. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Losartan einen hemmenden

Einfluss auf die RANTES-Freisetzung der BEAS-2B Zellen hat bzw. ob der Wirkstoff die CBF des Flimmerepithels erhöhen kann.

1.6.11 Vitamin D₃

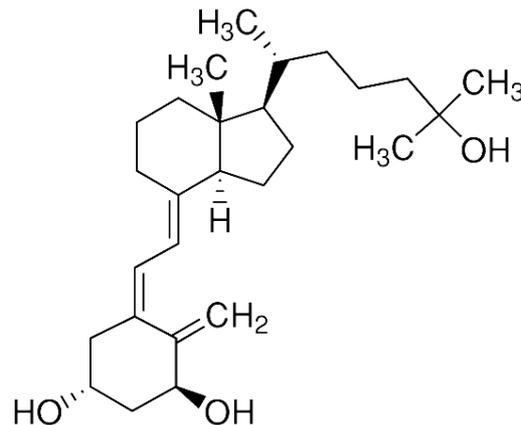


Abb. 1.16: Strukturformel des 1 α , 25-Dihydroxycholecalciferols

Vitamin D₃ (1 α , 25-Dihydroxycholecalciferol) gehört zu den essenziellen Vitaminen und wird für viele Funktionen im menschlichen Körper benötigt. Die Bezeichnung Vitamin ist schon älteren Ursprungs; heute weiß man, dass der Körper die lebensnotwendige Substanz selber produzieren kann. Mit Hilfe des natürlichen UV-Lichts wird es aus 7-Dehydrocholesterol gebildet^[120]. Zusätzlich kann es auch über bestimmte Nahrungsmittel aufgenommen werden. Als Prohormon spielt es im Körper eine wichtige Rolle im Calcium-Stoffwechsel. Ein Mangel führt bei Kindern zur Rachitis und bei Erwachsenen zur Knochenerweichung, der Osteomalazie. Seit einigen Jahren steht das 1 α , 25-Dihydroxycholecalciferol im Mittelpunkt der Entstehung einiger Autoimmunerkrankungen sowie einiger Tumorarten^[121-125], aufgrund des immunmodulierenden Effekts des Vitamins^[126]. Darüber hinaus konnten Riachy *et al.* einen protektiven Einfluss auf die β -Zellen des Pankreas nach der Stimulation durch Zytokine feststellen^[127, 128]. Dieser zytoprotektive Effekt soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit an den BEAS-2B Zellen überprüft werden.

1.6.12 Aspecton®

Unter dem Handelsnamen Aspecton® sind Fertigarzneimittel der Firma Krewel Meuselbach GmbH auf dem Markt. Neben Aspecton® Hustensaft gibt es außerdem Aspecton® Hustentropfen und Aspecton® Eukaps. Die Aspecton® Präparate, die beide einen Thymiankraut-Dickextrakt als wirksamen Bestandteil enthalten, sind für die Therapie der akuten Bronchitis sowie bei Erkältungskrankheiten der Atemwege mit zähflüssigem Schleim zugelassen. Im Unterschied dazu ist die Anwendung der Aspecton® Eukaps nur bei Erkältungskrankheiten der Atemwege mit zähflüssigem Schleim indiziert. Aspecton® Eukaps enthalten als wirksamen Bestandteil Eukalyptusöl. Im Folgenden wird ausschließlich das Präparat Aspecton® Hustentropfen eingesetzt und auf seine Wirkungen hinsichtlich der CBF- und RANTES-Beeinflussung sowie auf mögliche zytotoxische Effekte untersucht.

10 ml Aspecton® Hustentropfen enthalten 2,114 g des Thymiankraut-Dickextrakts (DEV 1,7-2,5:1) als wirksamen Anteil. Außerdem sind die benötigten Auszugsmittel Ammoniaklösung 10 % (m/m), Glycerol 85 % (m/m), Ethanol 90 % (V/V) und Wasser (1:20:70:109) enthalten. Sonstige Bestandteile sind unter anderem Eukalyptusöl und Levomenthol^[129].

Aspecton® ist ein Markenname und urheberrechtlich geschützt. Dies wird in der Regel durch das ®-Symbol gekennzeichnet. Ein Fehlen dieses Zeichens berechtigt nicht zu der Annahme, die Marke sei frei verwendbar.

1.7 Zielsetzung

Ein Fokus dieser Arbeit liegt auf der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B und ihrem morphologischen Erscheinungsbild sowie ihrer immunologischen Eigenschaften. Es wird der Frage nachgegangen, ob die Zelllinie in der Lage ist unter optimalen Bedingungen Zilien auf ihrer Oberfläche auszubilden und ob an diesen die Ciliary Beat Frequency gemessen werden kann. Die Zelllinie würde damit für Fragestellungen zur Verfügung stehen, die sich an der CBF-Messung und ihrer Beeinflussung orientieren.

Dazu werden die BEAS-2B Zellen zum einen morphologisch, d. h. elektronenmikroskopisch, auf einen Zilienbesatz untersucht. Zum anderen sollen mit verschiedenen Methoden die beiden Zilienmarker axonemales Dynein und β_1 -Tubulin nachgewiesen werden. Da beide Proteine Bestandteile von Zilien sind und wichtige Funktionen im Zilienschlag übernehmen, würde der Nachweis dieser beiden Zilienmarker für eine Voraussetzung der Bildung von funktionellen Zilien auf den BEAS-2B Zellen sprechen. Die Arbeitsgruppe um Sisson *et al.* hat mit der Hemmung der CBF durch einen Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper bereits zeigen können, dass das β_1 -Tubulin essenziell für die Bewegung der Zilien ist^[130]. Das axonemale Dynein ist ebenfalls durch seine ATPase-Aktivität direkt in die Bewegung der Zilien eingebunden. Als Motor der Bewegung dient es u. a. der Energiebereitstellung^[131-135].

In Bezug auf die immunologischen Eigenschaften der BEAS-2B Zellen wird im Rahmen dieser Arbeit die Freisetzung von RANTES, eines Chemokins der CCL5-Familie, dem u. a. eine zentrale Rolle in der Pathologie der Asthmaerkrankung zugesprochen wird, unter bestimmten Inkubationsbedingungen untersucht. Nach vorheriger Stimulation der Zellen durch Zytokine soll der Einfluss sowohl von bereits etablierten Arzneistoffen als auch von unbekanntem und in anderen Bereichen der Medizin eingesetzten Substanzen überprüft werden. Es wird untersucht, welche Wirkstoffe in diesem Modell fähig sind, die RANTES-Konzentration im Überstand der Zellen zu senken.

Weiterhin werden die gleichen Substanzen auf ihre Zytotoxizität im Bronchialbereich und auf ihre CBF-Beeinflussung überprüft. Als Modell für die Zytotoxizitätsuntersuchungen dienen die BEAS-2B Zellen, die Schlagfrequenz-

Messungen werden an Rattentrachea-Ringen durchgeführt. Sollten die eingesetzten Wirkstoffe die CBF erhöhen können, könnten sie den Verlauf von Atemwegserkrankungen günstig beeinflussen. Durch eine erhöhte Schlagfrequenz wäre die mukoziliäre Clearance beschleunigt und Schleim, Staub, Bakterien sowie weitere Schmutzstoffe könnten besser abtransportiert werden. Gerade die Therapie des Asthma bronchiale, der COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) oder der ziliären Dyskinesie könnten sie günstig beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird dazu ein Modell zur CBF-Messung etabliert. An Rattentrachea-Explantaten, die an der Innenseite mit einem zilientragenden Flimmerepithel ausgekleidet sind, werden die gleichen Substanzen wie im RANTES- und Zytotoxizitäts-Assay getestet.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in dem Vergleich, der Bewertung und Etablierung weiterer Methoden der CBF-Messung. Neben der CBF-Aufnahme und Analyse der Zilien von Rattentrachea-Explantaten wird die Möglichkeit der Frequenzmessung an selbst kultivierten Schweine-Primärzellen gemäß einem in der Literatur beschriebenen Zilienmodell^[130, 136-138] sowie an EpiAirway™ Membranen -humanen Bronchialepithelzellen- beschrieben, bewertet und die verschiedenen Methoden miteinander verglichen.

2 Material

2.1 BEAS-2B Zelllinie

BEAS-2B Zellen sind humane Bronchialepithelzellen, die mit dem Adenovirus 12-SV 40-Hybridvirus transformiert wurden. Einige typische Merkmale von Bronchialepithelzellen konnten sie trotz Transformierung beibehalten, so zum Beispiel die Sezernierung bestimmter Zytokine und Chemokine nach vorheriger Stimulation^[13, 139].

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Kultur der BEAS-2B Zellen im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ in 75 cm² großen Zellkulturflaschen. Zur längeren Lagerung wurden die BEAS-2B Zellen tiefgefroren und in Flüssigstickstoff aufbewahrt. Um eine konstante Zellqualität zu gewährleisten, wurden die Bronchialepithelzellen nach der 40. Passage verworfen und Zellen aus dem tiefgefrorenen Stock frisch kultiviert.

BEAS-2B Zellen wurden alle sieben Tage passagiert. Dazu wurde das alte Medium verworfen und der Zellrasen mit PBS-Puffer gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung für einige Minuten angedaut, um danach vom Zellkulturflaschenboden abgelöst zu werden. Die Reaktion wurde mit kaltem Medium gestoppt und die Zellsuspension danach bei 800 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde im nächsten Schritt in frischem Medium resuspendiert. Die BEAS-2B Zellen wurden in einer Konzentration von 1.500-3.000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Um ein optimales Zellwachstum zu gewährleisten, wurden die Zellkulturflaschen zuvor mit einer Lösung aus Humanfibronectin, Kollagen und BSA beschichtet. Mit Fibronectin, BSA und Kollagen beschichtete Kulturschalen erhöhen die Anwachs geschwindigkeit im Vergleich zu reinen Plastikoberflächen. Kollagen und Fibronectin sind physiologisch vorkommende Strukturproteine des bronchopulmonalen Interstitium und der Basalmembranen, denen auch gerade bei der Reepithelialisierung entsprechender Gewebläsionen eine große Bedeutung zugesprochen wird.^[140, 141]

Die Adhäsionsfaktorlösung wurde nach zwei Stunden abgeschüttet und die Zellen in die vorbereiteten Flaschen eingesät. Auf diese Art präparierte Zellkulturflaschen sind in Aluminiumpapier eingewickelt und im Kühlschrank gelagert etwa vier Wochen verwendbar. Da die BEAS-2B Zellen in die Risikogruppe 2 einzuordnen sind,

mussten sämtliche Arbeiten in einem Labor mit erweiterter Sicherheitsstufe 1 (S 1) nach Biostoffverordnung (BioStoffV) durchgeführt werden. Der Kryobehälter, in dem die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, musste ebenfalls in dem erweiterten S 1 Labor gelagert werden. Um vor ausgehenden Gefahren zu schützen, mussten sämtliche mit den Zellen oder deren Abfall kontaminierte Materialien autoklaviert werden, bevor sie dem Restmüll zugeführt werden durften.

2.2 Rattentrachea-Explantate

Für die Entnahme der Trachea wurden Ratten mit Ether bzw. Pentobarbital euthanasiert. Nachdem die Hautschichten, das Fett- und das Bindegewebe entfernt worden waren, wurde die komplette Trachea vom Larynx bis zur Bifurkation herausgeschnitten. Zunächst wurde das Organ in auf 37 °C angewärmten Puffer aufbewahrt. Nachdem die Trachea von übrigem Bindegewebe und Blut gereinigt worden war, wurde sie noch einmal mit sauberem, angewärmtem Puffer gespült. Das Organ von ca. 1,5 cm Länge wurde in dünne, etwa 0,5-1 mm dicke Ringe geschnitten. Um diesen feinen und genauen Präparationsschritt zu erleichtern und unnötiges Zerstören von Flimmerepithel der Trachea durch die Pinzette zu vermeiden, wurde bei der Entnahme der Kehlkopf mit entnommen, der dann bei der Präparation als Angriffspunkt für die Pinzette diente.

Die gesamte Präparation fand im Puffer statt, wobei darauf geachtet wurde, dass die gesamte Trachea immer befeuchtet blieb, um Verlust von intaktem Flimmerepithel durch Austrocknung zu vermeiden. Die Ringe wurden nach der Präparation in vorgewärmtes LHC-9 Medium gelegt und mindestens einen Tag im Brutschrank in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ äquilibriert. Da am Tag der Präparation keine konstante CBF aufgezeichnet werden konnte, wurden die Versuche mit den Präparaten erst an den darauf folgenden Tagen durchgeführt. Die Ringe konnten bis zu einer Woche im Brutschrank aufbewahrt werden, ohne dass die Zilien an Aktivität verloren. Um den Bedarf an Nährstoffen über die gesamte Zeit zu gewährleisten, erfolgte nach jeweils drei Tagen ein Mediumwechsel. Alle Versuche an den Trachea-Ringen wurden innerhalb einer Woche nach Entnahme durchgeführt.

2.3 Schweinetracheen

Schweinetracheen, die für die Gewinnung und Kultivierung der Tracheaepithel-Primärkultur sowie für die Gewinnung der einzelnen Axoneme für das in dieser Arbeit beschriebene Zilienmodell benötigt wurden, wurden vom Schlachthof bezogen. Die Tracheen, die den Schweinen nach der Schlachtung entnommen wurden, wurden während des Transports gekühlt und anschließend im Labor sofort weiterverarbeitet.

2.4 Chemikalien und Geräte

2.4.1 BEAS-2B Zellkultur

Chemikalien

Humanfibronectin	Biochrom, Berlin
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagen	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Cölbe
L-Glutamin	PAA, Cölbe
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure)	PAA, Cölbe
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Bovines Serum (FCS)	PAA, Cölbe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, Schweiz

Zellkulturmedien

Zellkulturmedium für BEAS-2B Zellen	
Medium	LHC-9 Medium
Zusatz	Konzentration
Penicillin	100 I.U./ml
Streptomycin	100 µg/ml

Einfriermedium für BEAS-2B Zellen	
Medium	LHC-9 Medium
Zusatz	Konzentration
L-Glutamin	2 mM
HEPES	10 mM
PVP	1 %
FCS	10 %
DMSO	7,5 %

Materialien

Autoklav	System GmbH, Wetzlar
Einmalspritzen Norm-Ject® 2 ml, 5 ml	Henke Sasse Wolf, Tuttlingen
Kryobehälter Millennium XC 20	WWS Germany, Altenberge
Kryogefäße 1,5 ml	Nalgene, Rochester, New York, USA
Laminar Air Flow Werkbank Antair BSK	Anthos, Siegburg
Lichtmikroskop	Krüss GmbH, Hamburg
Neubauerzählkammer	Laboroptik, Friedrichsdorf
Multiwell Platten 6, 24, 96	Nunc, Wiesbaden
Pipetboy	Abimed, Langenfeld
Serologische Pipetten 10 ml	Biochrom, Berlin
Plastibrand Entsorgungsbeutel, autoklavierbar	Omnilab, Bremen
Proben Einfriercontainer	NationalLab, Mölln
Probenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Millex-GS [®] Sterilfilter, 0,22 µm, MF-Millipore [™] Membran, steril	Millipore, Co. Cork, Irland
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 25 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur-Brutschrank HeraCell 240	Kendro-Heraeus, Berlin
Zellkultur-Brutschrank IG 15	Jouan GmbH, Frankfurt

Desinfektionsmittel

Sterillium Virugard, Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie, Hamburg
Kohrsolin FF, Flächendesinfektionsmittel	Bode Chemie, Hamburg

2.4.2 RANTES-ELISA

Chemikalien und Antikörper

Duo-Set für ELISA (RANTES)	R & D, Minneapolis, USA
Substrate Reagent Pack	R & D, Minneapolis, USA
TNF- α	Sigma-Aldrich, Steinheim
IFN- γ	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silymarin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Benzalkoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylometazolin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harpagosid	Sigma-Aldrich, Steinheim
1 α , 25-Dihydroxyvitamin D ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salbutamol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aspecton [®] Hustentropfen	Krewel Meuselbach GmbH,
Chargen-Nr. 60203A	Eitorf
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Limonen	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Pinen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cineol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Losartan	MSD, München
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz

Puffer und Lösungen

Assay-Medium	
Medium	RPMI 1640 Medium
Zusätze	Konzentration
Penicillin	100 I.U./ml
Streptomycin	100 µg/ml

Waschpuffer	
Puffer	PBS
Zusätze	Konzentration
Tween 20	0,05 %
pH 7,2 - 7,4	

Block- und Verdünnungspuffer	
Puffer	PBS
Zusätze	Konzentration
BSA	1 %
pH 7,2 - 7,4	

Stopp-Lösung
2 N H ₂ SO ₄

Verbrauchsmaterial

Clear Polystyrene Microplates

R & D, Minneapolis, USA

ELISA Plate Sealers

R & D, Minneapolis, USA

Geräte

Fotometer POLARstar Galaxy

BMG LabTechnologies GmbH, Jena

2.4.3 Dot Blot

Chemikalien und Antikörper

Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-DNAL4-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Mouse IgG Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Rabbit IgG Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
Immobilon TM Western	Millipore Corporation, Billerica, USA
HRP Substrate Luminol Reagent	
Immobilon TM Western	Millipore Corporation, Billerica, USA
HRP Substrate Peroxide Solution	
KCl	J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol	J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitorcocktail	Roche, Mannheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan- hydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Superfix plus, Rapid fixer	Tetenal AG + Co. KG, Norderstedt
Rodinal B & W Developer	a & o imaging Solutions GmbH, Koblenz

Puffer und Lösungen

PBS-Puffer (pH 7,4)	
Substanz	Menge
NaCl	8,0 g
KCl	0,26 g
Na ₂ HPO ₄	1,42 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Blotting-Puffer	
Substanz	Menge
Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,0375 g
Methanol	200 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Geräte

Celloshaker Variospeed

Neolab, Heidelberg

Digital pH-Meter 646

Knick, Berlin

Filtermembran

Schleicher & Schüll, Dassel

Ultrazentrifuge Sorvall RC 6 Plus

Thermo Fisher Scientific, Bonn

Nitrozellulosemembran

Schleicher & Schüll, Dassel

Trans Blot Transfer Zelle

BIO-RAD, München

Vortex Genie 2™

Bender und Hobein, Zürich, Schweiz

2.4.4 CBF-Messung an isolierten Axonemen

Chemikalien

CaCl ₂	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Buchs, Schweiz
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt
Triton [®] X-100	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	Fluka, Buchs, Schweiz
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim

Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer	
Substanz	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
NaCl	50 mM
CaCl ₂	10 mM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoethanol	7 mM
Triton [®] X-100	0,1 %
Dithiothreitol	1 mM

Resuspensionspuffer	
Substanz	Konzentration
Tris-HCl	20 mM
Kaliumacetat	50 mM
MgCl ₂	4 mM
EDTA	0,5 mM
Dithiothreitol	1 mM
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	0,1 mg/ml

2.4.5 CBF-Messung an Trachea-Explantaten

Chemikalien

Immersionsöl	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
LHC-9 Medium	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe

Materialen

OP-Besteck	Hammacher, Solingen
Inverses Mikroskop, Eclipse Ti-U	Nikon GmbH, Düsseldorf
Heater Controller, Dual Channel	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
PM-4 Magnetic Chamber Platform	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Slow Flow Solution Heater	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Glas Coverslip 15 mm Round	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Slice Hold-Down	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Silicone Grease Kit	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Kamera Basler A602f-2	Basler Vision Technologies, Ahrensburg
Basis-Software LabVIEW	National Instruments Germany GmbH, München
Vision Acquisition 8.5	
Auswertungssoftware SAVA 2.02 add-on	Ammons Engineering, Mt. Morris, USA
Computer	individuell konfiguriertes Computersystem auf der Basis von Microsoft

2.4.6 Fluoreszenzmikroskopie

Chemikalien und Antikörper

Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-DNAL4-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Mouse IgG FITC Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Rabbit IgG FITC Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Triton [®] X-100	Fluka, Buchs, Schweiz
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-Dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immersionsöl	Leica, Wetzlar
Fluoromount	Sigma-Aldrich, Steinheim

Materialien

Glas Coverslip 15 mm Round	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Glas Coverslip 22 x 40 mm	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten

2.4.7 Primärkultur von Epithelzellen der Schweinetrachea

Chemikalien

Humanfibronectin	Biochrom, Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagen	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA, Cölbe
Protease Typ XIV, Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Steinheim

Puffer und Lösungen

Zellkulturmedium für Primärzellen	
Medium	LHC-9 Medium, RPMI Medium (im Verhältnis 1:1 gemischt)
Zusatz	Konzentration
Penicillin	100 I.U./ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin B	5 µg/ml
für die ersten Tage nach der Aussaat wird dem Medium zur besseren Anheftung der Zellen noch 1 % Serum hinzugefügt	

Proteaselösung	
Medium	RPMI Medium
Zusatz	Konzentration
Protease XIV	0,01 %
Penicillin	200 I.U./ml
Streptomycin	200 µg/ml
Amphotericin B	10 µg/ml

Stoppmedium	
Medium	RPMI Medium
Zusatz	Konzentration
Penicillin	100 I.U./ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin	5 µg/ml
FCS	10 %

Materialien

Edelstahlsieb 100 µm Maschenweite

Probenröhrchen 15 ml, 50 ml

Celloshaker Variospeed

Karl Willers Laborbedarf e.K, Münster

Sarstedt, Nümbrecht

Neolab, Heidelberg

Millex-GS [®] Sterilfilter, 0,22 µm, MF-Millipore [™] Membran, steril	Millipore, Co. Cork, Irland
ThinCerts, 0,4 µM PET-Membran	Greiner bio-one, Solingen
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht

2.4.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Chemikalien und Antikörper

Anti-β ₁ -Tubulin-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-DNAL4-Antikörper	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Mouse IgG Gold Konjugat, 10 nm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Rabbit IgG Gold Konjugat, 10 nm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Piperazin-1,4-(2-ethan-sulfonsäure) (PIPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
HCl (32 %ig)	Merck, Darmstadt
Lowicryl [®] K4M	Sigma-Aldrich, Steinheim

Nicht hier aufgeführte Geräte und Materialien entsprechen der üblichen Laborausstattung.

3 Tiere

Die Rattentrachea-Ringe wurden aus Tracheen geschnitten, die zuvor mit Ethernarkose getöteten Ratten entnommen wurden. Dafür wurden weibliche und männliche Wistar-Ratten verwendet. Bei den Ratten handelte es sich um einen Stamm von Albino-Ratten, der der Spezies *Rattus norvegicus* angehört und erstmals 1906 im Wistar-Institut in Philadelphia, USA, gezüchtet wurde.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tiere stammten von den Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland.

Die Ratten wurden in einem klimatisierten Raum bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22 °C und konstanter Luftfeuchtigkeit mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. In Makrolonkäfigen hatten die Tiere freien Zugang zu Leitungswasser und standardisiertem Futter (Altromin® 1234, Firma Altromin, Lage). Zum Versuchszeitpunkt hatten die Tiere ein Gewicht von 170-390 g.

4 Methoden

4.1 BEAS-2B Zellen

An der humanen Bronchialepithelzelllinie wurden sowohl Zytotoxizitäts- als auch immunologische Untersuchungen vorgenommen, die im Weiteren näher beschrieben werden.

4.1.1 Untersuchungen zur Zytotoxizität: Messung der LDH im Überstand

Der Zelltod ist immer mit einer Zerstörung der Plasmamembran verbunden. Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches im Zytoplasma aller Zellen vorkommt. Bei einer Schädigung der Zelle wird LDH in den Überstand sezerniert. Die Konzentration an LDH kann durch eine enzymatische Farbreaktion quantitativ bestimmt werden. Je mehr LDH von den Zellen freigesetzt wird, desto mehr Laktat kann durch LDH zu Pyruvat umgesetzt werden. Gleichzeitig wird aber auch NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert, das im Folgenden ein gelbes Tetrazolium- zu einem roten Formazansalz reduziert; dies kann fotometrisch vermessen werden. Die gemessene Absorption ist proportional zur Zellyse, verursacht durch die zugegebenen zu testende Substanzen. Neben den Proben, die die gewünschte Anzahl der Zellen plus die zu testende Substanz enthält, müssen weitere Testproben auf jeder zu vermessenen Multiwell-Platte aufgetragen werden. Zum einen sind dies die Proben für den Background-Wert, die ausschließlich Medium und somit keine Zellen enthalten. Der Background-Wert wird zum Schluss von allen Werten abgezogen.

Obligatorisch sind zum anderen die Negativ- und Positivproben. Die Negativproben beinhalten nur Medium und unstimulierte Zellen (d. h. ohne Substanz), genau wie die Positivproben, denen zusätzlich noch ein Lysis-Reagenz hinzugegeben wird. Die Positivprobe stellt bei der Auswertung den 100 % Toxizitätswert dar.

Jede zu testende Substanz wird zusätzlich nur in Medium, ohne Zugabe von Zellen vermessen, um störende Einflüsse der Substanz auf den Test auszuschließen.

Auf ihre Zytotoxizität im LDH-Test werden im Rahmen dieser Arbeit die Substanzen Salbutamol, Isoprenalin, Silymarin, Harpagosid, Xylometazolin, Thymol, Myrtol, Ibudilast, Vitamin D₃ und das Präparat Aspecton[®] Hustentropfen getestet.

Stimulation der BEAS-2B Zellen für die LDH-Messung

Für die LDH-Messungen im Überstand wurden die BEAS-2B Zellen in einer Dichte von 20.000 Zellen/100 µl Medium/Well in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Für zwei Tage verblieben die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre. Am Versuchstag wurde das alte Medium abgesaugt und durch frisches, aufgewärmtes Medium ersetzt. Neben den Substanzen, die in den gewünschten Konzentrationen dazugegeben wurden, mussten auf jeder Platte die Background-, Negativ- und Positivproben aufgetragen werden (siehe oben).

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde zunächst das Lysis-Reagenz zu den Positivproben gegeben und anschließend der Katalysator, der die Farbreaktion umsetzt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 Minuten im Dunkeln wurde die Reaktion gestoppt und die Proben fotometrisch vermessen.

Die Zytotoxizität wurde nach folgender Gleichung berechnet und in Prozent angegeben:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Probeneffekt} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

4.1.2 Immunologische Untersuchungen:

Messung der RANTES-Konzentration im Überstand

RANTES (regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted) gehört zur Familie der IL-8- bzw. der CCL5-Chemokine. RANTES wird mit vielen Erkrankungen des Immunsystems in Verbindung gebracht^[45, 48]; so wird es z. B. bei vielen Arten von Allergien oder bei Asthma vermehrt exprimiert.^[50] Es wird sowohl von Bronchialepithelzellen als auch von Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophilen gebildet^[2] (siehe Kapitel 1.5.1).

β_2 -Rezeptor-Agonisten, die einen festen Platz in der Therapie des Asthma bronchiale haben, sollen neben ihrer spasmolytischen Eigenschaft einen antiinflammatorischen Einfluss in den Atemwegen haben. In dieser Arbeit werden neben den genannten β -Rezeptor-Agonisten weitere Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die durch Zytokine stimulierte RANTES-Freisetzung zu hemmen.

Stimulation der BEAS-2B Zellen für den RANTES-ELISA

In einer Konzentration von 100.000 Zellen/ml wurden die BEAS-2B Zellen in sterile 24er-Well-Zellkulturplatten in LHC-9 Medium ausgesät. Jedes Well wurde mit 1 ml der Zellsuspension gefüllt. Die ausgesäten Zellen wuchsen dann für drei Tage im Brutschrank. Damit eventuell vorhandene Abfallstoffe und von den Zellen ausgeschiedene Toxine entfernt werden konnten, wurde am Versuchstag das alte Medium abgesaugt und mit neuem, auf 37 °C angewärmtes Medium ausgewechselt. Anstatt des LHC-9 Mediums, welches die besten Wachstumsbedingungen erfüllt, wurde für den Versuch selber das RPMI Medium verwendet. Es zeigten sich in diesem Medium die stabileren Versuchsbedingungen und -ergebnisse.

Zunächst wurden die Zellen mit Salbutamol, Isoprenalin, Silymarin, Harpagosid, Thymol, Myrtol, Xylometazolin, Benzalkoniumchlorid, Ibudilast, Losartan, Vitamin D₃ und dem Präparat Aspecton[®] Hustentropfen für 30 min vorbehandelt und für diese Zeit in den Brutschrank zurückgestellt. Danach wurde der Zytokin-Mix (TNF- α 10 ng/ml und IFN- γ 10 ng/ml) auf die Zellen gegeben. Während der gesamten Inkubationszeit von 24 Stunden verblieb die Zellkulturplatte bei 37 °C im Brutschrank.

Messung von RANTES per ELISA

Mit Hilfe des Sandwich-ELISA kann die Konzentration von RANTES im Überstand gemessen werden. Das auf Stimulation der BEAS-2B Zellen hin exprimierte Chemokin wird von spezifischen Antikörpern gebunden und kann so quantitativ gemessen werden.

An die feste Phase, in diesem Fall die ELISA-Platte, wurde entsprechend den Herstellerangaben über Nacht der erste Antikörper gebunden. Nachdem am nächsten Tag im ersten Schritt der Blockpuffer alle übrigen Bindungsstellen belegt hatte, konnten nach mehreren Waschschritten die Proben bzw. die verdünnten Standardlösungen auf den ersten Antikörper gegeben werden. Um eine aussagekräftige Standardkurve für jeden Versuch erstellen zu können, wurden auf jeder Platte sieben Standardkonzentrationen vermessen. Alle Lösungen wurden in dreifacher Ausführung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwei Stunden wurden die Überstände wieder abgenommen und nach wiederholtem Spülen der zweite Antikörper dazu gegeben. Dabei wurde das Chemokin an verschiedenen Epitopen zwischen den beiden Antikörpern gebunden.

Das Enzym Streptavidin-Meerrettichperoxidase, welches den zweiten Antikörper markiert, katalysiert eine Farbreaktion. Die Substrat-Lösung, die dafür nötig ist, wurde nach einer weiteren kurzen Inkubationszeit im Dunkeln dazu pipettiert. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch 2 N H_2SO_4 gestoppt. Unmittelbar im Anschluss konnte die Konzentrationsbestimmung aufgrund der Farbreaktion fotometrisch und mit einer Standardkurve als Vergleichsparameter erfolgen.

4.1.3 Nachweis von Zilien auf den BEAS-2B Zellen

Die vorhandene Literatur zum Zilienbesatz der BEAS-2B Zellen ist sehr widersprüchlich. Während Horowitz *et al.* die BEAS-2B Zelllinie als zilientragend beschreibt^[142], verneint Gomperts *et al.* die Anwesenheit von Zilien auf den BEAS-2B Zellen^[143].

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B unter bestimmten Bedingungen Zilien ausbilden kann. Dazu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellen zu verschiedenen Wachstumszeiten und unter unterschiedlichen -bedingungen angefertigt. Außerdem wurde mittels Dot Blot-Verfahren, Immunfluoreszenz und goldmarkiertem Immunlabeling überprüft, ob die BEAS-2B Zellen die Proteine β_1 -Tubulin und axonemales Dynein exprimieren. Da beide Proteine Zilienmarker sind, würde deren Nachweis für das Vorhandensein von Zilien bzw. für Voraussetzungen des Zilienwachstums auf den BEAS-2B Zellen sprechen.

4.1.3.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der BEAS-2B Zellen

Um das Vorhandensein von epithelialen Eigenschaften und vor allem von Zilien auf der Oberfläche der BEAS-2B Zellen zu überprüfen, wurden die präparierten Zellen mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

Damit von den BEAS-2B Zellen aussagekräftige elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt werden konnten, mussten die Bronchialepithelzellen zunächst unter optimalen Versuchsbedingungen heranwachsen. Um darüber hinaus eine Aussage bezüglich der zeitabhängigen Oberflächendifferenzierung treffen zu können, wurden die Zellen nach unterschiedlichen Wachstumszeiten untersucht. Dafür wurden die Zellen nach 6, 9, 21 und 28 Tagen untersucht. In früheren Versuchsdurchführungen zu ähnlichen Fragestellungen wurden zilientragende Bronchialepithel-Primärzellen auf Zellkultureinsätzen, sogenannten Air-Liquid-Inserts (ALI), mit einer 0,4 μm PET-Porenmembran herangezüchtet. Diese Art der Kultivierung begünstigt die Differenzierung des Bronchialepithels und damit auch die Ausbildung von Zilien^[86, 144]. Diese Zellkultureinsätze wurden auch im Rahmen dieser Versuchsdurchführung eingesetzt. Sie wurden in Multi-Well-Platten gehängt und

zunächst von unten sowie von oben mit Medium umgeben bzw. bedeckt. Während die Zellen, die auf der Membran wuchsen, somit zunächst mit Medium bedeckt waren, wurde es nachdem die Zellen ca. eine Woche später konfluent gewachsen waren abgenommen. Die Nährstoffversorgung der Zellen übernahm dann das Medium, welches die Zellen von unten umgab.

Die auf diese Art präparierten Zellen wurden im Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster weiterverarbeitet und für die Untersuchung im Elektronenmikroskop vorbereitet.

4.1.3.2 Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Dot Blot

Zellaufarbeitung

Da in der Literatur beschrieben ist, dass β_1 -Tubulin und axonemales Dynein zu den Zilienmarkern gehören^[130, 134, 135], soll im Rahmen dieser Arbeit das Vorhandensein dieser Proteine in der BEAS-2B Zelllinie nachgewiesen werden. Durch Messung der CBF an Rattentrachea-Explantaten nach Zugabe von Anti- β_1 -Tubulin und Anti-axonemales Dynein konnte das Ergebnis von Sisson *et al.* bestätigt werden^[130]. Beide Antikörper reduzieren konzentrationsabhängig die CBF. Dieses Ergebnis zeigt, dass β_1 -Tubulin und axonemales Dynein direkten Einfluss auf die CBF haben.

Für den Dot Blot wurden die in Zellkulturflaschen konfluent gewachsenen Zellen zunächst zweimal mit jeweils 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden nach Zugabe von weiteren 5 ml PBS die Zellen von dem Zellkulturflaschenboden abgelöst. Nachdem die Zellsuspension bei 1500 U/min für fünf Minuten zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das entstandene Pellet in 250 μ l (pro Zellkulturflasche) RIPA-Puffer aufgenommen. Der RIPA-Puffer wurde zuvor mit Proteaseinhibitoren versetzt, um die Degradierung der Proteine zu verhindern. Dazu wurde eine Tablette des Proteaseinhibitorcocktails in 1 ml PBS gelöst und dann 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt. Die Zellen wurden im Anschluss unter Eiskühlung mit dem RIPA-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde alles bei 33.000 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin für 30 Minuten bei 60 °C denaturiert

und anschließend auf Eis abgeschreckt. Noch einmal wurden die Proben in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um dann aufgetragen werden zu können. 20 µl der Proben wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und getrocknet.

Detektion

Um die unspezifische Bindung des Antikörpers auf der Membran zu vermeiden, wurde die Membran anschließend bei Raumtemperatur für ungefähr eine Stunde in phosphatgepufferter Salzlösung mit Tween (PBST) mit 5 % Magermilchpulver geschüttelt. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten mit PBST-Puffer gespült. Für die eigentliche Inkubation der Membran mit dem Antikörper wurde sie zusammen mit dem jeweiligen Primärantikörper, gelöst in PBST-Puffer mit 2 % Magermilchpulver, in eine Folie eingeschweißt. Der Anti-Dynein-Antikörper wurde hierfür im Verhältnis 1:500, der Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper 1:40.000 verdünnt. Nach 60 Minuten wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten mit PBST-Puffer von überschüssigem Antikörper befreit. Der Zweitantikörper, für das Dynein der Anti-Rabbit Antikörper 1:160.000, für das β_1 -Tubulin der Anti-Mouse Antikörper 1:1.000, wurde auf die gleiche Art für 60 Minuten mit der Membran inkubiert. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen die Spezies, in der der Primärantikörper erzeugt wurde. Im Fall des Anti-Dynein-Antikörpers ist das die Spezies Kaninchen und im Fall des Anti- β_1 -Tubulin-Antikörpers die Spezies Maus. Der Sekundärantikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welche das Reagenz Luminol umsetzt. Bei dieser Umsetzung wird Licht emittiert, welches zur Schwärzung des Röntgenfilms als Signal führt. Danach folgten wiederum drei Spülschritte, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die eigentliche Detektion erfolgte dann mit Hilfe der Immobilon™ Western HRP Substrate Lösungen. Dafür wurde die mit beiden Antikörpern benetzte Membran mit den beiden Lösungen, Immobilon™ Western HRP Substrate Luminol Reagent und Immobilon™ Western HRP Substrate Peroxide Solution im Verhältnis 1:1 gemischt, in der Dunkelkammer für eine Minute inkubiert. Die so präparierte Membran belichtete auf einem Trägerbrett, luftblasenfrei unter einer Folie fixiert, für 20 Minuten einen Röntgenfilmstreifen in einer Fotokassette. Dieser musste nach der Belichtung eine Minute lang entwickelt werden. Durch Tauchen in ein Wasserbad wurde die Entwicklung gestoppt und der Film daraufhin eine Minute lang fixiert. Das Fixiersalz

wurde ebenfalls durch Tauchen in ein Wasserbad ausgewaschen und der Film anschließend getrocknet.

4.1.3.3 Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen und der Schweinetrachea-Primärkultur mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für den Nachweis des β_1 -Tubulins und des axonemalen Dyneins in der BEAS-2B Zelllinie und der selbst angelegten Tracheaepithelzell-Primärkultur vom Schwein sollten mit Hilfe von FITC-markierten Antikörpern die beiden Zilienmarker mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden. Dafür wurden die BEAS-2B Zellen bzw. die Primärzellen auf zuvor mit Kollagen, Fibronectin und BSA beschichteten Deckgläschen ausgesät und für sieben Tage kultiviert. Jeden dritten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Deckgläschen wurden zu Beginn der Präparation dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um sie dann für zehn Minuten in 4 % Paraformaldehyd, gelöst in PBS, zu fixieren. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden sie mit 0,5 % Triton[®] X-100 bei Raumtemperatur permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Für 45 Minuten wurden die vorbereiteten BEAS-2B Zellen mit einer 3 %igen BSA-Lösung bei 37 °C geblockt. Bevor die Zellen mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 37 °C inkubiert werden konnten, mussten sie wiederholt gewaschen werden. Der Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:10.000 in 0,5 % BSA in PBS gelöst und der Anti-Dynein-Antikörper 1:250 ebenfalls in PBS mit 0,5 % BSA verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen zunächst mehrmals mit PBS gewaschen, um den überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Für ca. 30 Minuten wurden im Anschluss die übrigen Bindungsstellen mit einer 3 %igen BSA-Lösung bei 37 °C geblockt, bevor die Zellen mit dem entsprechenden zweiten Antikörper bei 37 °C inkubiert wurden. Die BEAS-2B Zellen, die zuvor mit dem Anti-Dynein-Antikörper behandelt worden waren, wurden in diesem Schritt mit dem FITC-gekoppelten Anti-Rabbit IgG für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Antikörper wurde 1:160 in PBS mit 0,5 % BSA verdünnt. Der entsprechende Sekundärantikörper für die zuvor mit dem Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper behandelten

Zellen war der FITC-gekoppelte Anti-Mouse IgG. Dieser Antikörper wurde ebenfalls in PBS mit 0,5 % BSA gelöst und für 45 Minuten bei 37 °C auf den Zellen belassen. Der FITC-gekoppelte Anti-Mouse Antikörper wurde 1:32 verdünnt. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper wurden die Deckgläschen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Um die Lage der angefärbten Stellen in den Präparaten besser erkennen und zuordnen zu können, wurden die Kerne der Zellen mit dem Kernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid) für 30 Sekunden angefärbt. Nach wiederholtem Waschen wurden die Deckgläschen in einen Tropfen Fluoromount auf einem Objektträger eingebettet, um die Färbung zu konservieren.

Zu beachten ist, dass die beiden verwendeten Farbstoffe FITC und DAPI unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen besitzen (FITC: 495 und 521 nm; DAPI: 358 und 461 nm). Somit liegt das emittierte Licht des FITC-gekoppelten Antikörpers im grünen und des DNA-Farbstoffes DAPI im blauen Bereich. Durch den Einsatz verschiedener optischer Filter können die fluoreszierenden Strukturen unabhängig voneinander sichtbar gemacht und die beiden gleichen Ausschnitte einer Aufnahme mit Hilfe von Bildbearbeitungsprogrammen übereinandergelegt werden.

4.1.3.4 Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Dieser Teil der Arbeit wurde von der Präparation der Zellen bis zur mikroskopischen Untersuchung im Institut für Elektronenmikroskopie in Münster im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Reichelt durchgeführt.

Um die Zellen in Lowicryl einzubetten, wurden sie zunächst über Nacht mit Fixiermitteln in PIPES-Puffer bei 4 °C inkubiert. Nachdem die fixierten Zellen dreimal für jeweils 20 Sekunden bei Raumtemperatur mit PIPES-Puffer gewaschen wurden, fand eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe statt. Für 30 Minuten wurden die Zellen zunächst bei 4 °C in 30 %igen Ethanol, danach für 60 Minuten bei -20 °C in 50 %igen Ethanol entwässert. Danach folgte der längste Inkubationsschritt über

Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 70 %igen Ethanol. Zuletzt folgten die Inkubationsschritte in 90 %igem Ethanol für 60 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und in 100 %igem Ethanol für 120 Minuten, ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Arbeitsschritte der eigentlichen Einbettung erfolgten ebenfalls alle bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dazu wurde Lowicryl und Ethanol zunächst in einem Verhältnis von 1:2 über Nacht auf die Probe gegeben, dann in einem Verhältnis von 1:1 für vier Stunden und schließlich in einem Verhältnis von 2:1 für vier Stunden auf der Probe belassen. Zuletzt erfolgte die Einbettung in reinem Lowicryl über Nacht. Die Probe wurde weiter aufbereitet, indem sie auf $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ herunter gekühlt wurde und für mehrere Tage mit UV-Licht polymerisiert wurde. Um die Probe später im TEM untersuchen zu können, mussten Ultradünnschnitte (80 nm) der Präparate hergestellt werden und diese auf mit Pioloform befilmten Nickelnetzen (200 mesh) aufgebracht werden. Für das eigentliche Labeling der Präparate wurden die Proben zunächst in PBS-Puffer mit 5 % BSA (pH 7,4) für 15 Minuten geblockt. Danach erfolgte der Inkubationsschritt mit dem ersten Antikörper. Der Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:150 für zwei Stunden auf die Probe gegeben und der Anti-Dynein-Antikörper in einer Konzentration von 1:5. Nach einigen Waschschritten mit PBS-Puffer (pH 7,4) und Tris-BSA-Puffer (pH 8,2) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, dem goldmarkierten Antikörper. Für die Probe des Anti- β_1 -Tubulin-Antikörpers wurde dieser Antikörper 1:10 und für die Probe des Anti-Dynein-Antikörpers 1:20 verdünnt. Nach den letzten Waschschritten mit Tris-BSA-Puffer und Aqua bidest konnte im letzten Schritt die Kontrastierung erfolgen. Dazu wurde die Doppelkontrastierung mit gesättigtem Uranylacetat und Bleicitrat nach *Reynolds* angewendet. Die Kontrollpräparate wurden auf die gleiche Weise präpariert, lediglich die Zugabe des jeweils ersten Antikörpers fehlte.

4.2 Messung der CBF an Trachea-Ringen

Die Messung der CBF an Trachea-Explantaten wurde im Rahmen dieser Arbeit im Arbeitskreis etabliert.

Die ziliäre Schlagfrequenz wurde an Rattentrachea-Explantaten gemessen. Dafür wurden die Tiere zuvor mit einer Ethernarkose getötet, um ihnen die Trachea vom Larynx bis zur Bifurkation entnehmen zu können. Um einen Einfluss der Ethernarkose auf die CBF des entnommenen Organs ausschließen zu können, wurden zu Beginn der Testreihe Vergleichsversuche mit Tieren durchgeführt, die durch eine Barbituratnarkose verstorben waren. Da allerdings keine relevanten Unterschiede der beiden Tötungsarten und damit kein Einfluss der Ethernarkose auf die Messwerte beobachtet wurden, wurden im weiteren Verlauf alle Tiere durch die Ethernarkose getötet.

Nach der Entnahme wurde das Organ in vorgewärmten Puffer gelegt und vorsichtig von Binde- und Fettgewebe befreit. Die Trachea von einer Länge zwischen 1,5-2 cm wurde in ca. 0,5-1 mm dicke Ringe geschnitten. Nachdem die Trachea vorbereitet und präpariert worden war (siehe Abschnitt 2.2), wurden die Trachea-Ringe im vorgewärmten Medium mindestens einen Tag im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um den Nährstoffbedarf decken zu können. Bis zu einer Woche nach der Präparation konnten Basis-CBF zwischen 10-20 Hz gemessen werden. Zu Beginn jeden Versuches wurde nach der Äquilibration des Explantates für jeweils 15 Minuten die Basis-CBF des Präparates aufgenommen, um einen Bezugswert für die nachfolgenden Messungen zu erhalten. Dafür wurde minütlich die CBF aufgenommen und aus den einzelnen Ergebnissen ein Durchschnittswert ermittelt. Auf die gleiche Weise wurden die CBF-Veränderungen durch die verschiedenen Substanzkonzentrationen über einen Zeitraum von jeweils 20 Minuten bestimmt. Da alle getesteten Substanzen in aufsteigenden Konzentrationen auf ihre CBF-Beeinflussung untersucht werden sollten, musste zuvor das Medium aus der Kammer vollständig entfernt werden. Durch mehrmaliges Spülen der Kammer vor der Inkubation des Ringes mit der jeweils nächsthöheren Konzentration konnte gewährleistet werden, dass das zufließende Medium nicht durch verbliebenes geringer konzentriertes verdünnt wurde. Während dieser Spülphase war es wichtig,

die Geschwindigkeit des Mediums nicht zu verändern, da ein schnellerer Zu- und Abfluss die ziliäre Schlagfrequenz und damit den nachfolgenden Versuch beeinflusst hätten.

Der Trachea-Ring wurde während des gesamten Versuches in der Durchflussskammer mit einem Gitter fixiert, um damit ein Verrutschen des Organs während der Zugabe der Substanzen auszuschließen. Der Ratten-Ring wurde nach jeder Konzentrationsreihe durch einen neuen ersetzt.

Da die CBF-Messungen teilweise sehr starken Schwankungen unterliegen, wenn sich die Temperatur während einer Messung verändert, musste eine konstante Temperatur von 37 °C während der Versuche gewährleistet sein^[145]. Daher wurde die Durchflussskammer permanent von einem Heizelement überwacht, welches die Temperatur in der Kammer konstant hielt.

Sämtliche Aufnahmen wurden von einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet. Das Leistungsvermögen der Kamera betrug 100 Bilder pro Sekunde. Die Videosequenzen konnten mit der Basis-Software LabView Vision Acquisition 8.5 und der Auswertungssoftware SAVA 2.02 analysiert werden.

4.3 Primärkultur von Epithelzellen der Schweinetrachea

Um ein schonenderes und tierfreundlicheres Verfahren für die Durchführung von CBF-Messungen einzuführen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode für das Anlegen einer zilienbesetzten Primärkultur entwickelt und im Arbeitskreis etabliert.

Für die Gewinnung von Tracheaepithelzellen wurden Tracheen von frisch geschlachteten Schweinen verwendet. Nach dem Transport der Organe unter Kühlung wurde die Trachea zunächst in PBS aufgenommen und gespült. Anhängende Organe, Bindegewebe, Blut und Fett wurden entfernt, wobei die Trachea während des gesamten Vorgangs mit PBS in Kontakt war, um Schäden an den Zilien durch Austrocknung zu vermeiden. Das Organ wurde auf eine Gesamtlänge von ca. 12-15 cm gekürzt und in vier längliche Streifen geschnitten. Über Nacht wurden die Trachea-Streifen bei 4 °C in einer 0,01 % Protease XIV-Lösung inkubiert. Die Inkubationslösung enthielt außerdem 200 U/ml Penicillin, 0,2 mg/ml Streptomycin und 10 µg/ml Amphotericin B^[146-149]. Am nächsten Tag wurde die Protease-Lösung entfernt und die Epithelzellen mit der Rückseite eines Skalpells von der Innenseite der Trachea abgetrennt. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen wurden in einem 10 %igen serumhaltigen Medium aufgenommen und bei 800 U/min für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in dem serumhaltigen Medium resuspendiert und die Zellsuspension, die neben einzelnen Epithelzellen auch noch Zellaggregate enthielt, durch ein 100 µm weites Maschensieb gegeben. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend bei 800 U/min für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in LHC-9 und RPMI-Medium, gemischt im Verhältnis 1:1 unter Zusatz von 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 1 µg/ml Amphotericin B und 0,1 mg/ml L-Glutamin, resuspendiert. 1×10^6 Zellen/cm² wurden in zuvor mit Fibronectin, Kollagen und BSA beschichteten Zellkulturflaschen ausgesät. Im Vergleich zu reinen Plastikoberflächen erhöht sich die Auswachs geschwindigkeit der Primärzellen auf mit Fibronectin und Kollagen beschichteten Kulturschalen. Das Gewebe kann sich innerhalb der ersten drei bis vier Tagen an der Beschichtung anheften und nach sieben bis zehn Tagen beginnt der Auswuchs^[150]. Kollagen und Fibronectin sind physiologisch vorkommende Strukturproteine des bronchopulmonalen Interstitium und der Basalmembranen^[140]. Es hatte sich als positiv erwiesen, den Primärzellen

zunächst nach der Aussaat 1 % Serum zuzusetzen. Es konnte bestätigt werden, dass im Vergleich die Primärzellen mit geringen Konzentrationen Serum im Medium besser und schneller anwuchsen und das Zilienwachstum beschleunigt war^[151, 152].

Da die ausgesäten Zellen bereits nach einigen Tagen das typische Adhäsions- und Proliferationsverhalten zeigten, konnte nach drei Tagen Wachstumszeit das Medium in den Flaschen gewechselt werden, ohne einen Verlust von intakten Zellen zu befürchten. Das serumhaltige Medium wurde dann durch serumfreies Medium ersetzt, da nur unter serumfreien Bedingungen Zilienwachstum zu erwarten ist^[153]. Die Zellen wiesen zunächst eine kleine, rundliche Form auf und wuchsen in Inseln. Im späteren Verlauf kam es zu einer gleichmäßigen Ausbreitung über den gesamten Zellkulturflaschenboden. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel mit vorgewärmtem Medium durchgeführt, mit dem nicht-adhärenente Zellen, Zelldebris und Erythrozyten entfernt werden konnten. Sobald die Epithelzellen zu 70 % konfluent gewachsen waren, wurden sie mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und erneut ausgesät. Für die Beobachtung und Messung der CBF wurden die Zellen auf Air-Liquid-Inserts mit einer transparenten und zuvor beschichteten 0,4 µm PET-Porenmembran ausgesät und nach drei Wochen konnten die Versuche durchgeführt werden. Dafür wurden die Membranen mit Hilfe eines Skalpells heraus geschnitten und kopfüber in die mit angewärmtem Medium gefüllte Durchflussskammer gegeben. Der weitere Versuchsaufbau und die Durchführung waren dem des Rattentrachea-Modells ähnlich (siehe Kapitel 4.2).

Für die Messung der CBF konnten nur die ersten beiden Passagen der Primärkultur verwendet werden, da mit zunehmendem Alter der Kultur die Zilienmotilität und das Zilienwachstum abnahmen^[144]. Das bedeutet, die Ausdifferenzierung des Bronchialepithels hin zu den zilientragenden Zellen konnte nur am Anfang der Kultivierung beobachtet werden.

Neben einer sichtbaren morphologischen Veränderung der Bronchialepithelzellen, wie die Zunahme der Zellgröße und die Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit über mehrere Passagen, nahm auch die Vitalität der Zellen ab. Somit musste die Kultivierung der Zellen nach der zehnten Passage abgebrochen werden.

4.4 CBF-Messung an isolierten Axonemen

Eine weitere Möglichkeit, die CBF-Veränderungen an Zilien messen zu können, beruht auf der schon von Hastie *et al.*, Sisson *et al.* und Vent *et al.* beschriebenen Methode^[130, 136, 137, 146]. Diese Methode soll im Rahmen dieser Arbeit mit den anderen Methoden der CBF-Messung verglichen werden und wurde dafür im Arbeitskreis etabliert. Dazu wurde wie bei der Kultivierung der Primärzellen die Trachea von frisch geschlachteten Schweinen verwendet. Diese wurde zunächst von Fett- und Bindegewebe befreit und mit eiskalter PBS-Lösung zweimal gespült. Die Trachea wurde auf eine Gesamtlänge von ca. 10-12 cm gekürzt und in ein 50 ml Tube gegeben. Mit 20 ml Extraktionspuffer wurde das Organ für 90 Sekunden kräftig geschüttelt und die dabei abgelösten Zellen und Zellaggregate durch ein 100 µm weites Edelstahl-Maschensieb abfiltriert. Das Filtrat wurde bei 17.250 x g für sieben Minuten in einer Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und das Pellet, welches die Axoneme enthielt, wurde in Resuspensionspuffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 25 %iger Sucroslösung (m/V) bei -80 °C eingefroren. Sechs Monate lang konnten die durch diese Methode gewonnenen Zilien verwendet werden.

Für die CBF-Messungen wurden die eingefrorenen Suspensionsaliquote langsam unter Eiskühlung bei 4 °C aufgetaut und resuspendiert. Die Axoneme zeigten danach eine Eigenrotation von ca. 2 Hz, allerdings hielt diese nicht über einen längeren Zeitraum an, da den Axonemen Energie fehlte. Die isolierten Axoneme wurden mit den zu testenden Substanzen, gelöst in Resuspensionspuffer, in einem Probenröhrchen vermischt und bei 0 °C für 30 Minuten inkubiert. Für die Negativprobe wurden die isolierten Axoneme unter gleichen Temperatur- und Zeitbedingungen nur in Resuspensionspuffer belassen. 10 µl dieser Suspensionslösungen wurden auf einen Objektträger pipettiert und unter einem Deckgläschen fixiert. Durch Zugabe von 10 µl 2,5 mmolarer ATP-Lösung unter das Deckgläschen konnte die CBF über die gesamte Versuchszeit um weitere 3 Hz erhöht werden. Die Rotationen der Axoneme konnten mit der Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen und mit Hilfe der Software ausgewertet werden. Somit konnte ein konstanter Basiswert über 15 Minuten aufgezeichnet werden, auf den sich die Werte der Proben beziehen. Der durchschnittliche Basiswert sowie die CBF-Veränderungen durch die Substanzen wurden wie bei den

anderen Methoden aus den minütlich aufgezeichneten ziliären Schlagfrequenzen berechnet.

4.5 EpiAirway™ Einsätze

Die kommerziell erhältlichen EpiAirway™ Einsätze (AIR-100) beschreiben die letzte Methode zur Messung der CBF, die in dieser Arbeit untersucht, verglichen und bewertet wurde. EpiAirway™ Einsätze bestehen aus Membranen, die eine Kultivierung von Zellen an der Air-Liquid-Schranke ermöglichen (siehe Kapitel 4.1.3.1). Auf den Membranen sind humane Tracheaepithelzellen von gesunden Spendern gewachsen. Da sie direkt nach der ersten Passage ausgesät wurden, konnte ein Zilienwachstum beobachtet werden, welches durch Aufnahmen mit einem Elektronenmikroskop bestätigt werden konnte (siehe Abschnitt 5.3). Die Zellen wurden am 20. Tag nach der Aussaat verschickt, um ein optimales Zilienwachstum gewährleisten zu können^[144]. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden die Einsätze in 24er-Well-Zellkulturplatten mit Zellmedium versorgt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ aufgehoben. Nach einer anfänglichen Äquilibrierungszeit von ca. 16-18 Stunden konnten die Membranen für die Versuche verwendet werden. Aufgrund des täglichen Mediumwechsels auf der basolateralen Seite konnten die Membranen eine gute Woche für die CBF-Messung genutzt werden. Nach einer Woche verloren die Zilien jedoch an Aktivität und der durchschnittliche CBF-Basiswert sank von ursprünglichen 15 Hz auf später durchschnittliche 8 bis 10 Hz. Von der apikalen Seite waren die Zellen der Luft ausgesetzt, um ein vergleichbares physiologisches Milieu zu imitieren, wie es *in vivo* vorherrscht. Die Membranen wurden für den Versuch aus den Einsätzen vorsichtig mit einem Skalpell herausgeschnitten und kopfüber in die mit auf 37 °C vorgewärmtem Medium gefüllte Perfusionskammer gegeben. Um einen kontinuierlichen, pulsarmen und volumenkonstanten Austausch des Mediums während der Versuche gewährleisten zu können, wurde mit einer Perfusionspumpe Medium abgesogen, damit kontinuierlich frisches Medium hinzuströmen konnte. Dieser Versuchsaufbau war für eine korrekte Messung essenziell, damit die Membran während der gesamten Versuchsdauer mit frischem Medium umgeben war und die Nährstoffzufuhr über die Versuchslänge gewährleistet werden konnte. Außerdem konnte auf diese Weise

sichergestellt werden, dass die aufgenommene CBF nicht durch äußere Faktoren wie diskontinuierliche Fließgeschwindigkeit beeinflusst werden konnte. Für den Basiswert, der zu Anfang jeden Versuches aufgenommen wurde, wurde die Membran ausschließlich mit dem LHC-9 Medium umspült. Dieses Medium diente im Folgenden auch als Lösungsmittel für die zu testenden Substanzen. Über Perfusionspritzen, ein Schlauchsystem und ein Heizelement wurde das Medium kontinuierlich in die Perfusionskammer geleitet. Die CBF-Veränderungen wurden erst nach der Zeit mit in die Auswertung genommen, nach der das zweifache Volumen der Perfusionskammer durch das Schlauchsystem geflossen war. Die durchschnittlichen CBF-Veränderungen wurden wie bei den anderen Modellen durch die über mindestens 20 Minuten minütlich aufgezeichneten Frequenzen berechnet. EpiAirway™ Einsätze sind auch mit humanen Bronchialepithelzellen von Asthmatikern, Rauchern und COPD-Patienten erhältlich. Unter gleichen Versuchsbedingungen könnten somit in weiteren Untersuchungen Unterschiede der verschiedenen Zellen bezüglich der CBF-Veränderungen beobachtet und ausgewertet werden.

4.5.1 Aufnahmen der auf den EpiAirway™ gewachsenen primären Bronchialepithel-Humanzellen

Rasterelektronenmikroskopie

Die Aufnahmen der EpiAirway™-Kulturen mit dem Rasterelektronenmikroskop erfolgten im Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Dafür wurden die bewachsenen Membranen mit 2,5 %igem Glutardialdehyd überschichtet und im Arbeitskreis für Elektronenmikroskopie und Analytik für die Aufnahmen vorbereitet.

Transmissionselektronenmikroskopie

Auch die Präparation und die Aufnahmen der EpiAirway™-Kulturen mit dem Transmissionselektronenmikroskop erfolgten im Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, im Arbeitskreis für Elektronenmikroskopie und Analytik.

Dafür wurden die Zellen mit 2,5 %igem Glutardialdehyd in Sørensen's Phosphatpuffer (SPP) fixiert, anschließend mit SPP gewaschen und mit 1 %igem Osmiumtetroxid (OsO_4) in SPP nachfixiert. Bei der chemischen Fixierung der Zellen erfolgte eine Quervernetzung, wodurch zelluläre Strukturen stabilisiert und eine Dislokation oder Aggregation von Makromolekülen während der Präparation vermieden wurden. Dabei wurden bei der Fixierung mit Aldehyden hauptsächlich Proteine und bei der Nachfixierung mit OsO_4 eher Lipide vernetzt.

Vor der Kunstharzinfiltration musste der zelluläre Wasseranteil durch organische Lösungsmittel ersetzt werden, da Kunstharze mit Wasser nicht mischbar sind. In diesem Fall erfolgte die Entwässerung der Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe und in Propylenoxid.

Als Einbettmedium wurde Spurr eingesetzt, ein Epoxidharz, das je nach Zusammensetzung in unterschiedlichen Härtegraden verwendet werden kann. Die Infiltration mit diesem Kunstharz erfolgte zunächst in mehreren Mischstufen aus Spurr und Propylenoxid und dann mit reinem Spurr. Die infiltrierten Zellen wurden in Kapseln gegeben, diese mit Spurr aufgefüllt und zentrifugiert. Nach anschließender Polymerisation bei 70 °C für mindestens acht Stunden lagen ausgehärtete Präparatblöcke vor, aus denen ultradünne (ca. 50-80 nm), für den Elektronenstrahl transparente Schnitte hergestellt werden konnten. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

4.6 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Als Grundlage dient die Anzahl n der unabhängigen Versuche. Die statistische Auswertung wurde mit der Einweg-Varianz-Analyse (ANOVA) und anschließendem t-Test nach Student durchgeführt. Die Ergebnisse gelten als statistisch signifikant, wenn $p < 0,05$ erreicht ist.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot von SYSTAT Software Inc., USA verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 BEAS-2B Zellen

5.1.1 Immunologische Untersuchungen:

Messung der RANTES-Konzentration im Überstand

RANTES, ein Chemokin der IL-8 Familie (CCL5), wird bei vielen pathologischen Veränderungen des Bronchialepithels von den Zellen sezerniert. Immunologische sowie entzündliche Erkrankungen der Atemwege führen zur vermehrten Freisetzung des Chemokins aus den Bronchialepithelzellen, den Makrophagen, Lymphozyten sowie den Eosinophilen (siehe Kapitel 1.5.1).

Da man inzwischen weiß, dass β -Rezeptor-Agonisten, die einen festen Platz in der Therapie des Asthma bronchiale haben, neben ihrer spasmolytischen Eigenschaft einen günstigen, reduzierenden Einfluss auf die RANTES-Exprimierung haben^[2], war es Gegenstand dieser Arbeit, weitere Substanzen bezüglich ihres Einflusses auf die RANTES-Konzentration zu untersuchen.

Dafür wurden die BEAS-2B Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen für jeweils eine halbe Stunde vorinkubiert, um die Zellen danach mit TNF- α 10 ng/ml und IFN- γ 10 ng/ml zur RANTES-Produktion zu stimulieren. Mit Hilfe eines Sandwich-ELISA wurden nach insgesamt 24 Stunden Inkubation die RANTES-Konzentrationen im Überstand gemessen. Unstimulierte BEAS-2B Zellen sezernierten nach 24 Stunden und nach 48 Stunden kein RANTES (Daten erhoben, aber nicht gezeigt).

In den Arbeitsgruppen von Stellato *et al.*, Wang *et al.*, Wingett *et al.* und Meyer *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von Glucokortikoiden, z. B. im Rahmen des Asthma bronchiale, zu einer signifikanten RANTES-Reduzierung führt^[1, 154-156].

Um die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bezüglich der Reduzierung der RANTES-Konzentration nach Inkubation mit einem β -Rezeptor-Agonisten zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Konzentration von RANTES auch nach Inkubation mit Isoprenalin und dem β_2 -selektiveren Salbutamol gemessen.

Salbutamol und Isoprenalin

Salbutamol als β_2 -Agonist kann die Freisetzung des Chemokins aus den Zellen in den Überstand konzentrationsabhängig reduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Salbutamol in den Konzentrationen 10, 20, 50, 100, 250, 500 und 1000 μM im RANTES-ELISA eingesetzt, um zu überprüfen, in welchem Ausmaß es die Freisetzung von RANTES nach Stimulation der Zellen verhindern kann. In der höchsten eingesetzten Konzentration von 1000 μM hemmte es die RANTES-Konzentration im Überstand auf 63,25 % ($p < 0,01$), bezogen auf die Kontrolle. Bereits die geringste eingesetzte Salbutamol-Konzentration von 10 μM senkte die RANTES-Konzentration signifikant auf 97,25 % ($p < 0,05$). Die Signifikanz wird auf die Kontrolle der maximalen Stimulation bezogen (siehe Abb. 5.1).

Der unselektive β -Rezeptor-Agonist Isoprenalin konnte im Vergleich zu Salbutamol die RANTES-Konzentration dagegen mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 200 μM nur auf 85,07 % ($p < 0,05$) senken. 50 und 100 μM Isoprenalin reduzierten die Chemokin-Freisetzung auf 94,5 bzw. 94,22 % ($p < 0,05$) (siehe Abb. 5.1).

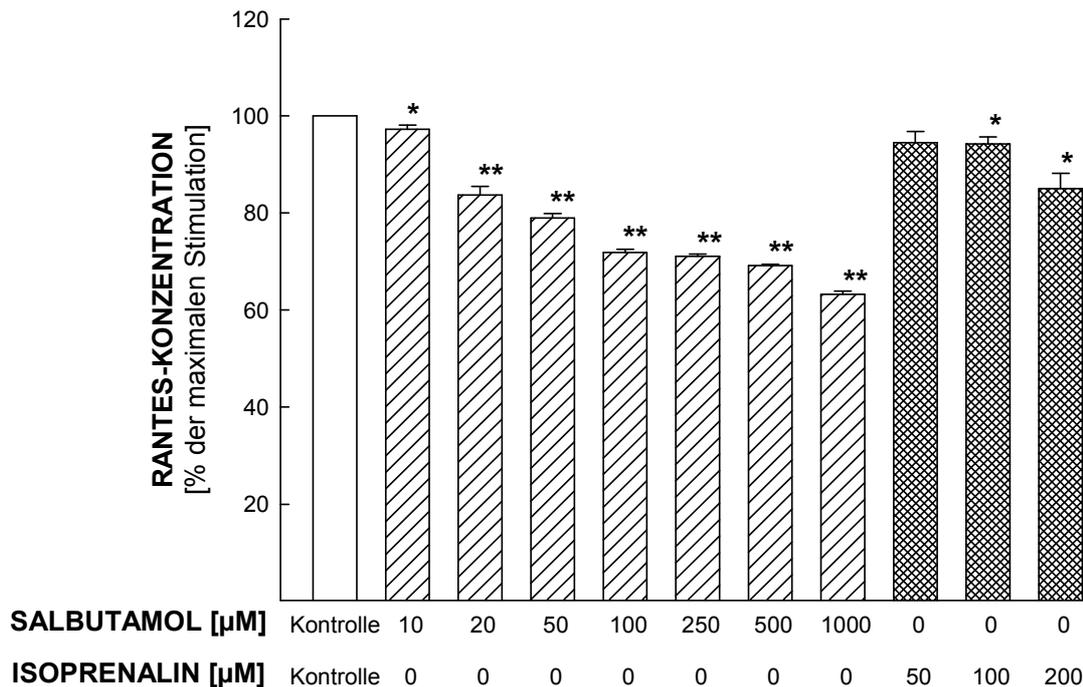


Abb. 5.1: Durch Salbutamol und Isoprenaline induzierte Senkung der RANTES-Konzentration

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der RANTES-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen erfolgte mittels ELISA.

Alle Werte sind auf die maximale Stimulation der Zellen (Kontrolle) bezogen; n = 4 + SEM; *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Silymarin und Harpagosid

Die in dieser Arbeit getesteten Silymarin-Konzentrationen 10, 20, 50 und 100 µM zeigten eine konzentrationsabhängige Reduzierung von RANTES im Überstand der BEAS-2B Zellen. Bereits die geringste Silymarin-Konzentration von 10 µM reduzierte die Chemokin-Konzentration auf 79,09 % (p < 0,05). 20 µM Silymarin senkte sie weiter auf 63,75 %, 50 µM auf 11,79 % bis sie nach der Inkubation mit der höchsten eingesetzten Silymarin-Konzentration von 100 µM auf 6,11 % (alle p < 0,01) reduziert werden konnte (siehe Abb. 5.2).

Ebenfalls wurden vier verschiedene Konzentrationen von Harpagosid auf den gleichen Parameter getestet. Nach der Inkubation der BEAS-2B Zellen mit den unterschiedlichen Harpagosid-Konzentrationen (10, 20, 50 und 100 µM) konnte eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Chemokin-Freisetzung beobachtet

werden. Eine Reduzierung auf 80,56 % ($p < 0,01$) der RANTES-Spiegel im Überstand der Bronchialepithelzellen wurde bereits mit 20 μM Harpagosid erreicht. 50 und 100 μM Harpagosid reduzierten die RANTES-Konzentration weiter auf 70,69 bzw. 66,4 % (beide $p < 0,05$) (siehe Abb. 5.2).

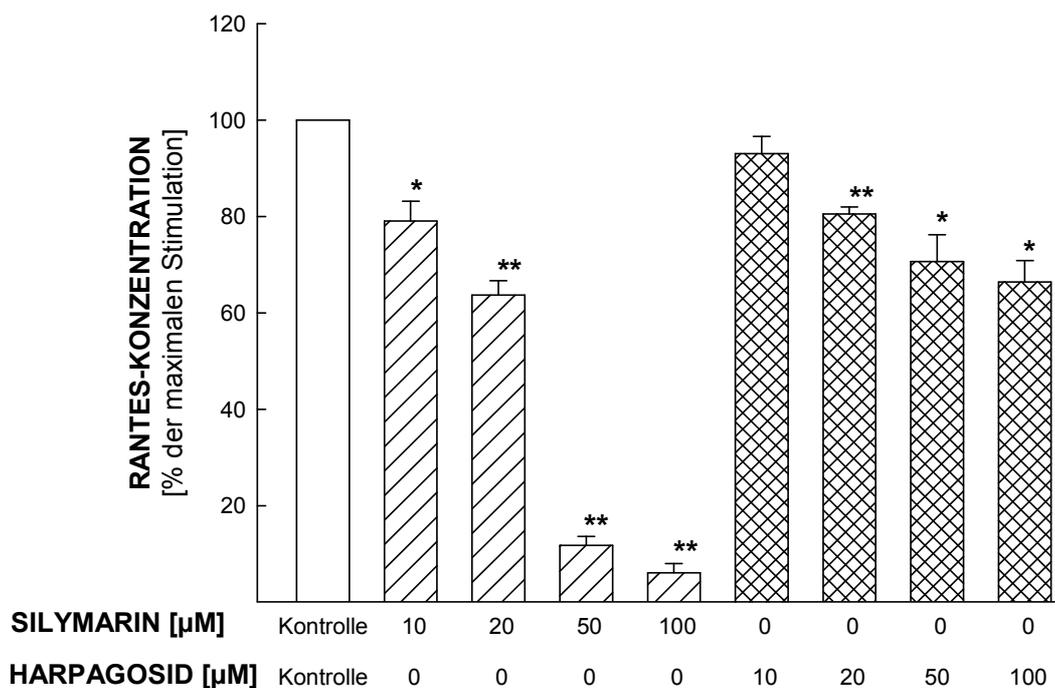


Abb. 5.2: Durch Silymarin und Harpagosid induzierte Senkung der RANTES-Konzentration

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der RANTES-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen erfolgte mittels ELISA.

Alle Werte sind auf die maximale Stimulation der Zellen (Kontrolle) bezogen; $n = 3-4 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Xylometazolin und Benzalkoniumchlorid

Das α -Sympathomimetikum Xylometazolin konnte in dem beschriebenen Modell die RANTES-Freisetzung auf ein Minimum reduzieren. Schon in der geringsten eingesetzten Konzentration von 0,025 % Xylometazolin konnte die RANTES-Konzentration, bezogen auf die Kontrolle, komplett gehemmt werden. Das gleiche gilt für die beiden anderen Xylometazolin-Konzentrationen von 0,05 und 0,1 % (alle $p < 0,01$) (siehe Abb. 5.3).

Der Einfluss des Benzalkoniumchlorids auf die RANTES-Freisetzung wurde im Rahmen dieser Methode überprüft, indem sowohl die unstimulierten als auch die mit dem Zytokin-Mix stimulierten Zellen mit dem Konservierungsmittel für 24 Stunden inkubiert wurden. Es sollte untersucht werden, ob Benzalkoniumchlorid konzentrationsabhängig in der Lage ist, die RANTES-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle weiter zu erhöhen.

In beiden Testreihen konnten allerdings mittels ELISA im Überstand der inkubierten Zellen keine RANTES-Spiegel gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

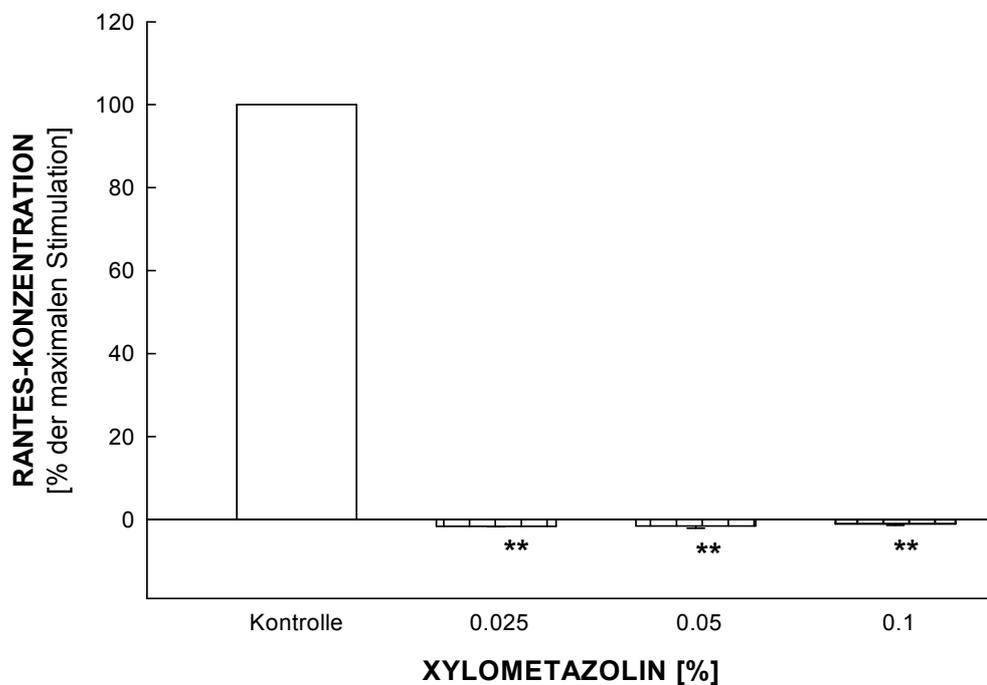


Abb. 5.3: Durch Xylometazolin induzierte Senkung der RANTES-Konzentration

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert. Die Bestimmung der RANTES-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen erfolgte mittels ELISA.

Alle Werte sind auf die maximale Stimulation der Zellen (Kontrolle) bezogen; n = 3 + SEM; **: p < 0,01.

Thymol und Myrtol

Thymol wurde im RANTES-ELISA in den Konzentrationen 50, 100, 250, 500 und 1000 μM eingesetzt und auf die Beeinflussung der RANTES-Freisetzung aus den Bronchialepithelzellen getestet. Während die beiden geringeren Thymol-Konzentrationen 50 und 100 μM die RANTES-Freisetzung nicht hemmen konnten, ging die Konzentration des Chemokins nach der 24stündigen Inkubation mit 250 μM Thymol auf 85,81 % zurück. Bei den beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen 500 und 1000 μM Thymol konnte RANTES sogar auf 3,52 bzw. 0 % (alle $p < 0,01$) gesenkt werden (siehe Abb. 5.4)

Myrtol konnte in den hier eingesetzten Konzentrationen von 0,05 und 0,1 % bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit dem Zytokin-Mix (TNF- α 10 ng/ml und IFN- γ 10 ng/ml) die RANTES-Freisetzung konzentrationsabhängig statistisch signifikant reduzieren ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Die geringste Konzentration von Myrtol (0,01 %) war dagegen nicht in der Lage, den RANTES-Spiegel nach der Inkubation im Überstand der BEAS-2B Zellen zu beeinflussen. Alle Werte sind auf die Kontrolle bezogen, in der die BEAS-2B Zellen durch den Zytokin-Mix maximal stimuliert wurden. Da Myrtol zur besseren Löslichkeit mit Ethanol im Verhältnis 1:10 gemischt werden musste, wurde ebenfalls der Einfluss der entsprechend aufsteigenden Ethanol-Konzentrationen auf den RANTES-Spiegel überprüft. Ethanol zeigte in diesem Modell in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf den RANTES-Spiegel im Überstand der BEAS-2B Zellen, so dass der Unterschied der beiden Myrtol-Konzentrationen 0,05 und 0,1 % zu den jeweiligen Ethanol-Konzentrationen 0,45 und 0,9 % statistisch signifikant ist ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) (siehe Abb. 5.4). Höhere Myrtol-Konzentrationen (0,5 % in 4,5 % Ethanol) konnten nicht ausgewertet werden.

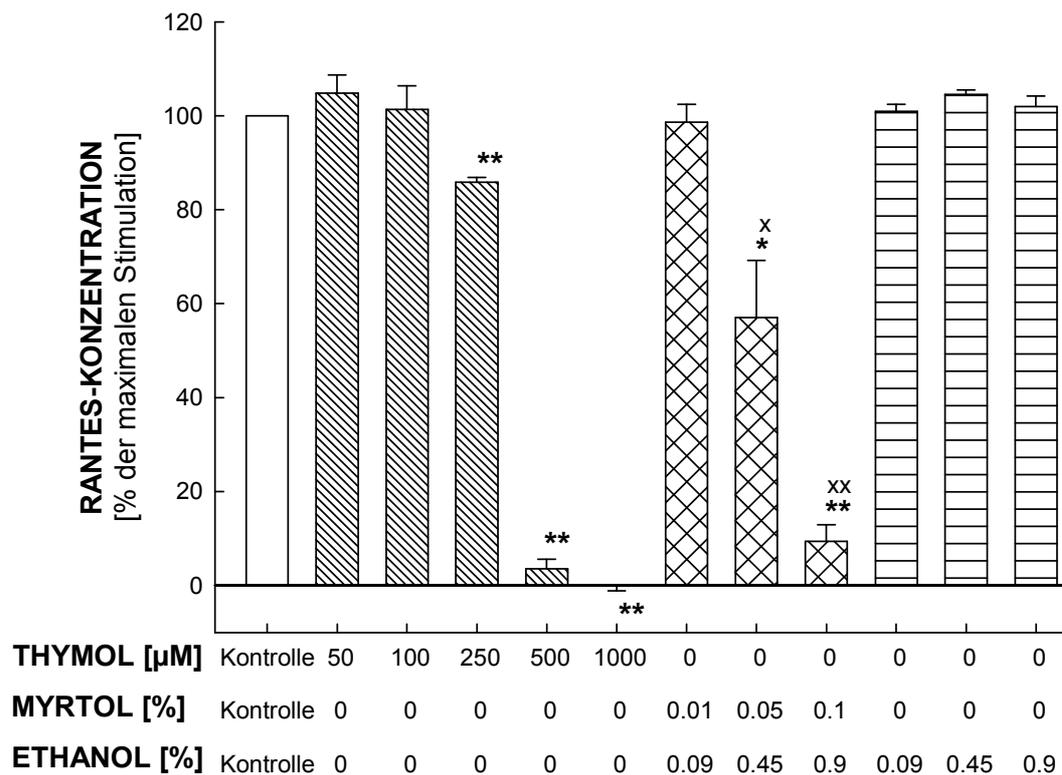


Abb. 5.4: Durch Thymol, Myrtol und Ethanol induzierte Senkung der RANTES-Konzentration

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der RANTES-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen erfolgte mittels ELISA.

n = 3-6 + SEM; *: p < 0,05; **: p < 0,01 bezogen auf die Kontrolle (100 %); x: p < 0,05, xx: p < 0,01 bezogen auf die jeweilige Ethanol-Konzentration.

Ibutilast und Losartan

Der PDE-Hemmer Ibutilast, in diesem Modell in den Konzentrationen von 50, 100 und 200 µM eingesetzt, konnte die Freisetzung von RANTES in den Überstand der Zellen konzentrationsabhängig senken. Bezogen auf die Kontrolle, deren Chemokin-Sekretion als 100 %-Wert festgelegt wurde, verringerte die 24stündige Inkubation der Zellen mit 50 µM Ibutilast die Freisetzung auf 89,91 %. Bei 100 µM Ibutilast ging die Konzentration von RANTES im Überstand weiter zurück auf 86,97 % und mit 200 µM auf 71,75 % (p < 0,05) (siehe Abb. 5.5).

Um den Einfluss des AT₁-Rezeptor-Blockers Losartan auf die RANTES-Spiegel zu untersuchen, wurden die BEAS-2B Zellen für 24 Stunden mit drei unterschiedlichen Konzentrationen des Sartans inkubiert. Alle drei Konzentrationen von 50, 100 und 200 µM waren nicht in der Lage die RANTES-Spiegel signifikant zu reduzieren (siehe Abb. 5.5).

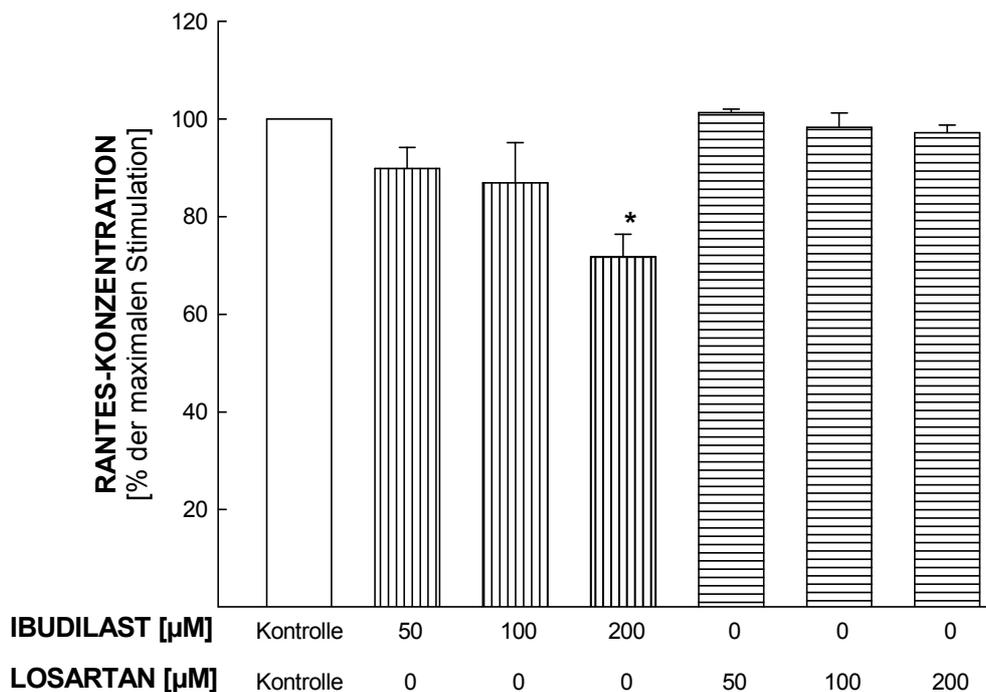


Abb. 5.5: Durch Ibudilast und Losartan induzierte Senkung der RANTES-Konzentration

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der RANTES-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen erfolgte mittels ELISA.

Alle Werte sind auf die maximale Stimulation der Zellen (Kontrolle) bezogen; n = 3-5 + SEM; *: p < 0,05.

Vitamin D₃ und Aspecton[®] Hustentropfen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die Vitamin D₃-Konzentrationen 100 pM, 1 nM, 100 nM und 1 µM auf ihre immunmodulierende Wirkung bezüglich der Reduzierung des CCL5-Chemokins getestet. Sie zeigten eine konzentrationsabhängige Reduzierung der RANTES-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen. In Bezug auf den Kontrollwert, den Zytokin-Mix, konnte das Vitamin D₃ in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 µM die Produktion auf 71,31 %

reduzieren. Bereits in der niedrigsten Konzentration von 100 pM war die RANTES-Freisetzung auf 89,95 % gehemmt ($p < 0,05$). Mit einer 1 und einer 100 nM Vitamin D₃-Lösung wurde sie auf 83,18 bzw. 77,74 % ($p < 0,05$) gesenkt (siehe Abb.5.6).

Das Fertigarzneimittel Aspecton[®] Hustentropfen besteht aus einem Thymiankraut-Dickextrakt (1,7-2,5:1) mit einem Anteil von 2,114 g Thymiankraut pro 10 ml. Daneben enthält das Präparat Eukalyptusöl und Levomenthol sowie als Auszugsmittel Ammoniaklösung 10 % (m/m), Glycerol 85 % (m/m), Ethanol 90 % (V/V) und Wasser (1:20:70:109). Aspecton[®] Hustentropfen werden in der Therapie der akuten Bronchitis und bei Erkältungskrankheiten der Atemwege mit zähflüssigem Schleim eingesetzt^[129]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit es zusätzlich in der Lage ist auch die RANTES-Konzentration im Überstand der Bronchialepithelzellen zu reduzieren. In dem RANTES-ELISA wurden Aspecton[®]-Konzentrationen von 0,5 und 2 mg/ml eingesetzt. Die Hustentropfen konnten in den entsprechenden Konzentrationen das Chemokin nach 24stündiger Inkubation mit den BEAS-2B Zellen auf 75,27 ($p < 0,05$) bzw. auf 20,66 % ($p < 0,01$) reduzieren (siehe Abb. 5.6).

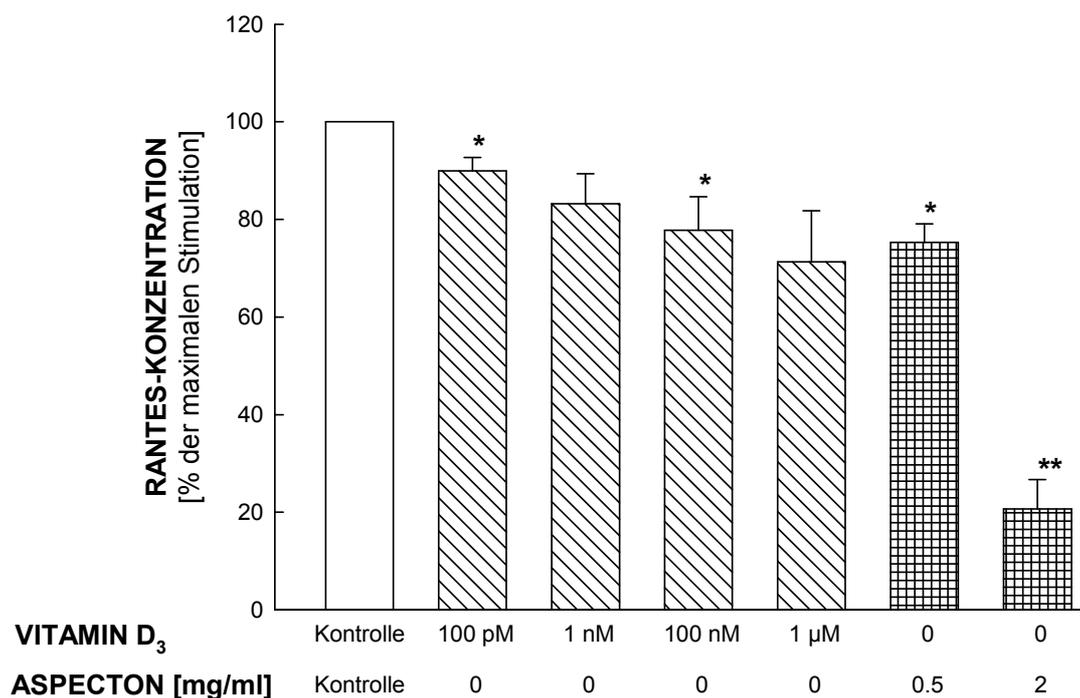


Abb. 5.6: Durch Vitamin D₃ und Aspecton[®] Hustentropfen induzierte Senkung der RANTES-Konzentration

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der RANTES-Konzentration im Überstand der BEAS-2B Zellen erfolgte mittels ELISA.

Alle Werte sind auf die maximale Stimulation der Zellen (Kontrolle) bezogen; n = 3-4 + SEM; *: p < 0,05; **: p < 0,01.

5.1.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität: Messung der LDH-Konzentration im Überstand

Sämtliche Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit bezüglich der von ihnen ausgelösten immunologischen Reaktion an BEAS-2B Zellen sowie auf ihren Einfluss auf die CBF untersucht werden, sollen auch auf zytotoxische Eigenschaften analysiert werden. Dafür wurde mittels eines LDH-Zytotoxizitäts-Tests die LDH-Konzentration gemessen, die nach Inkubation der zu testenden Substanzen mit BEAS-2B Zellen von den Zellen aufgrund der Zerstörung der Plasmamembran in den Überstand abgegeben wurde. Dabei verhält sich die Menge der gemessenen LDH proportional zur Zellyse. Die in diesem Test eingesetzten Substanzen waren die beiden β -Sympathomimetika Salbutamol und Isoprenalin. Außerdem wurden die Substanzen Silymarin, Harpagosid, Vitamin D₃, Benzalkoniumchlorid, die beiden ätherischen Öle Myrtol und Thymol, Xylometazolin sowie das Fertigarzneimittel Aspecton[®] Hustentropfen in diesem Modell auf ihre Zytotoxizität überprüft. Das Ausmaß der LDH-Freisetzung und damit die Stärke der Zytotoxizität werden im Folgenden in Prozent angegeben und auf den maximalen LDH-Gehalt der Positivprobe bezogen, die bei jedem Versuch mitbestimmt wurde. Bei der Positivprobe wurde mittels eines Lysierungsreagenz eine vollständige 100 %ige Zellyse ausgelöst. Um die korrekte Durchführung des Tests gewährleisten zu können, wurden außerdem zusätzlich bei jedem Versuch Kontrollwerte ermittelt. Zum einen wurde jedes Mal die Negativprobe gemessen, d. h. die minimale, spontane LDH-Aktivität der unbehandelten BEAS-2B Zellen, die ausschließlich mit dem Medium für die vorgeschriebene Zeit inkubiert wurden. Zum anderen wurden auf jeder vermessenen Mikrowell-Platte Substanzkontrollen der jeweiligen eingesetzten Substanzen bestimmt, um einen Einfluss auf die LDH-Aktivität ausschließen zu können. Dazu wurde nur die zu testende Substanz in der entsprechenden Konzentration mit den Zellen unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Substanzkontrollen waren für alle hier eingesetzten Substanzen negativ, das bedeutet, sie bewirken alleine keine Freisetzung der LDH. Der Background-Wert (Mediumblindwert), d. h. der Wert, der ausschließlich im Medium gemessen werden konnte, wurde zum Schluss von allen Proben abgezogen.

Durch enzymatische Farbreaktionen konnte die LDH-Konzentration quantitativ bestimmt und daraufhin die Zytotoxizität der einzelnen Substanzen nach folgender Gleichung ermittelt und in Prozent angegeben werden:

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{Probeneffekt} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

Daraus resultierende Zytotoxizitäten einzelner Substanzen $< 0 \%$ ergeben sich, wenn die gemessene Absorption der Proben kleiner ist als die der Negativprobe. Substanzen mit einer Toxizität von $\leq 0 \%$ erhöhen die LDH-Aktivität demnach nicht und sind nicht zytotoxisch.

Salbutamol und Isoprenalin

Salbutamol hatte in allen eingesetzten Konzentrationen 50, 100, 200, 250, 500 sowie 1000 μM keinen negativen Einfluss auf die Zellmembranen der BEAS-2B Zellen. Mit den hier verwendeten Konzentrationen des Salbutamols wurden sie nicht beeinflusst und es wurde keine LDH in den Überstand freigesetzt. Selbst in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mM konnte keine Absorption (Farbreaktion) und damit keine LDH-Aktivität gemessen werden (siehe Abb. 5.7).

Nach der 24stündigen Inkubation der Bronchialepithelzellen mit 100, 250 und 500 μM Isoprenalin wurde ebenfalls keine LDH-Aktivität im Überstand gemessen. Lediglich bei einer Isoprenalin-Konzentration von 1000 μM stieg die Zytotoxizität, bezogen auf die Kontrolle, auf 5,94 % an (siehe Abb. 5.7).

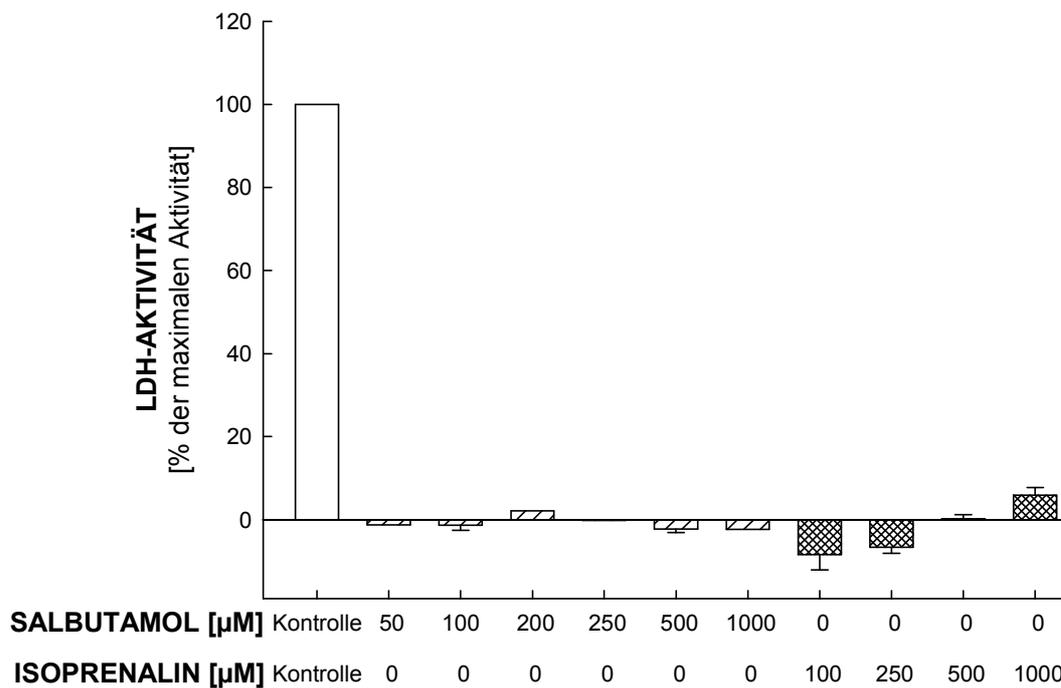


Abb. 5.7: Durch Salbutamol und Isoprenaline induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay.

Alle Werte sind auf die 100 %-Kontrolle bezogen; n = 3-5 + SEM.

Silymarin und Harpagosid

Nach der Inkubation der Bronchialepithelzellen mit unterschiedlichen Silymarin-Konzentrationen konnte keine LDH-Aktivität und somit keine Zytotoxizität gemessen werden. Konzentrationen von 10, 20, 50 µM und selbst die höchste eingesetzte Konzentration von 100 µM Silymarin schädigte die Zellmembranen innerhalb der 24stündigen Inkubationszeit nicht (siehe Abb. 5.8).

Bei Harpagosid, im LDH-Zytotoxizitäts-Test in den Konzentrationen von 10, 20, 50 und 100 µM eingesetzt, konnte ebenfalls keine Schädigung der Zellmembran festgestellt werden. Da keine LDH-Aktivität im Überstand gemessen werden konnte sind die eingesetzten Harpagosid-Konzentrationen nicht zytotoxisch (siehe Abb. 5.8).

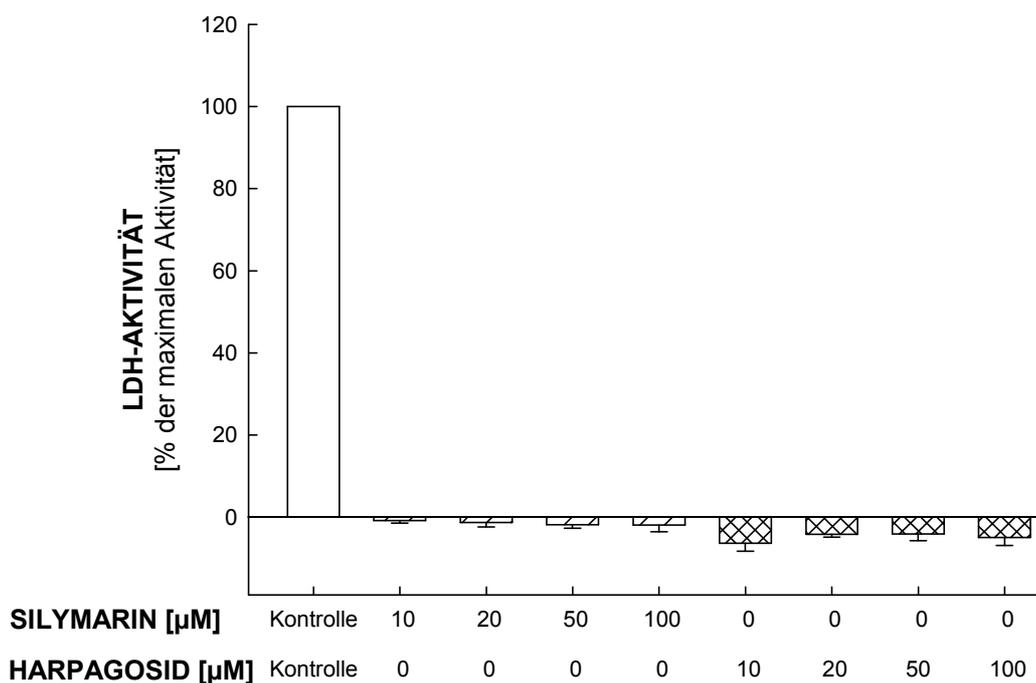


Abb. 5.8: Durch Silymarin und Harpagosid induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay.

Alle Werte sind auf die 100 %-Kontrolle bezogen; n = 3-5 + SEM.

Xylometazolin

Das Sympathomimetikum Xylometazolin wird in Nasensprays zur Engstellung der Gefäße bei akutem Schnupfen verwendet. Es sind Nasensprays, -tropfen und -salben mit unterschiedlichen Xylometazolin-Konzentrationen erhältlich. Für Säuglinge und Kleinkinder stehen Nasentropfen mit 0,025 % und für Kinder bis sechs Jahren Nasensprays mit 0,05 % Xylometazolin zur Verfügung. Für Schulkinder ab sechs Jahren und Erwachsene werden Nasensprays mit 0,01 % Xylometazolin verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die handelsüblichen Konzentrationen von 0,025, 0,05 und 0,1 % Xylometazolin im Hinblick auf die Zytotoxizität überprüft. Schon in der geringsten in Nasensprays bzw. -tropfen eingesetzten Dosierung von 0,025 % Xylometazolin konnte eine deutliche LDH-Aktivität von 71,76 % gemessen werden. Konzentrationsabhängig stieg die LDH-Aktivität der 0,05 % Dosierung auf 80,04 % an und die höchste eingesetzte Dosis von 0,1 % Xylometazolin schädigte die Zellen

derart, dass die LDH-Aktivität nach der Inkubation sogar auf 84,82 % anstieg (alle Werte $p < 0,01$, bezogen auf die Negativprobe (0 % Zytotoxizität), siehe Abb. 5.9). Dieses Ergebnis macht die Bedeutung des verantwortungsbewussten und reduzierten Umgangs von Nasensprays mit dem Sympathomimetikum Xylometazolin deutlich. Die Nutzen-Risiko-Korrelation sollte daher im Einzelfall vor jeder Anwendung sorgfältig überdacht werden.

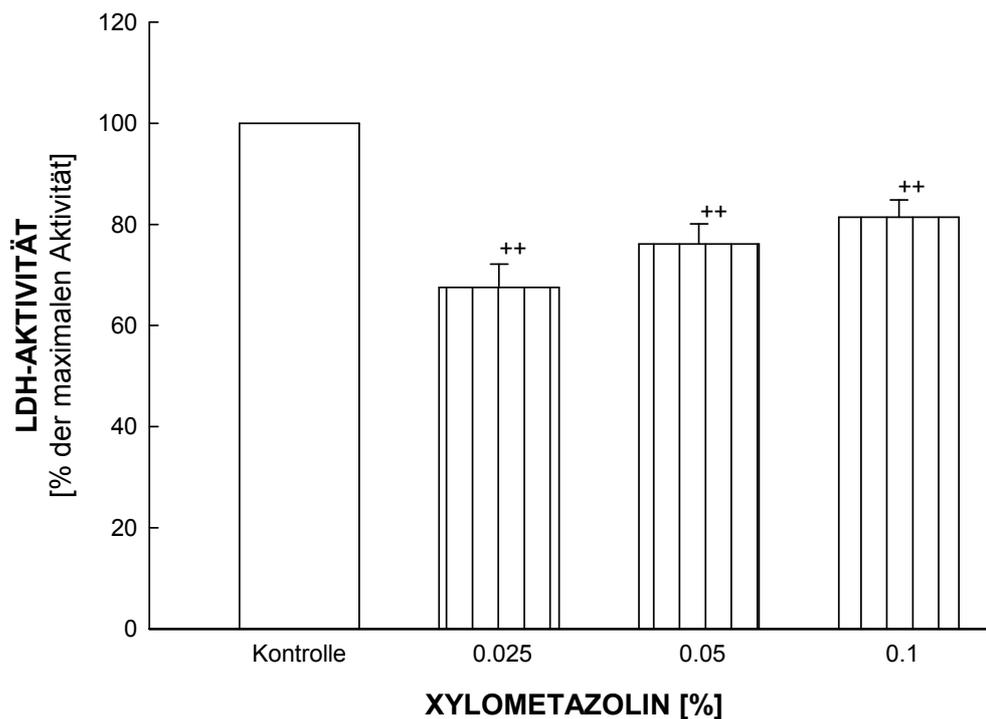


Abb. 5.9: Durch Xylometazolin induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay.

n = 3-5 + SEM, ++: $p < 0,01$ bezogen auf die Negativprobe (0 % Zytotoxizität).

Benzalkoniumchlorid

Da der zilienschädigende Effekt von Benzalkoniumchlorid bereits in mehreren Arbeiten untersucht und gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 1.6.6), sollte ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Bestimmung der Zytotoxizität nach der 24stündigen Inkubation der BEAS-2B Zellen mit dem Konservierungsmittel sein. Da in handelsüblichen Arzneizubereitungen die Benzalkoniumchlorid-Konzentration zwischen 0,005 und 0,02 % liegt, sollten diese auch in dem LDH-Assay eingesetzt werden. Um die Zytotoxizität, die von dem Konservierungsmittel ausgeht, umfangreich charakterisieren zu können, wurden darüber hinaus weitere Konzentrationen in die Analyse mit einbezogen. So wurden Lösungen mit einem Gehalt an Benzalkoniumchlorid von 0,0000001 bis 0,08 % im Zytotoxizitäts-Assay eingesetzt. Auffallend war das Ergebnis bezüglich der mittleren und hohen Konzentrationen. Während Benzalkoniumchlorid bis zu einem Gehalt von 0,0001 % keine zytotoxischen Eigenschaften auf die BEAS-2B Zellen zeigte, konnte bis zu einer Konzentration von 0,002 % eine konzentrationsabhängige Schädigung der Zellen beobachtet werden. Allerdings fiel die Zytotoxizität bei weiter steigenden Konzentrationen wieder ab, bis die hoch konzentrierten Benzalkoniumchlorid-Lösungen (0,04 und 0,08 %) anscheinend keinen schädigenden Einfluss mehr auf die Zelllinie hatten (siehe Abb. 5.10).

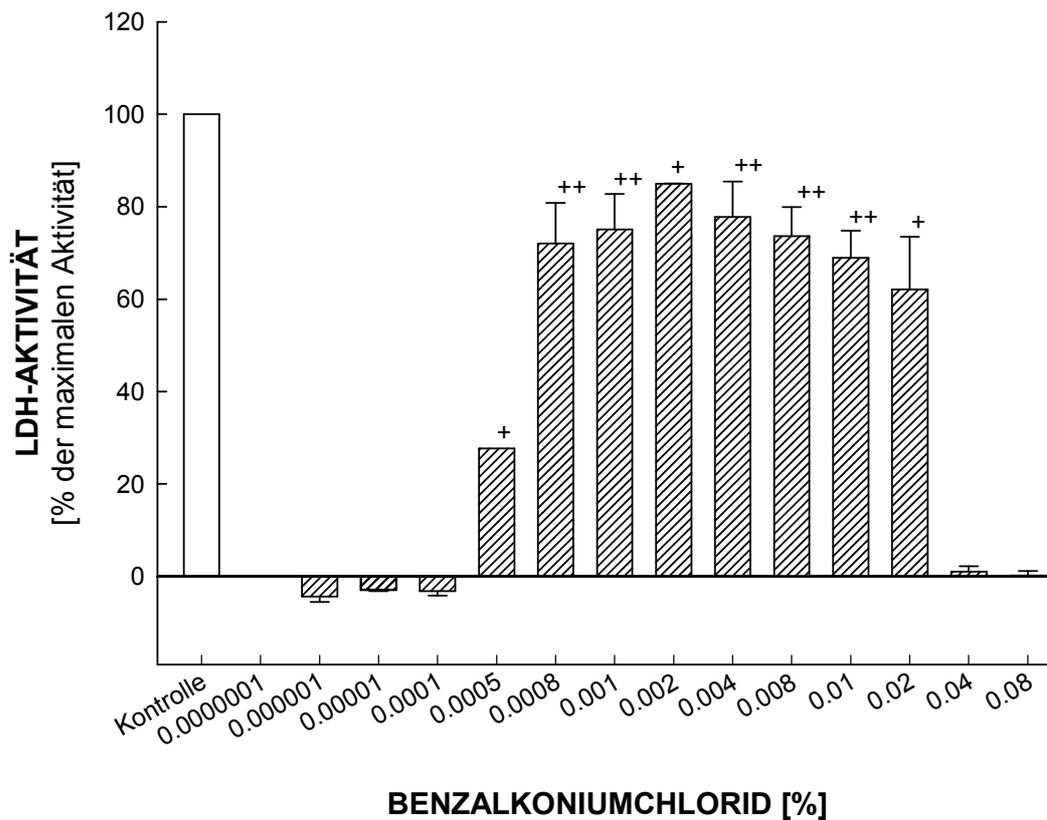


Abb. 5.10: Durch Benzalkoniumchlorid induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay.

n = 3-6 + SEM; +: p < 0,05, ++: p < 0,01 bezogen auf die Negativprobe (0 % Zytotoxizität).

Thymol und Myrtol

Bei den Thymolproben konnte eine konzentrationsabhängige Beeinflussbarkeit der LDH-Aktivität beobachtet werden. Während Thymol in den beiden niedrigeren eingesetzten Konzentrationen von 10 und 100 µM im LDH-Test keine Toxizität zeigte, lag die gemessene LDH-Aktivität bei den höheren Konzentrationen von 500 bzw. 1000 µM bei 3,89 bzw. bei 8,28 % in Bezug auf die 100 % Kontrolle (siehe Abb. 5.11).

Myrtol-Konzentrationen von 0,05 und 0,1 % beeinflussten die LDH-Freigabe ebenso wenig wie die höchste eingesetzte Konzentration des Lösungsmittels Ethanol

(0,9 %). Auch die Einzelbestandteile des ätherischen Öls (Limonen, Cineol, α -Pinen) zeigten in den verwendeten Konzentrationen keine toxischen Effekte (Daten erhoben, aber nicht gezeigt). Lediglich die 24stündige Inkubation der Zellen mit 2 % Myrtol (nicht in Ethanol gelöst) lässt den LDH-Spiegel im Überstand steigen. Dieser Effekt ist allerdings auf die klebrige Eigenschaft des ätherischen Öls zurückzuführen, wenn dieses nicht in Ethanol gelöst wird. Das Myrtol ist somit nicht im Medium löslich und legt sich als klebrige Schicht auf die Zellen, die daraufhin mit der Freisetzung der LDH reagieren. Höhere Konzentrationen von Myrtol und damit auch von Ethanol wurden nicht getestet (siehe Abb. 5.11).

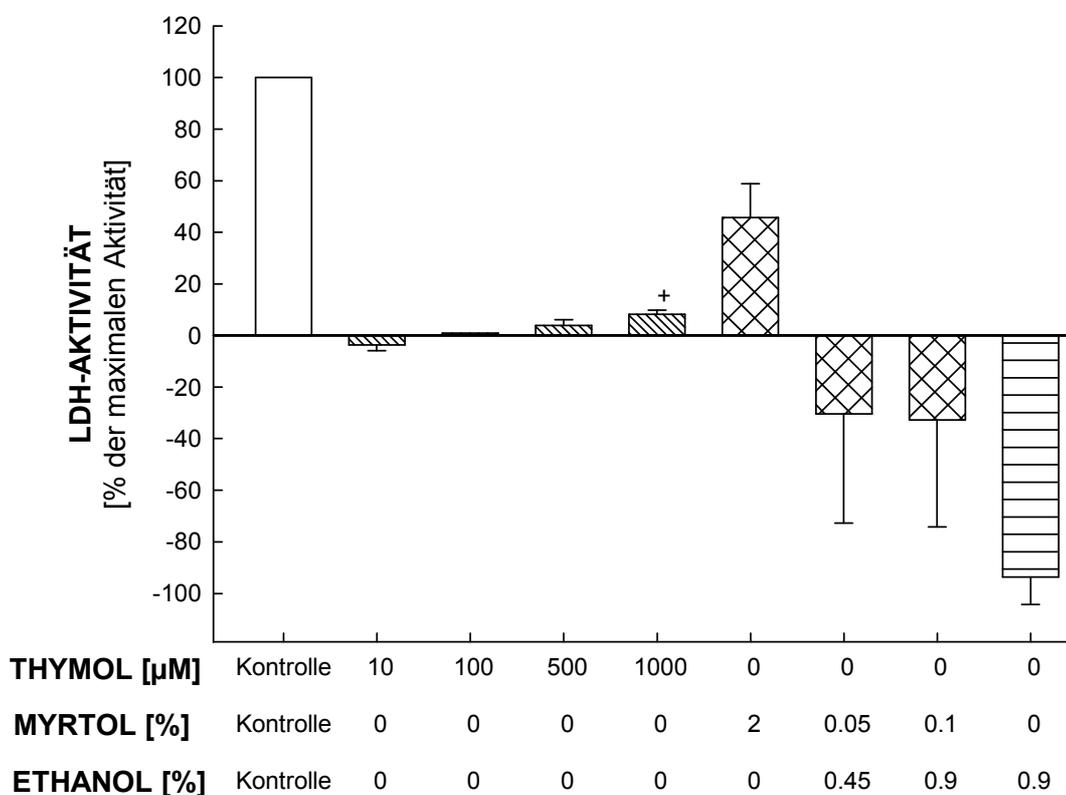


Abb. 5.11: Durch Thymol und Myrtol induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay.

n = 3-5 + SEM; +: p < 0,05 bezogen auf die Negativprobe (0 % Zytotoxizität).

Ibudilast

Wurden die BEAS-2B Zellen mit dem Phosphodiesterasehemmer Ibudilast in den Konzentrationen 50, 100 und 200 μM für 24 Stunden inkubiert, zeigte sich im Überstand der Zellen eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität. Bezogen auf den Kontrollwert, der einer kompletten Lyse und somit einer 100 %igen Schädigung entspricht, konnte im Überstand der 50 μM Ibudilast-Probe eine Zytotoxizität von 4,48 % gemessen werden. 100 μM Ibudilast ließ die Zytotoxizität auf 7,40 % und 200 μM auf 19,47 % ansteigen (siehe Abb. 5.12).

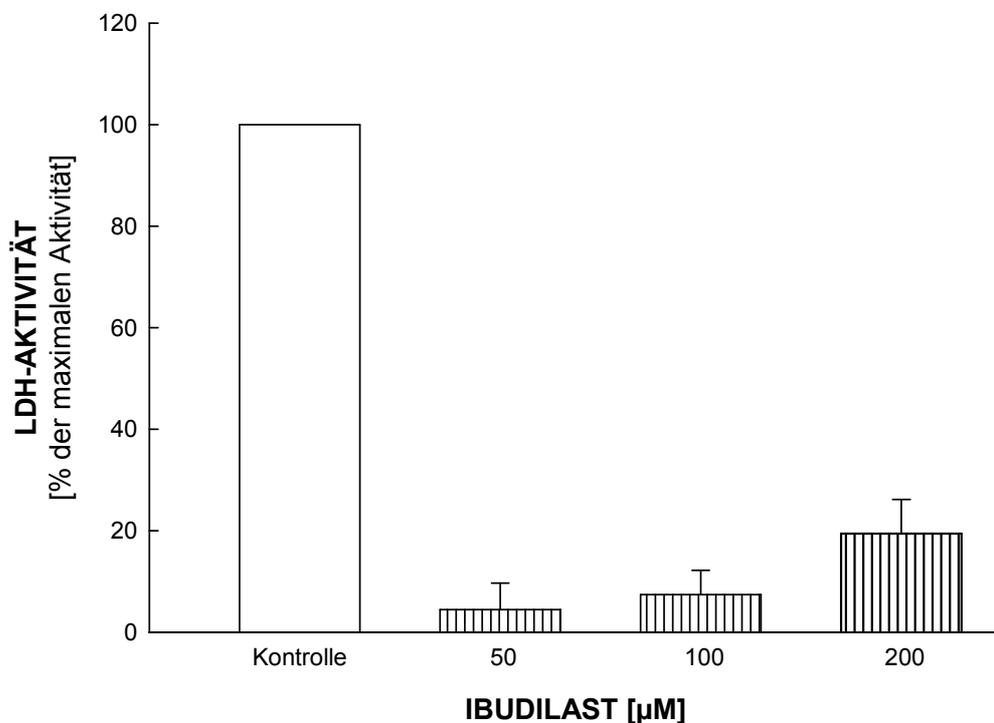


Abb. 5.12: Durch Ibudilast induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay.

Alle Werte sind auf die 100 %-Kontrolle bezogen; $n = 3-5 + \text{SEM}$. Zu der Negativprobe (0 % Zytotoxizität) besteht kein statistisch signifikanter Unterschied.

Vitamin D₃ und Aspecton[®] Hustentropfen

Auch die Inkubation der Zellen mit Vitamin D₃ zeigte keine negative Beeinflussung der Zellmembranen. Es wurde in keiner der Proben der eingesetzten Konzentrationen von 100 pM, 1 nM, 100 nM und 1 µM eine Absorption und somit eine LDH-Aktivität gemessen (siehe Abb. 5.13).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Zytotoxizität des Fertigarzneimittels Aspecton[®] Hustentropfen auf die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B zu untersuchen. Dafür wurden die BEAS-2B Zellen mit Aspecton[®] Hustentropfen in den Konzentrationen von 0,5, 1, 2 und 10 mg/ml inkubiert. Nach 24 Stunden konnte in keiner der Probenüberstände eine Absorption gemessen werden. Aspecton[®] Hustentropfen zeigten somit in den hier eingesetzten Konzentrationen keine zytotoxischen Eigenschaften auf die BEAS-2B Zellen und beeinflussten deren LDH-Aktivität nicht (siehe Abb. 5.13).

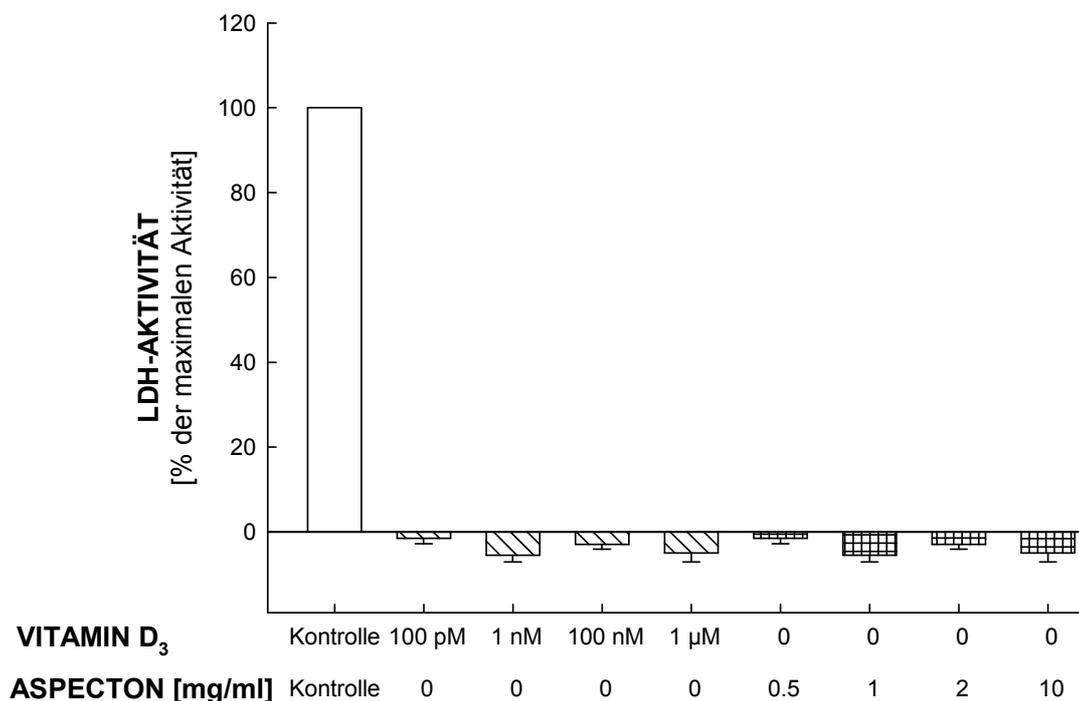


Abb. 5.13: Durch Vitamin D₃ und Aspecton[®] Hustentropfen induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand der Zellen erfolgte mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay.

Alle Werte sind auf die 100 %-Kontrolle bezogen; n = 3-5 + SEM.

5.1.3 Nachweis von Zilien auf den BEAS-2B Zellen

Zu der Frage, ob es überhaupt möglich ist, eine permanente Zelllinie zu kultivieren, die zilientragend ist, gibt es in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben. Mehrere Arbeitsgruppen äußern sich konträr bezüglich der BEAS-2B Zellen. Während Horowitz *et al.* die BEAS-2B Zelllinie als zilientragend beschreibt^[142], verneint Gomperts *et al.* die Anwesenheit von Zilien auf den BEAS-2B Zellen^[143].

Um zu überprüfen, ob permanente Zelllinien und im Besonderen die Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, Zilien auszubilden bzw. die Voraussetzungen für das Vorhandensein von Zilien erfüllen, wurden die BEAS-2B Zellen für verschieden lange Zeitspannen auf Deckgläschen kultiviert. Nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (eine, zwei und drei Wochen) wurden die Deckgläschen unter dem Mikroskop beobachtet und mittels der Hochgeschwindigkeitskamera (100 Bilder pro Sekunde) überprüft, ob Bewegungen zu erkennen, aufzunehmen und auszuwerten waren. Während der Kultivierung wurde nach jeweils drei Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt.

Auf den mit BEAS-2B Zellen für eine Woche bewachsenen Deckgläschen konnten von der Kamera keine Bewegungen aufgezeichnet werden. Im Gegensatz dazu waren auf den zwei und drei Wochen kultivierten Deckgläschen deutliche Bewegungen zu erkennen. Durch das Mikroskop konnten deutlich rotierende, fädige Strukturen erkannt werden. Diese Rotationen waren jedoch nicht über den gesamten Bereich verteilt, sondern wurden nur an manchen Stellen beobachtet. Mit der Kamera konnten an diesen Punkten jedoch stabile Frequenzen von ca. 2 Hz aufgenommen werden. Allerdings konnten die Frequenzen durch Zugabe von Substanzen, mit bereits bekannten CBF-erhöhenden Effekten, nicht erhöht werden.

Da die auf der Oberfläche beobachteten und aufgezeichneten Bewegungen nicht eindeutig Zilien zugeordnet werden konnten, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der BEAS-2B Zellen nach verschiedenen Wachstumszeiten und auf unterschiedlichen Materialien angefertigt. Diese Aufnahmen sollten Aufschluss über das morphologische Erscheinungsbild der Zelloberflächen geben. Sollten Zilien auf der Oberfläche der Zellen wachsen und diese die aufgenommenen Frequenzen bedingen, müssten sie im Elektronenmikroskop zu erkennen sein. Um das Ergebnis der Aufnahmen eindeutig interpretieren zu können, wurde darüber hinaus mittels Dot

Blot, Immunfluoreszenz sowie goldmarkiertem Immunlabeling überprüft, ob BEAS-2B Zellen die Proteine β_1 -Tubulin und axonemales Dynein exprimieren. Beide Proteine sind Zilienmarker und sind für ein Vorhandensein von funktionellen, beweglichen Zilien unerlässlich (siehe Kapitel 1.4.1).

5.1.3.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der BEAS-2B Zellen

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) sollte die Oberflächenstruktur der BEAS-2B Zellen genauer untersucht und auf einen möglichen Zilienbesatz überprüft werden. Dabei wurden die präparierten Zellen mit einem gebündelten Elektronenstrahl abgetastet (gerastert).

Sämtliche elektronenmikroskopische Aufnahmen der BEAS-2B Zellen wurden im Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster in der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie und Analytik von Herrn Prof. Dr. Reichelt angefertigt.

Um bei dieser Fragestellung die besten Wachstumsbedingungen hinsichtlich eines möglichen Zilienwachstums zu ermitteln, wurde der Einfluss variabler Wachstumszeiten, unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen und veränderter Nährstoffzufuhr auf die Morphologie der BEAS-2B Zellen untersucht.

Im Hinblick auf die optimalen Kulturzeiten für die Zilienausbildung auf der Zelloberfläche ist in der Literatur häufig die Angabe von 21 Tagen zu finden^[144, 153, 157]. Dabei werden die Zellen, in den meisten Fällen primäre Bronchialepithelzellen, in der sogenannten Air-Liquid-Schicht, auf semipermeablen Membranen kultiviert. Auch diese Methode soll im Vergleich zur überspülten Kultivierung der Zellen Vorteile zeigen^[144, 153, 157]. So kann sich das Epithel an der Luftschicht besser differenzieren und das Wachstum der Zilien auf der Oberfläche erst ermöglichen. Die Zellen wurden auf diesen Membranen ausgesät und mit Medium von der basolateralen sowie von der apikalen Seite versorgt. Nachdem die Zellen nach ungefähr vier bis sieben Tagen konfluent gewachsen waren, wurde das Medium von apikaler Seite entfernt. Das Medium auf der basolateralen Seite wurde jeden dritten Tag gewechselt, damit die Nährstoffzufuhr der Zellen über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gewährleistet war. Dieses Modell ermöglicht den Zilien das Wachstum an der sogenannten Air-Liquid-Schicht und ahmt am besten die Bedingungen *in vivo* nach. 21 Tage nachdem das Medium auf der apikalen Seite entfernt wurde, war in

den beschriebenen Arbeiten daraufhin ein Zilienwachstum auf primären Bronchialepithelzellen zu beobachten^[144, 153, 157, 158].

Nach diesem Schema wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die BEAS-2B Zellen behandelt. Da allerdings nach den in der Literatur beschriebenen 21 Tagen kein Zilienwachstum zu erkennen war (siehe Abb. 5.14), wurden weitere Optimierungsschritte durchgeführt.

REM-Aufnahmen der Zellen nach 21 Tagen

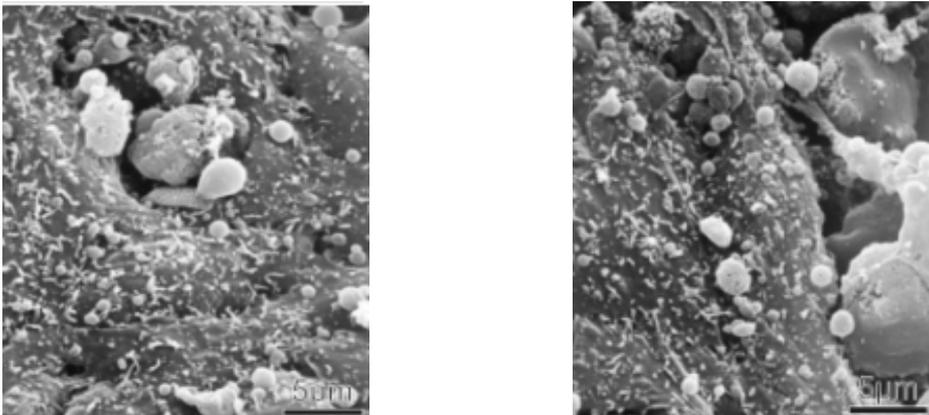


Abb. 5.14: Entfernung des apikalen Mediums nach dem fünften Kultivierungstag

Zunächst wurden die Zellen in einem weiteren Versuch eine Woche länger auf den Membranen kultiviert, damit die Zellen genügend Zeit hatten, sich zu differenzieren und Zilien auf ihrer Oberfläche auszubilden.

REM-Aufnahmen der Zellen nach 28 Tagen

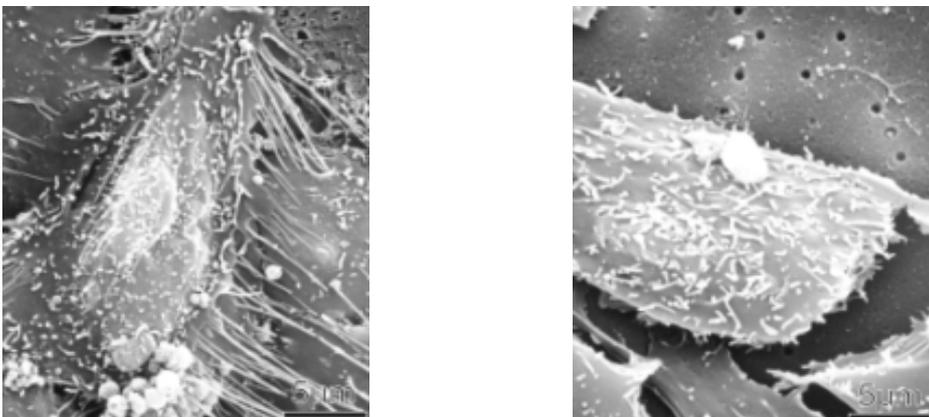


Abb. 5.15: Entfernung des apikalen Mediums nach dem fünften Kultivierungstag

Allerdings konnten auch nach dieser Periode von fünf Kultivierungstagen keine Zilien auf der Oberfläche der BEAS-2B Zellen erkannt werden (siehe Abb. 5.15). Außer, dass mehr tote Zellen und Zelldebris auf den Aufnahmen zu sehen sind, konnten keine relevanten Unterschiede zu den ersten Aufnahmen erkannt werden. Um festzustellen, ob die Kultivierungszeit der Zellen überhaupt Einfluss auf entscheidende Unterschiede hat, sollten als nächstes Aufnahmen der BEAS-2B Zellen bereits nach 9 Tagen gemacht werden. Das apikale Medium wurde ebenfalls, wie bei den anderen Versuchen nach dem fünften Kultivierungstag abgenommen. Da auf den zuvor gemachten Aufnahmen viele tote Zellen auf der Oberfläche zu erkennen waren, sollten evtl. Unterschiede beobachtet werden, wenn die Zellen bei jedem basolateralem Mediumwechsel auf der apikalen Seite gespült und somit von Zelldebris befreit wurden.

REM-Aufnahmen der Zellen nach 9 Tagen

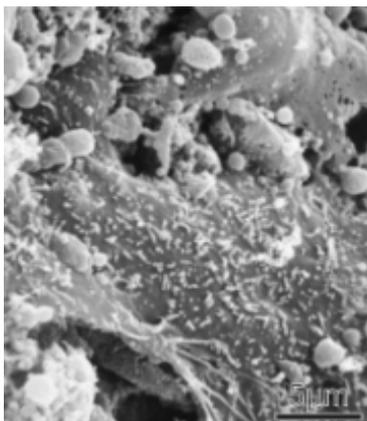


Abb. 5.16: Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, ohne Spülen

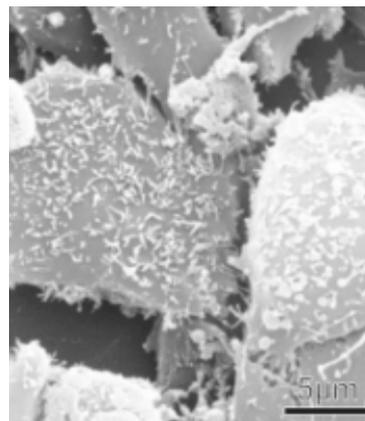


Abb. 5.17: Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, mit Spülen

Auch diese Aufnahmen weisen keine relevanten Unterschiede in der Zelldifferenzierung zu den Aufnahmen nach einer längeren Kultivierung auf. Im Unterschied zu dem linken Bild (Abb. 5.16) kann auf dem rechten Bild (Abb. 5.17) der Vorteil des zwischenzeitlichen Spülens erkannt werden: auf der Zelloberfläche sind weniger tote Zellen zu erkennen. Allerdings ist auch in diesem, wie in den anderen Kultivierungsstadien unter den genannten Bedingungen kein Zilienwachstum zu erkennen.

Zuletzt sollten Aufnahmen der BEAS-2B Zellen bereits nach sechs Tagen Wachstum erstellt werden. Neben dem Effekt des Spülens der Zellen sollte in dieser Versuchsdurchführung zusätzlich der Einfluss des apikalen Mediums überprüft werden. Während es bisher erst nach vollständiger Konfluenz der Zellen abgenommen wurde, sollte das Medium als Vergleich ebenfalls bereits nach dem ersten Kultivierungstag abgenommen werden.

REM-Aufnahmen der Zellen nach 6 Tagen

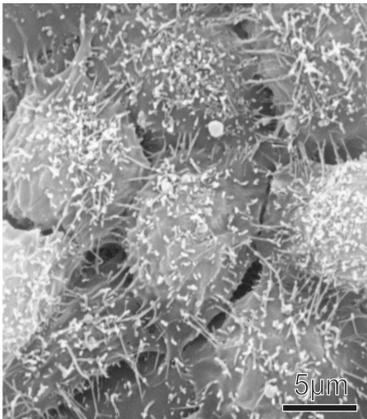


Abb. 5.18: Entfernung des apikalen Mediums nach einem Tag, ohne Spülen

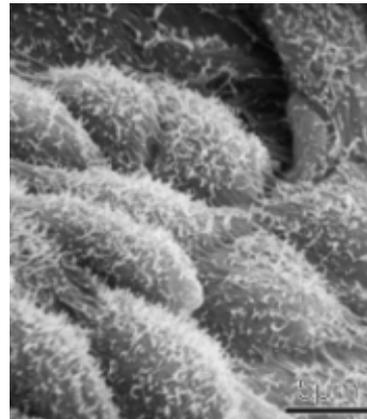


Abb. 5.19: Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, ohne Spülen

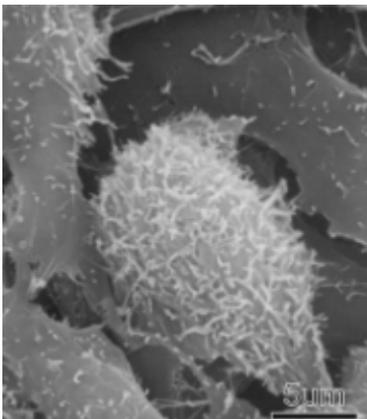


Abb. 5.20: Entfernung des apikalen Mediums nach einem Tag, mit Spülen

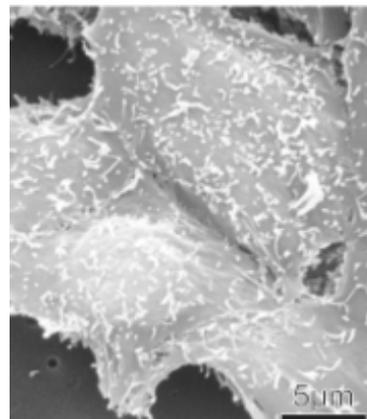


Abb. 5.21: Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, mit Spülen

Auf den Aufnahmen der Zelloberflächen nach der kürzesten Kultivierung kann ebenfalls kein Zilienrasen beobachtet werden. Sowohl das Spülen der Zellen als auch die Abnahme des apikalen Mediums zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigten

keine erkennbaren Unterschiede der Zelldifferenzierung der BEAS-2B Zellen. Flächendeckend verteilte Zilien, die in Gruppen zusammenstehen und für Bronchialepithelzellen charakteristisch sind, können auf keiner der Aufnahmen beobachtet werden. Allerdings sind auf allen angefertigten Aufnahmen, unabhängig von der Kultivierungsdauer und den -bedingungen, kleine „stumpenartige“ Strukturen zu erkennen. Ob es sich bei diesen „stumpenartigen“ Strukturen um kleine, noch nicht vollständig differenzierte Zilien oder andere Oberflächenstrukturen, z. B. Mikrovilli, handelt, wurde im Folgenden untersucht. Mittels verschiedener Methoden sollte versucht werden, diese Strukturen näher zu charakterisieren, um Aussagen über ihren Aufbau und ihren Funktionen treffen zu können. Im Mittelpunkt dieser Charakterisierungen stand der Nachweis der beiden Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein. Beide Marker stellen wichtige Strukturproteine von Zilien, nicht aber von Mikrovilli dar (siehe Kapitel 1.4.1. und 1.4.2).

5.1.3.2 Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Dot Blot

Um das Vorhandensein bzw. die Voraussetzung zur Ausbildung von Zilien auf den BEAS-2B Zellen zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Vorhandensein der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in der Bronchialepithelzelllinie unter anderem mittels Dot Blot überprüft.

β_1 -Tubulin und axonemales Dynein sind sogenannte Zilienmarker^[130, 134, 135], die für die Funktionalität der Zilien essenziell sind und ausschließlich in dem Aufbau der Axoneme zu finden sind. Sie übernehmen wichtige Funktionen für die Bewegung der Zilien^[159], die ohne sie nicht möglich wären.

Der Dot Blot, angelehnt an den Western Blot, bei dem Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden und mittels Antikörpern nachgewiesen werden können, stellt im Gegensatz dazu einen groben qualitativen Nachweis von Proteinen dar. Die Proteine werden bei diesem Verfahren nicht mittels einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und können demnach nicht nach Markern einem Molekulargewicht zugeordnet werden. Allerdings können sie auf diese Art mittels spezifischer Antikörper qualitativ und zeitsparend nachgewiesen werden. Dazu wurden in Zellkulturflaschen konfluent gewachsene Zellen geerntet und lysiert. Die so

präparierten Zellen wurden in einer kleinen Menge auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, auf der die gesuchten Proteine mittels spezifischer Antikörper nach einigen Arbeitsschritten detektiert werden konnten. Ein Röntgenfilm wurde schließlich durch emittiertes Licht der Probe an den Stellen schwarz markiert, an denen der Antikörper gebunden wurde.

Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurde eine Negativprobe mitgeführt, bei der der Primärantikörper weggelassen wurde.

Beide Zilienmarker konnten mit dieser Methode in der BEAS-2B Zelllinie nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.22 und 5.23).

Dot Blot des axonemalen Dyneins

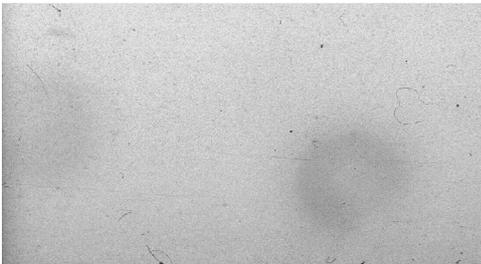


Abb. 5.22: Dot Blot der BEAS-2B Zellen

Rechts detektiert mit dem Primärantikörper Anti-axonemales-Dynein (1:500) und dem Sekundärantikörper Anti-Rabbit IgG Peroxidase (1:140.000). Links ist die Negativprobe abgebildet, bei der der Primärantikörper weggelassen wurde.

Dot Blot des β_1 -Tubulins

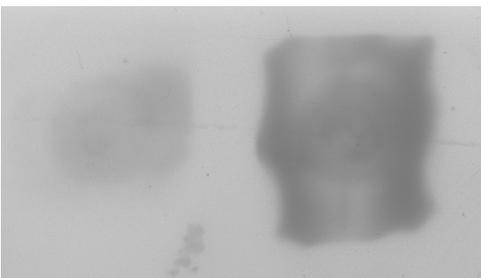


Abb. 5.23: Dot Blot der BEAS-2B Zellen

Rechts detektiert mit dem Primärantikörper Anti- β_1 -Tubulin (1:40.000) und dem Sekundärantikörper Anti-Mouse IgG Peroxidase (1:8.000). Links ist die Negativprobe abgebildet, bei der der Primärantikörper weggelassen wurde.

5.1.3.3 Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Immunfluoreszenz

Um die Existenz der beiden Zilienmarker in den BEAS-2B Zellen und damit das Ergebnis des Dot Blots durch ein weiteres Verfahren abzusichern, sollten beide Proteine ebenfalls mittels der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dazu wurden die Bronchialepithelzellen zunächst auf Deckgläschen ausgesät und nach ungefähr sieben Tagen Wachstumszeit fixiert und permeabilisiert, damit die Antikörper ungehindert die Membran passieren konnten. Bevor der Primärantikörper auf die Zellen gegeben wurde, wurden alle übrigen Bindungsstellen mit BSA geblockt. Nach der Inkubation der Zellen mit den beiden Antikörpern β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in den entsprechenden Konzentrationen wurden sie zunächst mehrmals gewaschen und erneut mit BSA geblockt. Nachdem die Zellen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern, die beide FITC-gekoppelt sind, inkubiert wurden, wurden im letzten Schritt die Kerne der Zellen und die dort lokalisierte DNA mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid) angefärbt. Diese Färbung erleichtert bei der Auswertung der Bilder die Zuordnung und Lokalisation der einzelnen Bestandteile.

β_1 -Tubulin

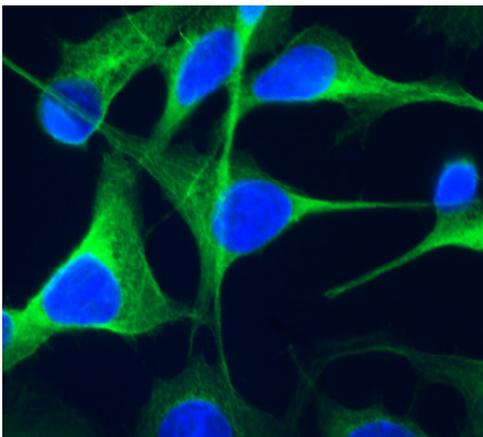


Abb. 5.24: Nachweis des β_1 -Tubulins in der BEAS-2B Zelllinie mittels Immunfluoreszenz,
Vergrößerung: 1000fach

axonemales Dynein

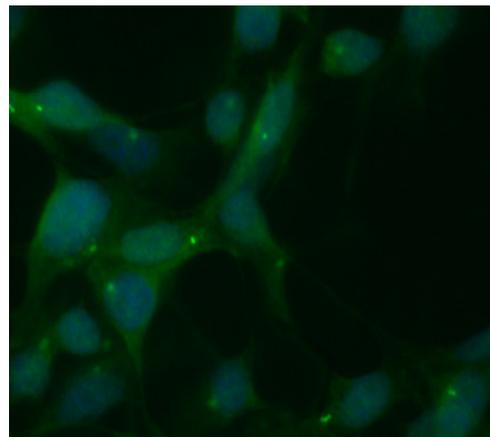


Abb. 5.25: Nachweis des Dyneins in der BEAS-2B Zelllinie mittels Immunfluoreszenz
Vergrößerung: 1000fach

Beide Zilienmarker konnten ebenfalls mit der Methode der Immunfluoreszenz und mit Hilfe der spezifischen FITC-markierten Antikörper in den BEAS-2B Zellen nachgewiesen werden (grün fluoreszierend). Als Negativprobe dienten Zellen, die auf die gleiche Art präpariert wurden, bei denen allerdings der Primärantikörper fehlte. Sie zeigte in beiden Fällen nur die mit DAPI (blau fluoreszierend) angefärbten Zellkerne (nicht gezeigt).

Schweinetracheaepithel-Primärzellen

Das gleiche Verfahren wurde auch an den selbst angelegten und kultivierten Schweinetracheaepithel-Primärzellen durchgeführt, um einen Vergleich zwischen den beiden Zellarten bezüglich der Expressierung der beiden Zilienmarker zu erhalten. Auf diese Weise konnte eine Zellart, die sicher zilientragend ist, mit einer anderen Zellart verglichen werden, auf denen keine Zilien elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten. Die Schweinetracheaepithel-Primärzellen wurden nicht mit dem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt.

β_1 -Tubulin

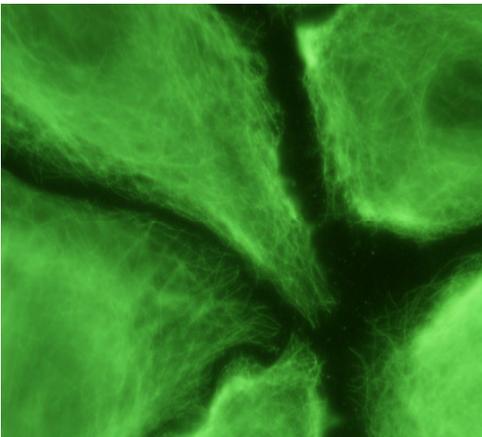


Abb. 5.26: Nachweis des β_1 -Tubulins in der Schweine-Primärkultur mittels Immunfluoreszenz

Vergrößerung: 1000fach

axonemales Dynein

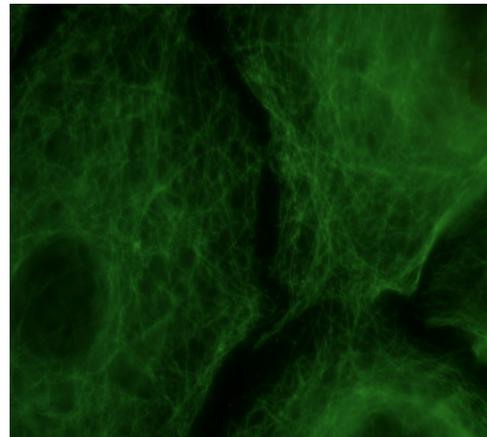


Abb. 5.27: Nachweis des Dyneins in der Schweine-Primärkultur mittels Immunfluoreszenz

Vergrößerung: 1000fach

Auch in der Schweinetracheaepithel-Primärzellkultur konnten beide Zilienmarker nachgewiesen werden (grün fluoreszierend). Die Negativprobe, die ohne den Primärantikörper behandelt wurde, zeigte keine Fluoreszenz (nicht gezeigt).

Außer in der Struktur beider Zellarten können bezüglich der Fluoreszenz keine relevanten Unterschiede zwischen den BEAS-2B und den Primärzellen beobachtet werden. In beiden Fällen ist auffällig, dass die Probe mit dem β_1 -Tubulin-Antikörper stärker fluoresziert als die des Dynein-Antikörpers. Das bedeutet, dass das β_1 -Tubulin zwar von beiden Zellarten stärker exprimiert wird als das Dynein, beide Proteine aber in beiden Zellarten nachgewiesen werden können.

5.1.3.4 Nachweis der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in BEAS-2B Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Die dritte in dieser Arbeit beschriebene Methode, die zur Verifizierung der Existenz von β_1 -Tubulin und axonemalem Dynein in den BEAS-2B Zellen dient, ist das goldmarkierte Immunlabeling.

Dazu wurden die Zellen zunächst fixiert, gewaschen und in Ethanol entwässert, bevor sie in Lowicryl eingebettet wurden. Nach der Polymerisation in UV-Licht wurden die Proben mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Um die Proben im Mikroskop sichtbar zu machen, mussten sie zum Schluss kontrastiert werden.

Von beiden Antikörper-Proben und der jeweiligen Negativprobe (Vorgehen ohne dazugehörigem Primärantikörper) wurden mehrere Aufnahmen gemacht, die gebundenen Goldkörner ausgezählt und auf die Fläche bezogen. Während auf beiden Negativproben, die ein Maß für die unspezifische Bindung des goldmarkierten Sekundärantikörpers darstellen und daher immer mit bestimmt werden müssen, nur wenige Goldkörner gefunden werden (siehe Abb. 5.29 und 5.31), können sowohl bei der Probe des Anti-Dynein-Antikörpers (siehe Abb. 5.30) als auch bei der Probe des Anti- β_1 -Tubulin-Antikörpers (siehe Abb. 5.28) signifikant mehr Bindungsstellen gezählt werden. Auch bei diesem Nachweis der Zilienmarker kann beobachtet werden, dass der Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper stärker gebunden und damit das Protein häufiger vertreten ist als der Anti-Dynein-Antikörper.

In den Abbildungen sind einige gebundene Goldkörner durch Pfeile gekennzeichnet.

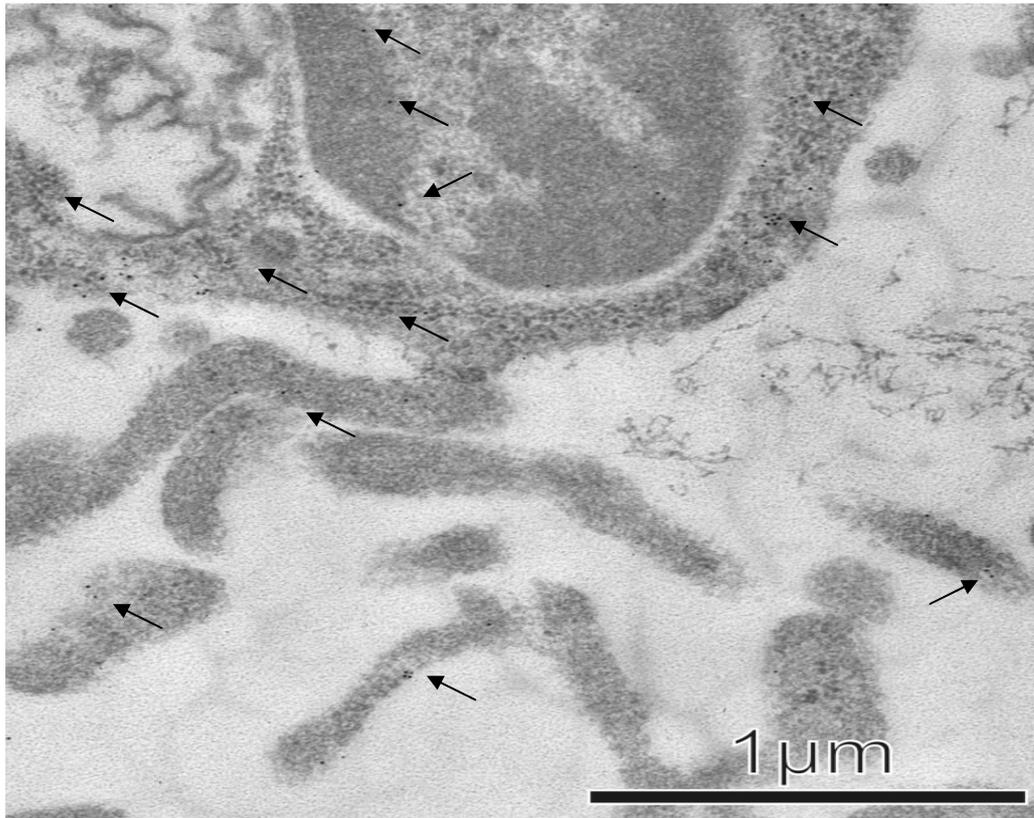


Abb. 5.28: Nachweis des β_1 -Tubulins in der BEAS-2B Zelllinie mittels TEM

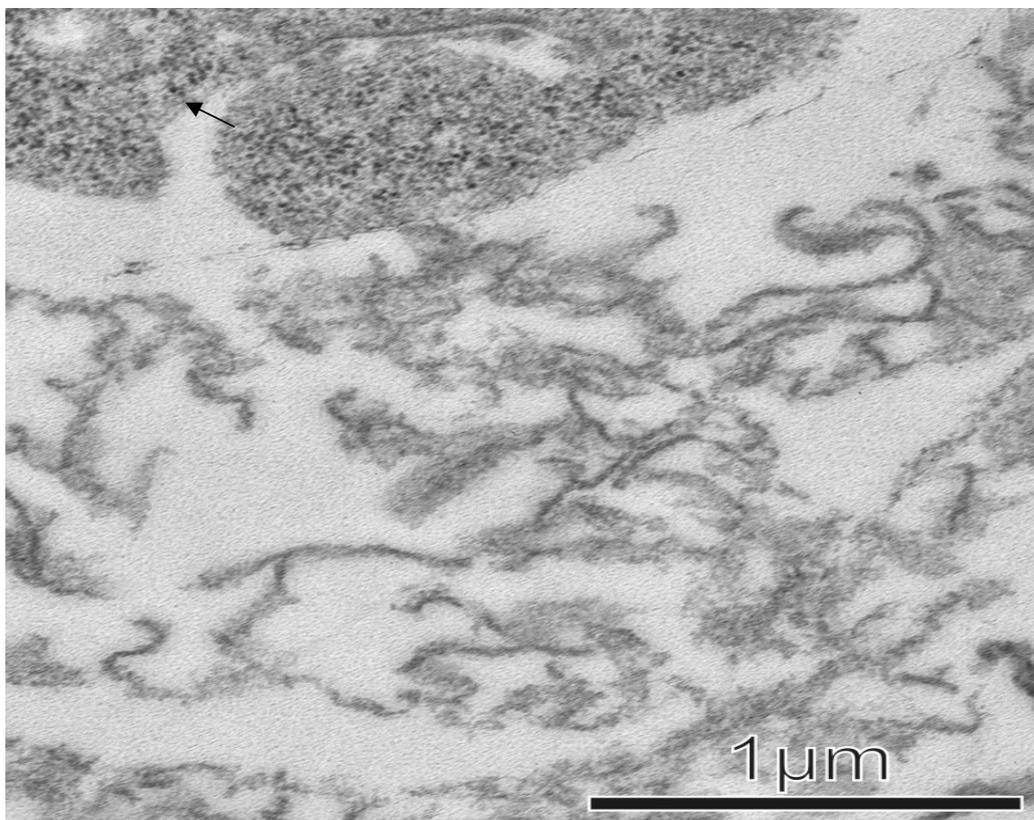


Abb. 5.29: Negativprobe durch Fehlen des Anti- β_1 -Tubulin-Antikörpers

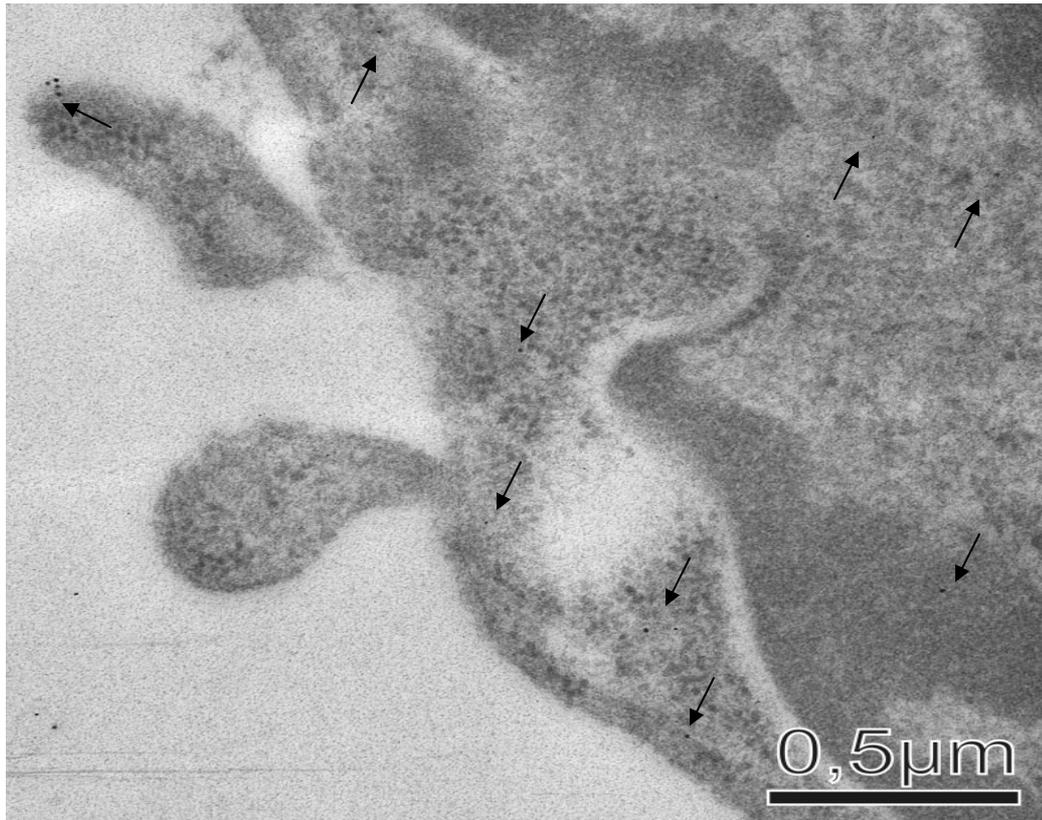


Abb. 5.30: Nachweis des Dyneins in der BEAS-2B Zelllinie mittels TEM

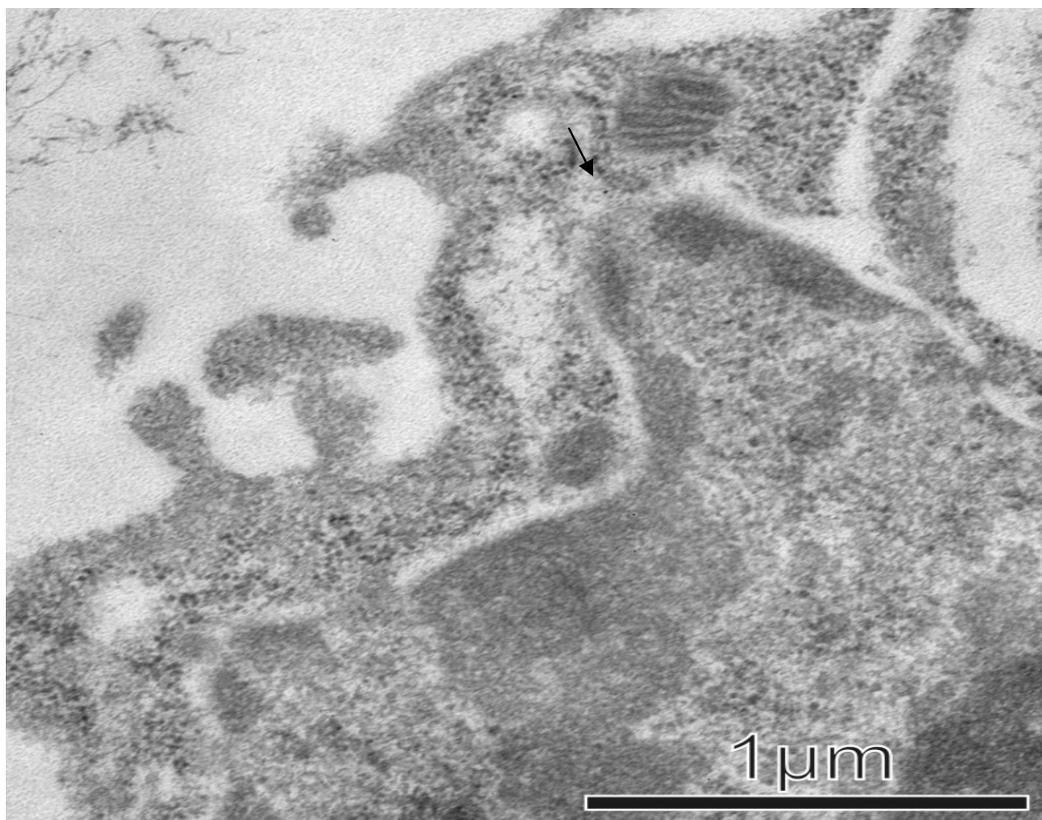


Abb. 5.31: Negativprobe durch Fehlen des Anti-Dynein-Antikörpers

5.2 Messung der CBF an Trachea-Ringen

Da die CBF-Messungen an den BEAS-2B Zellen sich als äußerst schwierig und ungenau erwiesen und abschließend nicht geklärt werden kann, ob die beobachteten und aufgenommenen Frequenzen wirklich von Zilien auf der Zelloberfläche ausgelöst werden, wurde im Folgenden die Frequenzmessung an Rattentrachea-Explantaten durchgeführt.

Mit der Messung der Ciliary Beat Frequency an den präparierten Rattentrachea-Ringen sollten die verschiedenen Einflüsse der schon in Kapitel 5.1.1 und 5.1.2 verwendeten Substanzen bzw. Wirkstoffe analysiert werden. Dazu wurden die Trachea-Ringe in einer mit vorgewärmtem Medium gefüllten Durchflusskammer für jeweils 20 Minuten mit den zu testenden Substanzen in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert. Die resultierenden Frequenzänderungen wurden mit der Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet und mittels der Analysesoftware SAVA ausgewertet.

Mit Ausnahme des Phosphodiesterasehemmers Ibutilast, des Immunmodulators Vitamin D₃ und des α -Sympathomimetikums Xylometazolin wurden sämtliche bereits in den schon beschriebenen Modellen angewendete Substanzen auch in Bezug auf ihre CBF-verändernden Eigenschaften an den Ratten-Explantaten getestet. Für den PDE-Hemmer Ibutilast und das α -Sympathomimetikum Xylometazolin wurden bereits in anderen Arbeitsgruppen entsprechende Untersuchungen zur CBF-Beeinflussung durchgeführt^[87-89, 116, 160, 161]. Das Vitamin D₃ als Immunmodulator, sollte hier ausschließlich auf seinen Einfluss auf die RANTES-Freisetzung sowie auf seine Zytotoxizität am Bronchialepithel untersucht werden.

Ebenso konnte bereits die CBF-erhöhende Beeinflussung des Isoprenalins sowie des Salbutamols an unterschiedlichen Zilienmodellen in einigen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden^[59, 162-164]. Es wurde ein Wirkmechanismus dieser CBF-steigernden Eigenschaft postuliert, der über β -Rezeptoren verläuft, da der Effekt in beiden Fällen durch Inkubation mit dem β -Rezeptor-Blocker Propranolol antagonisiert werden konnte^[162, 163].

Da das Modell der CBF-Messung an Rattentrachea-Explantaten erst im Rahmen dieser Arbeit im Arbeitskreis etabliert wurde, sollte zunächst der bekannte Effekt des Isoprenalins und Salbutamols an diesem Modell beobachtet werden, um einen

Vergleich mit den zuvor bestätigten Ergebnissen erzielen zu können. Auf diese Weise sollte auch eine Aussage über Reproduzierbarkeit und Validität der Methode gemacht werden.

Salbutamol und Isoprenalin

Der bereits gezeigte CBF-erhöhende Einfluss des Salbutamols konnte aufgrund der beobachteten Ergebnisse am Rattentrachea-Modell bestätigt werden. Bereits ab der niedrigsten Salbutamol-Konzentration von 100 μM konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der CBF auf 118,54 % ($p < 0,01$) beobachtet werden. Auch 200 und 300 μM Salbutamol bewirkten eine statistisch erhöhte CBF auf 122,53 bzw. auf 126,78 % ($p < 0,01$). Mit der höchsten in diesem Modell eingesetzten Konzentrationen von 400 μM konnte Salbutamol die CBF auf 126,58 % erhöhen ($p < 0,05$) (siehe Abb. 5.32).

Das gleiche gilt für den β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin. Auch der bereits gezeigte CBF-erhöhende Einfluss des Sympathomimetikums konnte mit dem hier etablierten Zilienmodell bestätigt werden. Die Frequenz der Zilien erhöhte sich mit den eingesetzten Isoprenalin-Konzentration von 100 und 200 μM auf 125,21 bzw. 137,72 % ($p < 0,05$). Die höchste getestete Isoprenalin-Konzentration von 300 μM erhöhte die Schlagfrequenz in diesem Modell sogar auf 148,68 % ($p < 0,01$), also um fast die Hälfte des Ausgangswertes (siehe Abb. 5.32).

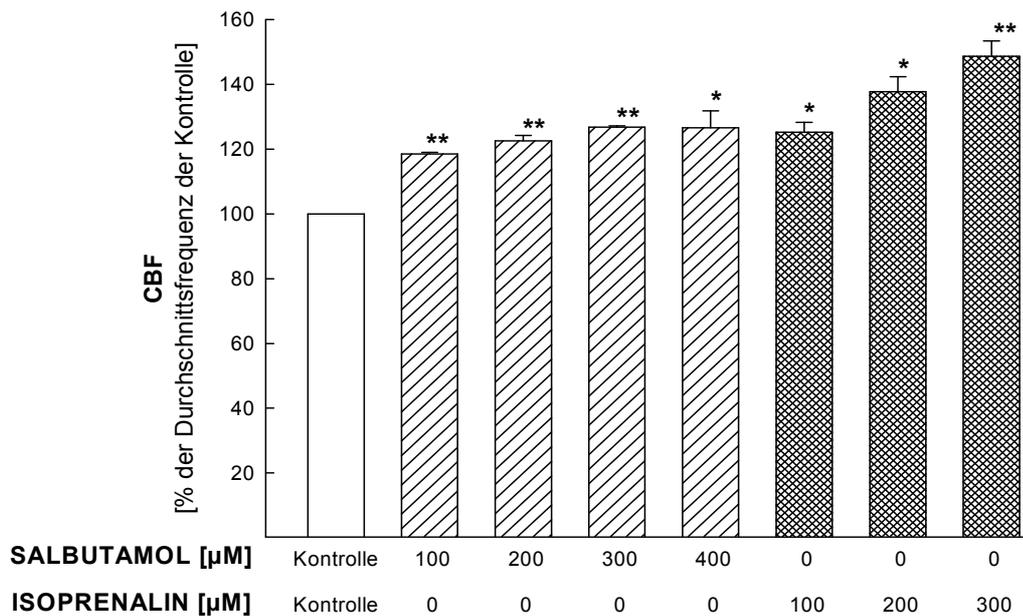


Abb. 5.32: Durch Salbutamol und Isoprenaline beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilierungswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurde der Rattentrachea-Ring mit aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; n = 3 + SEM; *: p < 0,05; **: p < 0,01.

Silymarin und Harpagosid

Im Fall des Silymarins wurde der Trachea-Ring nach der Äquilierungsphase für jeweils 20 Minuten mit aufsteigenden Konzentrationen inkubiert, damit die Frequenzveränderungen aufgenommen und analysiert werden konnten. Es wurden Konzentrationen von 100, 200, 300, 400 sowie 1000 µM eingesetzt. Bereits die geringste Konzentration von 100 µM bewirkte eine signifikante Schlagfrequenzzunahme auf 104,22 % (p < 0,01). Durch die Inkubation des Ringes mit 200 und 400 µM konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Zunahme der CBF auf 120,46 bzw. 110,40 % (p < 0,05) beobachtet werden, wobei nach der Inkubation mit 400 µM Silymarin im Vergleich zu der 300 µmolaren Lösung ein Abfall der CBF gemessen werden konnte. Mit der höchsten Silymarin-Konzentration von 1000 µM wurde die Frequenz in diesem Modell weiter auf 106,06 % reduziert (siehe Abb. 5.33).

Das Harpagosid wurde in vier verschiedenen Konzentrationen (100, 200, 300 und 1000 μM) in aufsteigender Reihenfolge mit dem Trachea-Ring inkubiert. Dabei konnte keine signifikant veränderte Zilienfrequenz gemessen werden. Harpagosid zeigte in diesem Modell also keinen CBF-beeinflussenden Effekt (siehe Abb. 5.33).

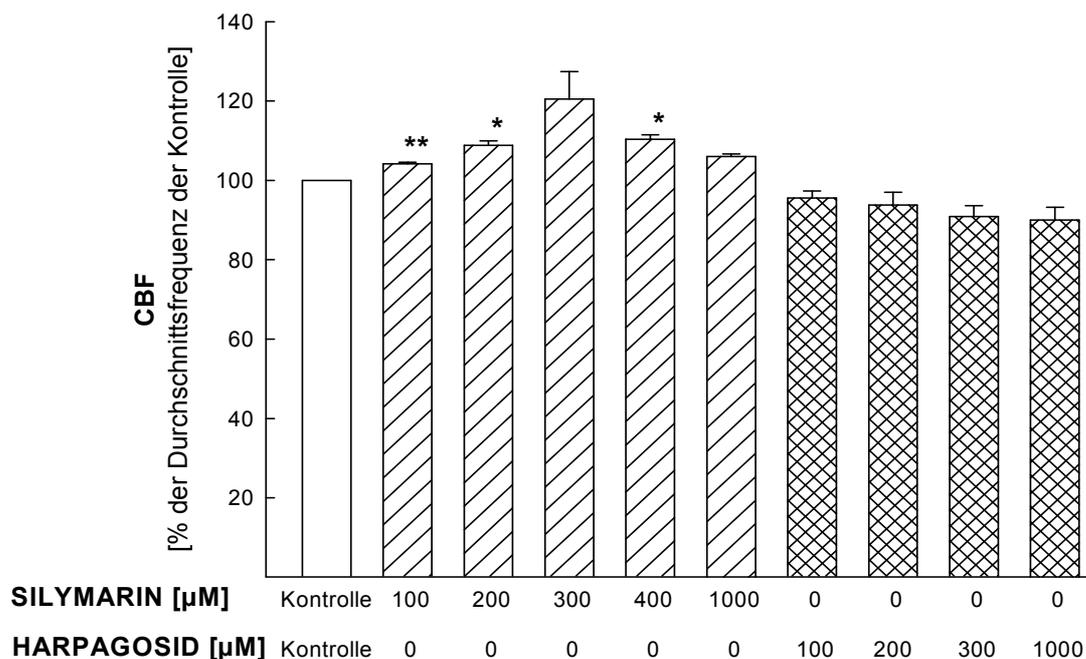


Abb. 5.33: Durch Silymarin und Harpagosid beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibriumswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurde der Rattentrachea-Ring mit aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; $n = 3 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Xylometazolin und Benzalkoniumchlorid

Wie zu Beginn erwähnt, konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen eine zum Teil irreversible Verminderung des Zilienschlages *in vitro* durch den Einfluss des Xylometazolins nachweisen. Dabei wurde an verschiedenen Bronchialepithelmodellen das α -Sympathomimetikum einige Minuten mit den Zilien in Kontakt gebracht und im Anschluss die Frequenzveränderung gemessen^[87-89, 160, 161]. Aus diesem Grund wurden keine Versuche am Rattentrachea-Modell mit dem α -Sympathomimetikum im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Auch Benzalkoniumchlorid war bereits in mehreren Arbeiten Mittelpunkt der Untersuchungen. Auch bezüglich der CBF-beeinflussenden Eigenschaften wurden einige Arbeiten durchgeführt^[91, 165-167]. Trotzdem wurde auch im Rahmen dieser Arbeit auf den postulierten ziliotoxischen Effekt des Konservierungsmittels eingegangen, um auch mit dem hier beschriebenen Modell die gezeigten Ergebnisse bestätigen zu können. Es konnte bereits bei einer Konzentration von 0,001 % ein statistisch signifikanter CBF-erniedrigender Effekt des Benzalkoniumchlorids nachgewiesen werden. Die CBF war auf 66,53 % gesunken ($p < 0,05$). Irreversible zytotoxische Einflüsse konnten mit einer 0,01 %igen Lösung beobachtet werden. Die Zilienschlagfrequenz war auf 28,27 % reduziert ($p < 0,01$) (siehe Abb. 5.34) und bei Zugabe höher konzentrierter Benzalkoniumchlorid-Lösungen stellten die Zilien ihre Bewegungen vollständig ein. Auch durch mehrmaliges Spülen des Organs konnte dieser Hemmeffekt nicht mehr aufgehoben werden.

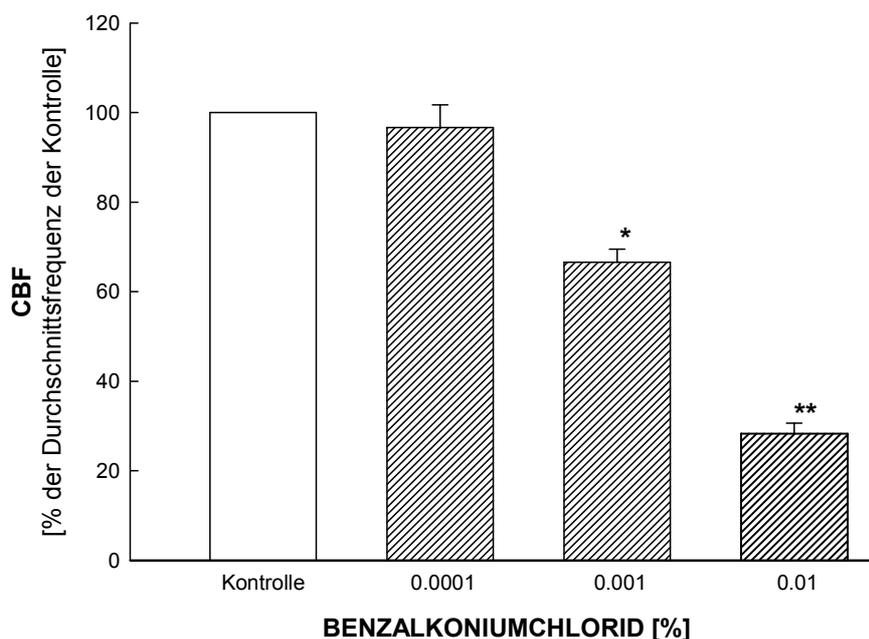


Abb. 5.34: Durch Benzalkoniumchlorid beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibrierungswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurde der Rattentrachea-Ring mit aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanz für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; $n = 3 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Thymol und Myrtol

Thymol wurde ebenfalls in vier unterschiedlich hohen und aufsteigenden Konzentrationen auf das Explantat gegeben und mit diesem für 20 Minuten inkubiert, bevor die Frequenzen aufgenommen und analysiert wurden. Nachfolgend wurden die Frequenzveränderungen mit 10, 100, 200 und 500 μM Thymol beobachtet. Ab 200 μM Thymol konnte eine signifikante Frequenzerhöhung auf 125,07 % gezeigt werden, die noch mit 500 μM Thymol auf 139,10 % gesteigert werden konnte ($p < 0,01$) (siehe Abb. 5.35).

Das Mehrkomponentengemisch Myrtol wird als ätherisches Öl in einigen Fertigarzneimitteln als Expektorans zur Therapie der akuten sowie chronischen Bronchitis und Sinusitis eingesetzt. Bezüglich des Einflusses von Myrtol auf die Zilienschlagfrequenz wurden in der Arbeitsgruppe von Han *et al.* bereits

Untersuchungen durchgeführt^[168]. Das Ergebnis dieser Analysen war, dass das Myrtol in Konzentrationen im nanomolaren Bereich *in vitro* keinen Einfluss auf die CBF zeigt. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte der Versuch mit höheren Myrtol-Konzentrationen durchgeführt werden, um das von Han *et al.* gezeigte Ergebnis ergänzen und einen evtl. CBF-beeinflussenden Effekt von Myrtol darstellen zu können. Tatsächlich konnte mit höheren Myrtol-Konzentrationen (0,01, 0,05 und 0,1 %) durch das in dieser Arbeit beschriebene Modell ein positiver Einfluss des Myrtols auf die CBF festgestellt werden. Mit einer 0,01 %igen Lösung des Myrtol-Gemisches konnte eine signifikante CBF-Erhöhung auf 114,45 % ($p < 0,01$ bezogen auf die Kontrolle) erzielt werden. Konzentriertere Myrtol-Lösungen von 0,05 und 0,1 % zeigten eine weitere Frequenzerhöhung auf 120,04 bzw. 123,9 % ($p < 0,05$ bezogen auf die Kontrolle). Da das Myrtol 1:10 mit Ethanol gemischt werden musste, um es vollständig in Lösung zu bringen, wurden die entsprechend aufsteigenden Ethanol-Endkonzentrationen ebenfalls auf einen CBF-beeinflussenden Effekt untersucht, um eine Beeinflussung durch das Lösungsmittel ausschließen zu können. Durch 0,09 %ige und 0,45 %ige Ethanolkonzentrationen wurde die CBF nicht beeinflusst, so dass die gezeigte Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz durch die 0,01 %ige und 0,05 %ige Myrtol-Konzentrationen ausschließlich auf die Wirkungen des Myrtols zurückzuführen sind (beide Werte $p < 0,01$ bezogen auf die jeweilige Ethanol-Konzentration 0,09 bzw. 0,45 %). Zwischen den CBF-Erhöhungen durch die 0,1 %ige Myrtol-Konzentration und die entsprechend alleinige Ethanol-Konzentration von 0,9 % kann kein signifikanter Unterschied gezeigt werden, so dass demnach bei dieser Myrtol-Konzentration auch der Lösungsmittelleffekt Einfluss auf die Steigerung der ziliären Schlagfrequenz nimmt (siehe Abb. 5.35). Höhere Myrtol-Konzentrationen konnten aufgrund des Lösungsmittelleffektes auf die CBF nicht ausgewertet werden.

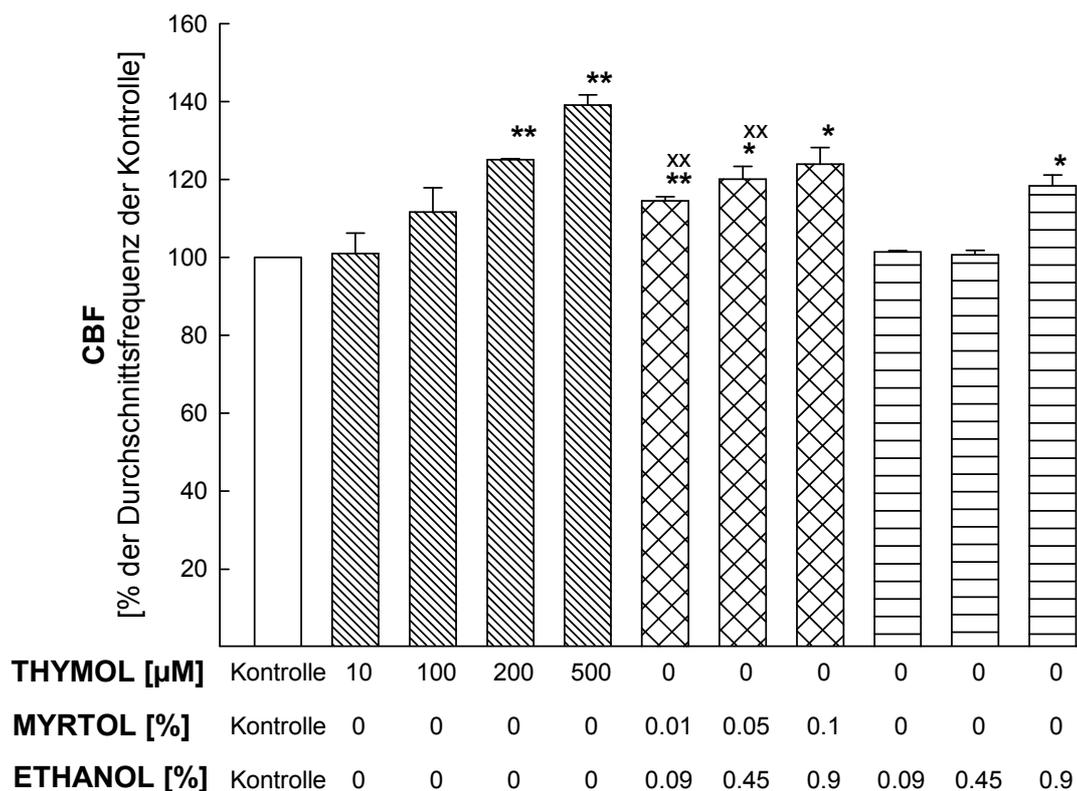


Abb. 5.35: Durch Thymol und Myrtol beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibrierungswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurde der Rattentrachea-Ring mit aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration $n = 3 + \text{SEM}$;

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ bezogen auf die Kontrolle (100 % CBF); xx: $p < 0,01$ bezogen auf die jeweilige Ethanol-Konzentration.

Ibudilast und Losartan

Ibudilast, ein Hemmstoff der Phosphodiesterase, wurde in diesem Modell der CBF-Messung nicht eingesetzt. In der Arbeitsgruppe von Ganbo *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass Ibudilast einen stimulierenden Effekt auf die Zilienschlagfrequenz besitzt^[116].

Der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist Losartan beeinflusste nur in geringem Ausmaß die CBF des Ratten-Rings. Der Effekt des Losartans wurde in drei verschiedenen Konzentrationen von 100, 200 und 300 μM überprüft, wobei nur die geringste Konzentration (100 μM) eine signifikante Frequenzveränderung zeigte.

Losartan reduzierte in dieser Konzentration in drei voneinander unabhängigen Versuchen die CBF auf 91,83 % (siehe Abb. 5.36).

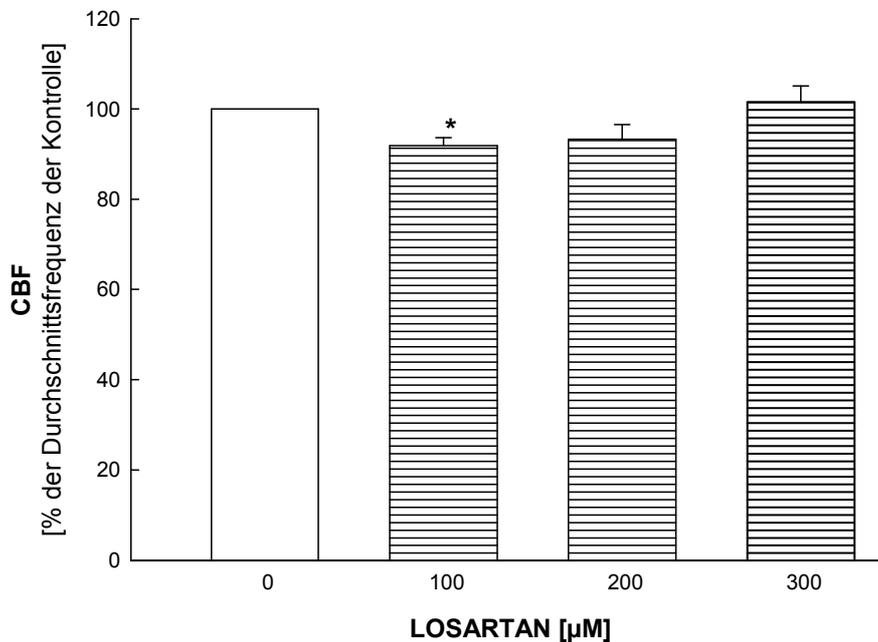


Abb. 5.36: Durch Losartan beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibriumswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurde der Rattentrachea-Ring mit aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanz für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; n = 3 + SEM; *: p < 0,05.

Vitamin D₃ und Aspecton® Hustentropfen

Das Vitamin D₃ wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht auf seinen Schlagfrequenzbeeinflussenden Effekt überprüft, da es ausschließlich als beschriebener Immunmodulator auf seine Eigenschaften bezüglich der RANTES-Freisetzung und zusätzlich auf die Zytotoxizität getestet werden sollte.

Mit dem Präparat Aspecton® Hustentropfen konnten in diesem Modell keine Ergebnisse bezüglich der Beeinflussbarkeit der ziliären Schlagfrequenz erzielt werden. Nach Zugabe der Hustentropfen in allen angewendeten Konzentrationen von 0,5-10 mg/ml war ein Stillstand der Zilien zu beobachten. Vermutlich war die Aspecton®-Lösung trotz Verdünnung zu viskos und verklebte die Zilien, so dass sie

irreversibel geschädigt waren. Auch nach mehrmaligem Spülen war dieser Effekt nicht aufhebbar.

5.3 Weitere Modelle zur Messung der Ciliary Beat Frequency

Um das zuvor beschriebene Modell der CBF-Messung an Rattentrachea-Explantaten weiterentwickeln und mit anderen Modellen vergleichen zu können, um so auch Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden gegeneinander abzuwiegen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere CBF-Messmethoden auf ihre Einsetzbarkeit, Funktionalität und Praktikabilität getestet. Damit am Ende ein exakter Vergleich möglich ist, sollten Substanzen mit bereits bekannten CBF-beeinflussenden Eigenschaften in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen in allen Modellen zur Anwendung kommen. Diese Substanzen sind Salbutamol und Silymarin, jeweils in den Konzentrationen von 200 und 400 μM sowie das Thymol in den Konzentrationen von 100 und 500 μM .

5.3.1 Primärkultur von Epithelzellen der Schweinetrachea

Da für das zuvor beschriebene Modell zur Messung der Ciliary Beat Frequency viele Ratten eingesetzt werden mussten, um genügend Trachea-Explantate für die Versuche präparieren zu können, sollte durch die Kultivierung zilientragender Primärzellen ein tierschonenderes Verfahren zur Messung der Ciliary Beat Frequency eingeführt werden. Für die Gewinnung der Zilien wurden Tracheen von Schweinen verwendet, die den Tieren direkt nach der Schlachtung entnommen und wenig später im Labor weiterverarbeitet wurden. Dafür wurden die Schweine nicht für die Durchführung des Versuches, sondern im Rahmen einer routinemäßigen Schlachtung zur Fleischgewinnung getötet. Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturflaschen herangezüchtet um sie direkt bei der ersten Passagierung auf semipermeablen Membranen auszusäen, damit die Zellen in einer Air-Liquid-Schicht wachsen konnten (siehe Kapitel 4.3). Schon nach einigen Tagen konnte eine gleichmäßige Ausbreitung der Zellen über die gesamte Fläche der Zellkulturflasche beobachtet werden. Im Laufe der Kultivierung konnte jedoch das von Neugebauer *et*

al. postulierte Nachlassen der Zilienmotilität und des -wachstums nach einigen Kultivierungszyklen bestätigt werden^[144]. Deshalb wurden für die CBF-Messungen im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich die ersten beiden Passagen der Primärzellen verwendet. Dieser Umstand macht diese Methode sehr zeit- und arbeitsaufwendig, da immer wieder neue Tracheen präpariert und neue Kulturen angelegt werden müssen. Dass die Ausdifferenzierung der zilientragenden Zellen auch im Rahmen dieser Arbeit nur am Anfang der Kultivierung zu beobachten war, unterstützt die These, dass Zilienzellen nicht zu den sich teilenden Zellarten gehören^[169].

Für die CBF-Messung wurden nach drei Wochen Wachstumszeit die bewachsenen semipermeablen Membranen in der Durchflussskammer mit Salbutamol, Thymol und Silymarin in entsprechenden aufsteigenden Konzentrationen inkubiert. Die ziliären Frequenzveränderungen wurden wie in den anderen Modellen mit der Hochgeschwindigkeitskamera (100 Bilder pro Sekunde) aufgenommen und mittels der Auswertungssoftware SAVA analysiert.

Salbutamol

Die Inkubation der mit den Schweinetracheaepithel-Primärzellen bewachsenen Membranen mit 200 und 400 μM Salbutamol zeigte eine signifikante Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz. Mit der 200 $\mu\text{molaren}$ Salbutamol-Konzentration konnte die CBF auf 121,45 % ($p < 0,01$) und mit der 400 $\mu\text{molaren}$ Lösung auf 125,64 % ($p < 0,05$) angehoben werden (siehe Abb. 5.37).

Thymol

Durch die aufgenommenen ziliären Frequenzveränderungen der Primärzellen nach Inkubation mit den hier eingesetzten Thymol-Konzentrationen 100 und 500 μM konnte eine signifikante Erhöhung der Schlagfrequenzen auf 109,91 % ($p < 0,05$) bzw. auf 138,95 % ($p < 0,01$) in Bezug auf den Basiswert gezeigt werden (siehe Abb. 5.37).

Silymarin

Die im Rahmen dieser Arbeit schon gezeigten CBF-erhöhenden Eigenschaften des Silymarins konnten ebenfalls mittels der Primärzellen-Methode bestätigt werden. Die Frequenzen konnten nach Inkubation mit 200 und 400 μM Silymarin auf 108,34 bzw.

110,36 % (beide Werte $p < 0,05$ bezogen auf den Basiswert) erhöht werden (siehe Abb. 5.37).

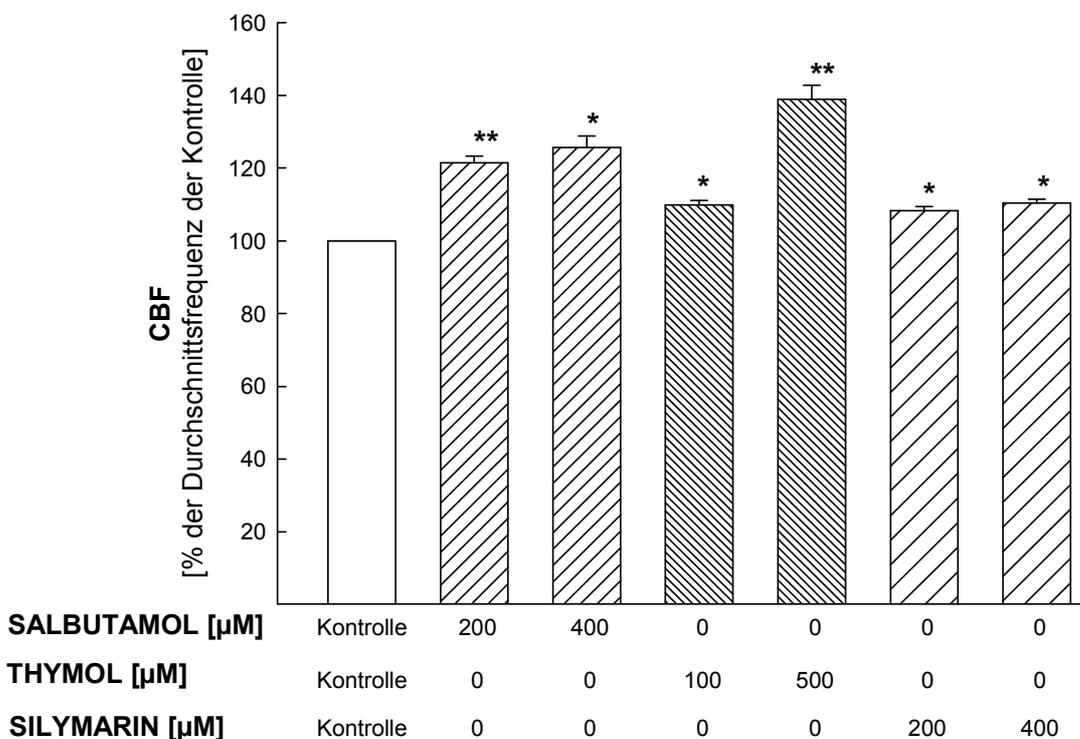


Abb. 5.37: Durch Salbutamol, Thymol und Silymarin beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Schweinetrachea-Primärzellen

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibriumswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurden die Schweinetracheaepithel-Primärzellen mit den jeweils beiden aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; $n = 3 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (in Bezug auf die Kontrolle).

5.3.2 CBF-Messung an isolierten Axonemen

Ein weiteres Modell, mit dem die CBF-Messungen durchgeführt wurden und im Rahmen dieser Arbeit verglichen und bewertet werden sollte, ist die schon von Hastie *et al.*, Sisson *et al.* und Vent *et al.* beschriebene Methode der isolierten Axoneme^[130, 136, 137, 146].

Dabei wurden Schweinetracheen so präpariert, dass einzelne Axoneme aliquotiert und mit den zu testenden Substanzen (Salbutamol, Thymol und Silymarin) inkubiert werden konnten. Da die einzelnen Axoneme nach dem Auftauen eine Basisfrequenz von ungefähr 2 Hz aufwiesen, die nicht stabil über die gesamte Versuchsdauer gehalten wurde, musste zu Beginn der Frequenzaufnahmen eine 2,5 mmolare ATP-Lösung zu der Zellsuspension gegeben werden. Das zugegebene ATP diente als Energiequelle der Zilien und konnte die Basisfrequenz auf über die Versuchszeit stabile 4-5 Hz steigern.

Salbutamol

Die beiden 200 und 400 µmolaren Salbutamol-Konzentrationen erhöhten in diesem Modell die CBF auf 124,06 bzw. auf 130,59 % (beide Werte $p < 0,05$, bezogen auf den Basiswert, siehe Abb. 5.38).

Thymol

Auch die CBF-erhöhenden Effekte des Thymols konnten mit diesem Zilienmodell bestätigt werden. In den hier eingesetzten Konzentrationen von 100 und 500 µM beeinflusste Thymol die CBF, indem sie auf 115,56 bzw. 144,58 % ($p < 0,05$, bezogen auf den Basiswert) gesteigert werden konnte (siehe Abb. 5.38).

Silymarin

Die Inkubation der isolierten Axoneme mit Silymarin in den Konzentrationen 200 und 400 µM erhöhte die ziliäre Schlagfrequenz auf 111,56 bzw. 113,88 %. Allerdings war diese Erhöhung bezogen auf den durchschnittlichen Basiswert nicht signifikant (siehe Abb. 5.38).

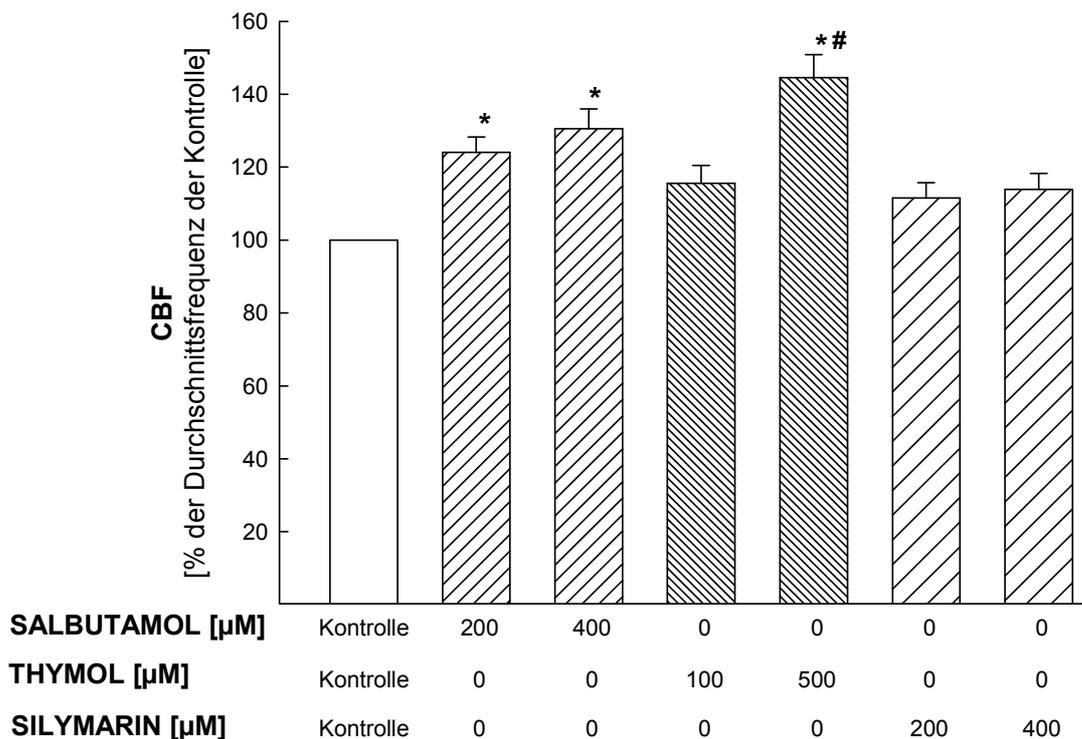


Abb. 5.38: Durch Salbutamol, Thymol und Silymarin beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der isolierten Axoneme

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibriumswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurden die isolierten Axoneme mit den jeweils beiden aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen. Die Kontrolle enthält als Energiequelle ebenfalls eine 2,5 mmolare ATP-Lösung; $n = 3 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$ (in Bezug auf die Kontrolle), #: $p < 0,05$ (in Bezug auf die identische Substanzkonzentration im EpiAirwayTM Membran-Modell).

5.3.3 EpiAirway™ Membranen

Die letzte Methode, die im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf die CBF-Messung überprüft, bewertet und mit den anderen Modellen verglichen werden sollte, stellen die käuflich erworbenen, mit humanen Bronchialepithelzellen bewachsenen EpiAirway™ Membranen dar. Hierbei wurden Bronchialepithelzellen von gesunden Patienten auf den semipermeablen Membranen an der Air-Liquid-Schicht kultiviert und nach dem 21. Wachstumstag für die Messungen verwendet. Auf den Einsätzen konnte ein schlagender Zilienrasen unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop beobachtet und dessen Frequenzen aufgenommen werden. Die Oberfläche der EpiAirway™ Membranen wurde auch mittels des Rasterelektronenmikroskops und des Transmissionselektronenmikroskops untersucht. Die Aufnahmen zeigen einen flächendeckenden Zilienbesatz und die charakteristischen Zilienstrukturen (siehe Kapitel 5.4).

Um auch hier die Vergleichbarkeit herstellen zu können, wurden die Membranen mit den Substanzen Salbutamol, Thymol und Silymarin inkubiert. Da dieses Modell darüber hinaus auf seine allgemeine Anwendbarkeit untersucht und seine Eigenschaften näher charakterisiert werden sollten, wurden die Substanzen zusätzlich in den bereits im Rattentrachea-Modell verwendeten Konzentrationen eingesetzt. Außerdem wurde die CBF-beeinflussende Eigenschaft des Myrtol-Gemisches an den zilientragenden Zellen überprüft. Da Myrtol zur besseren Löslichkeit mit Ethanol vermischt wurde, musste ebenfalls der alleinige Einfluss der jeweiligen Ethanolkonzentration auf die ziliäre Schlagfrequenz gemessen werden.

Salbutamol

Die Inkubation der EpiAirway™ Membranen mit 100, 200, 300 und 400 µM Salbutamol konnte die CBF auf 111,56, 125,27, 125,41 und 132,60 % (alle Werte $p < 0,05$, bezogen auf den Basiswert) erhöhen (siehe Abb. 5.39).

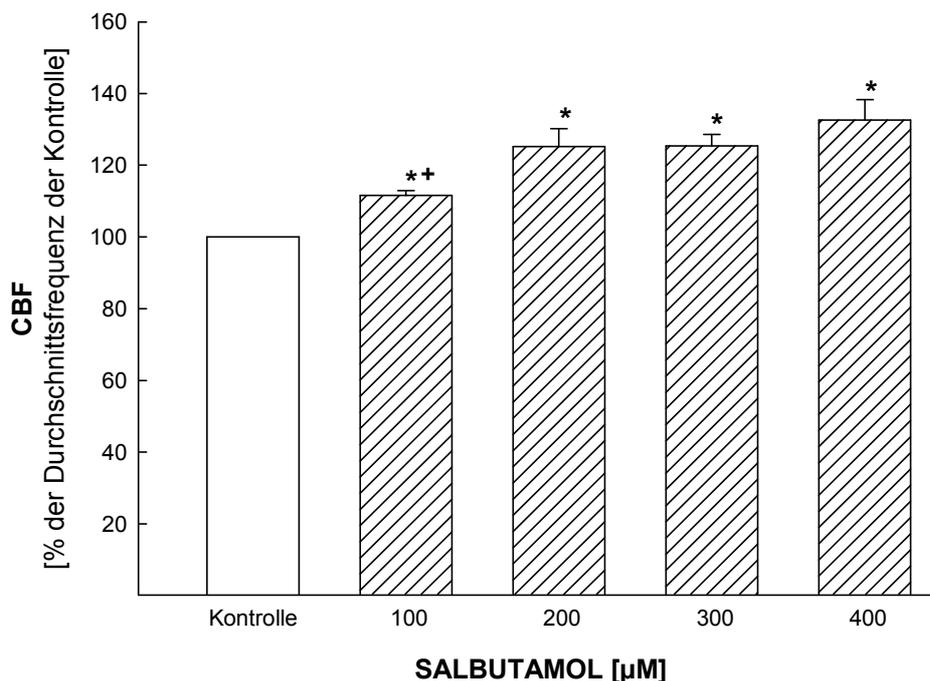


Abb. 5.39: Durch Salbutamol beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der EpiAirway™ Membranen

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilierungswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurden die Membranen mit den aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanz für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; $n = 3 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$ (in Bezug auf die Kontrolle); +: $p < 0,05$ (in Bezug auf die identische Substanzkonzentration im Rattentrachea-Modell).

Silymarin und Thymol

Im Rahmen dieses Modells können die in früheren Kapiteln gezeigten CBF-erhöhenden Eigenschaften des Silymarins bestätigt werden. Silymarin-Konzentrationen von 100, 200, 300 und 400 μM erhöhen die CBF bezogen auf die Kontrolle auf 106,59 ($p < 0,05$), 114,13 ($p < 0,05$), 117,41 und 109,28 % (siehe Abb. 5.40).

Thymol konnte die ziliäre Schlagfrequenz der auf den Membranen gewachsenen Human-Primärzellen in Konzentrationen von 10, 100, 200 und 500 μM auf 110,18, 121,95 ($p < 0,05$), 123,22 ($p < 0,01$) und 122,55 % ($p < 0,05$) auf die Kontrolle bezogen erhöhen (siehe Abb. 5.40).

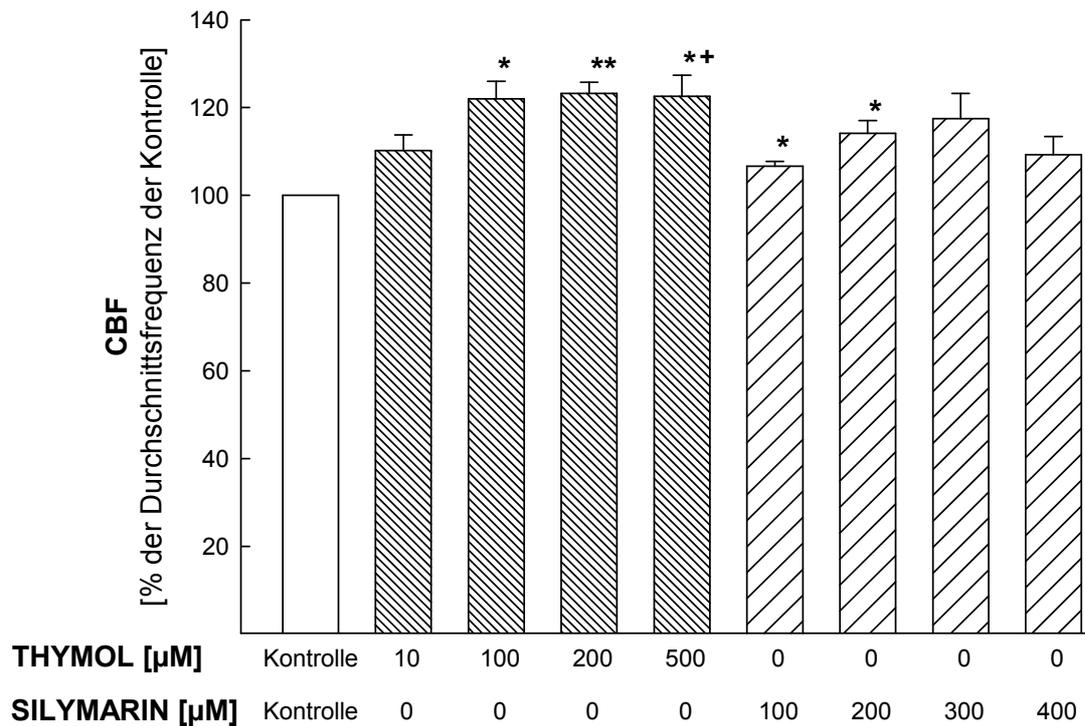


Abb. 5.40: Durch Thymol und Silymarin beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der EpiAirway™ Membranen

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibrierungswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurden die Membranen mit den aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; $n = 3-4 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ (in Bezug auf die Kontrolle), +: $p < 0,05$ (in Bezug auf die identische Substanzkonzentration im Rattentrachea-Modell).

Myrtol und Ethanol

Da das Myrtol im wässrigen Milieu nicht in Lösung gebracht werden kann, wurde es für die durchgeführten Versuche 1:10 mit Ethanol gemischt. Aus diesem Grund wurde ebenfalls ein CBF-modulierender Effekt der jeweiligen Ethanol-Konzentration im Rahmen dieser Methode überprüft. Myrtol wurde in einer 0,01, 0,05 und einer 0,1 %igen Lösung eingesetzt. Daraus resultierten CBF-Erhöhungen auf 117,97 ($p < 0,05$), 131,58 und 142,19 % ($p < 0,05$) bezogen auf die Kontrolle (siehe Abb. 5.41). Die jeweiligen Ethanol-Konzentrationen von 0,09 und 0,45 % ergaben Bezugnehmend auf den Basiswert keine signifikante Erhöhung der CBF, so dass der Unterschied der CBF-Beeinflussung durch die Myrtol- und die Ethanol-

Konzentrationen signifikant ($p < 0,05$) und die Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz bei beiden Myrtol-Lösungen alleiniger Effekt des Myrtols ist (siehe Abb. 5.41).

Allerdings konnte bei der Inkubation der Membranen mit der höchsten eingesetzten Ethanol-Konzentration von 0,9 % in drei voneinander unabhängigen Versuchen eine Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz auf 123,06 % beobachtet werden, die in Bezug auf die 0,1 %ige Myrtol-Lösung aber auch auf den Basiswert statistisch signifikant ist ($p < 0,05$). Somit beruht die CBF-Erhöhung durch die 0,1 %ige Myrtol-Lösung nicht allein auf dem Myrtol, sondern auch auf dem Lösungsmittelleffekt.

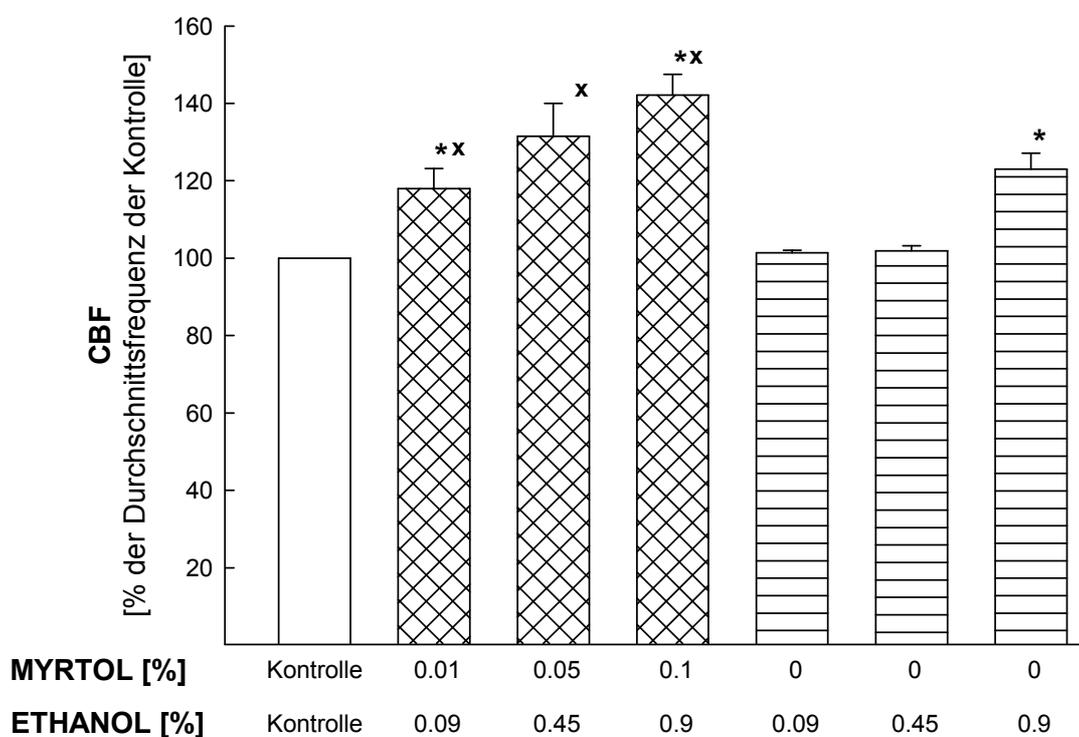


Abb. 5.41: Durch Myrtol und Ethanol beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der EpiAirway™ Membranen

Nachdem vor jedem Versuch ein Äquilibriumswert (Kontrolle) über 15 Minuten aufgenommen wurde, wurden die Membranen mit den aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen für jeweils 20 Minuten inkubiert. Aus den resultierenden Frequenzmessungen wurden für jede Konzentration Durchschnittswerte ermittelt und auf den Durchschnittswert der Kontrolle (100 %) bezogen; $n = 3 + \text{SEM}$; *: $p < 0,05$ (in Bezug auf die Kontrolle), x: $p < 0,05$ (in Bezug auf den jeweiligen Ethanol-Wert).

5.3.4 Vergleich der verschiedenen CBF-Messmethoden

Da die CBF-Beeinflussung in allen beschriebenen Methoden durch drei gleiche, jeweils identisch konzentrierte Substanzen untersucht wurde, deren CBF-erhöhende Eigenschaften aus dem Rattentrachea-Modell bereits bekannt waren, kann ein abschließender Vergleich der Methoden erfolgen. Nur in dem Modell der EpiAirway™ Membranen wurden zusätzliche Konzentrationen der Substanzen sowie zwei unterschiedlich konzentrierte Myrtol-Lösungen eingesetzt und auf ihren CBF-beeinflussenden Effekt getestet. Dieses Modell sollte darüber hinaus im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer charakterisiert und bewertet werden.

Im Rahmen des Modells der Schweinetracheaepithel-Primärzellen konnten in Bezug auf die CBF-Messungen am Rattentrachea-Explantat bei allen drei eingesetzten Substanzen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (siehe Abb. 5.37). Obwohl die Basisfrequenz der Schweine-Primärzellen mit 7-10 Hz unter denen des Ratten-Explantates (10-20 Hz) lagen, waren die CBF-Veränderungen durch die unterschiedlich konzentrierten Salbutamol-, Thymol- und Silymarin-Konzentrationen, bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert, in beiden Modellen identisch.

Vergleicht man die Beeinflussung der CBF im Schweinetracheaepithel-Primärzellmodell mit denen im Modell der isolierten Axoneme und der EpiAirway™ Membranen, zeigt sich das gleiche Resultat. Auch zwischen den in diesen beiden Modellen erzielten Ergebnissen können bei allen drei eingesetzten Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen keine statistisch signifikanten Unterschiede erkannt werden. Obwohl auch in dem Modell der isolierten Axoneme die durchschnittliche Basisfrequenz nach ATP-Zugabe mit durchschnittlich 5 Hz deutlich unter der in allen anderen Modellen lag, wurde die CBF, bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert, im identischen Ausmaß beeinflusst.

Ähnliches gilt im Vergleich zwischen dem Modell der EpiAirway™ Membranen mit einem durchschnittlichen Basisfrequenzwert von 8-15 Hz und den isolierten Axonemen. Mit Ausnahme der 500 µmolaren Thymol-Konzentration, die in dem Modell der Humanzellen die CBF auf 122,55 % und im Modell der isolierten Axoneme auf 144,58 % ($p < 0,05$) erhöht, sind auch hier keine weiteren signifikanten Unterschiede im Bezug auf die CBF-Beeinflussung festzustellen (siehe Abb. 5.38).

Die Methode der CBF-Messung auf den EpiAirway™ Membranen stellte im Rahmen dieser Arbeit das einzige Modell dar, bei dem die Schlagfrequenzen an humanen Zilien gemessen wurden. Daher ist es von besonderem Interesse, ob im Vergleich zu den anderen Methoden Unterschiede der CBF-Beeinflussung deutlich werden. Vergleicht man die Ergebnisse der CBF-Messung an den EpiAirway™ Membranen mit denen der Rattentrachea, so können nur für die 100 µmolare Salbutamol-Konzentration sowie für die 500 µmolare Thymol-Konzentration statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden. Während 100 µM Salbutamol die CBF im Ratten-Ring auf 118,54 % erhöht, liegt die von drei unabhängigen Messungen auf den Membranen bei durchschnittlichen 111,56 % ($p < 0,05$, siehe Abb. 5.39). Werden die Ratten-Explantate dagegen mit 500 µM Thymol inkubiert, steigt die mittlere CBF auf 139,10 % und auf 122,55 % ($p < 0,05$) bei den Humanzellen (siehe Abb. 5.40). Alle anderen Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen erhöhen die CBF in beiden Modellen im identischen Ausmaß.

Einen entscheidenden Unterschied im Bezug auf die Ergebnisse der CBF-Messungen der verschiedenen Modelle kann demnach im Hinblick auf den Ursprung des Materials nicht beobachtet werden. Sowohl das Ratten-, die beiden Schweine- als auch das Human-Modell zeigen die gleichen Ergebnisse. Allerdings können Unterschiede an der Durchführung und Praktikabilität festgemacht werden. Während die EpiAirway™ Membranen die einfachste, zeitsparendste, zugleich aber kostenintensivste Methode zur CBF-Messung darstellt, sind die beiden Modelle der isolierten Axoneme und der Schweinetracheaepithel-Primärzellen die aufwendigsten. Da sie in der Anwendung und Durchführung der Versuche sehr komplex sind, beanspruchen sie neben viel Zeit auch einiges Geschick. Das Modell der Rattentrachea-Explantate stellt dagegen ein sehr schnelles, ebenfalls gut reproduzierbares, aber aufgrund des hohen Verbrauches an Trachea-Ringen auch das tierunfreundlichste Verfahren dar.

5.4 Aufnahmen der auf den EpiAirway™ gewachsenen primären Bronchialepithel-Humanzellen

Rasterelektronenmikroskopie

Um ein genaues morphologisches Bild der dicht bewachsenen Primärzellen zu erhalten und dieses mit dem der BEAS-2B Zellen vergleichen zu können, wurden von den EpiAirway™ Membranen elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Auf den Aufnahmen sind deutliche Zilienrasen zu erkennen, die flächendeckend auf der Zelloberfläche verteilt sind. Neben Zilien sind weitere Strukturen zu erkennen, die ebenfalls auf den Aufnahmen der BEAS-2B Zellen beobachtet werden können. Aufgrund von in der Literatur beschriebenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Bronchialepithels können diese Strukturen mit den dort gezeigten Mikrovilli verglichen werden^[170]. Im Gegensatz zu den Aufnahmen der BEAS-2B Zelllinie ist die auf den EpiAirway™ Membranen zu beobachtende flächendeckende Zilienbesetzung der Zelloberfläche sehr auffällig und charakteristisch. Selbst wenn die auf der BEAS-2B Zelllinie aufgenommenen Bewegungen von einzelnen Zilien ausgelöst worden sind, kann mit den Aufnahmen der EpiAirway™ Membranen im Gegensatz dazu das vollständige morphologische Erscheinungsbild eines funktionsfähigen Bronchialepithelgewebes gezeigt werden. Die Oberfläche der BEAS-2B Zellen (siehe Kapitel 5.1.3.1) ist in diesem Umfang nicht damit zu vergleichen, und kann daher nicht für CBF-Messungen genutzt werden.

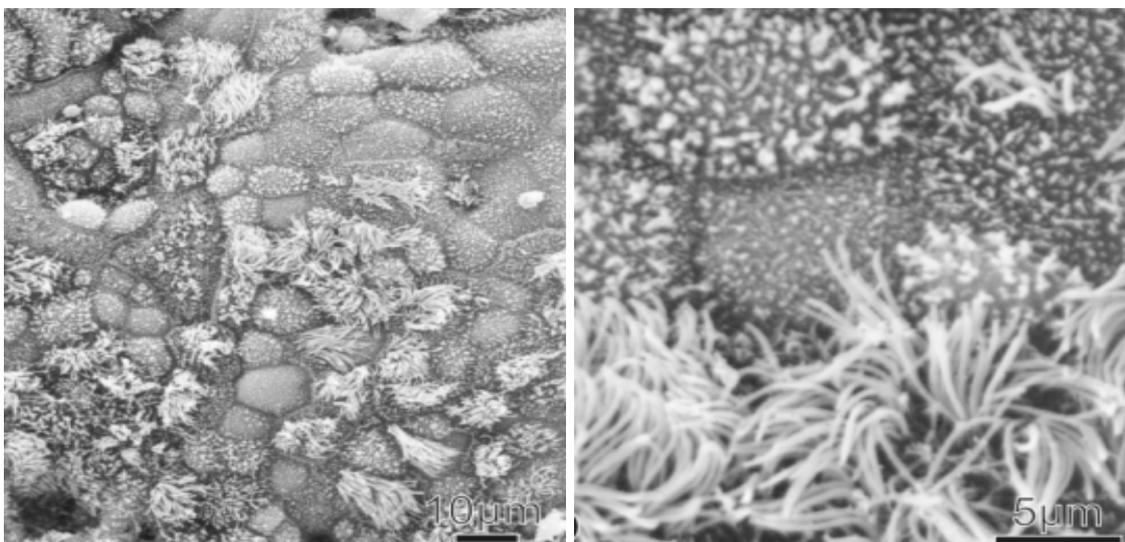


Abb. 5.42: Aufnahmen der EpiAirway™ Membranen mit dem REM

Transmissionselektronenmikroskopie

Die EpiAirway™ Membranen wurden im Institut für Medizinische Physik und Biophysik in der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie und Analytik für die Aufnahmen vorbereitet und präpariert (siehe Abschnitt 4.5.1). Auf den Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop sind deutlich die Querschnitte der Zilien zu erkennen. Sie zeigen das charakteristische Mikrotubulinmuster von $9 \times 2 + 2$ (siehe Kapitel 1.4.1 und Abb. 5.43). Diese Aufnahmen sind mit Aufnahmen vom Bronchialepithel aus der Literatur vergleichbar und die Strukturen können so eindeutig zugewiesen werden^[170]. Im Gegensatz zu den Zellen auf den EpiAirway™ Membranen zeigen die BEAS-2B Zellen dieses Muster nicht, was ein weiterer Hinweis dafür ist, dass auf der BEAS-2B Zelllinie keine Zilien exprimiert werden. Allerdings sollte auch hier berücksichtigt werden, dass die Zilien bei der Präparation der Membranen exakt durchgeschnitten werden müssen, um so dargestellt werden zu können, wie in dem Fall der mit Zilien flächendeckend besetzten EpiAirway™ Membranen. Sollten einzelne Zilien auf den BEAS-2B Zellen vorhanden sein, ist ein genaues Treffen dieser Zellen bei der Präparation eher unwahrscheinlich oder unmöglich. Allerdings kann mit diesen Aufnahmen eine ähnliche Besetzung der BEAS-2B Zelloberfläche mit einem Zilienrasen ausgeschlossen werden.

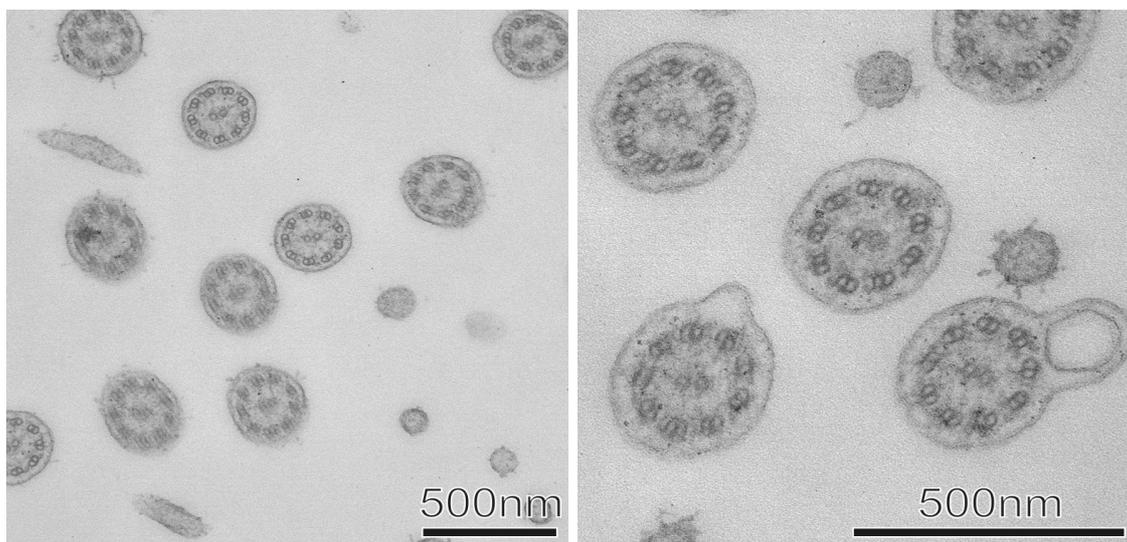


Abb. 5.43: Aufnahmen der EpiAirway™ Membranen mit dem TEM

6 Diskussion

6.1 Morphologische Charakterisierung der BEAS-2B Zellen

Die BEAS-2B Zellen wurden schon von vielen Arbeitsgruppen aufgrund ihrer immunologischen Eigenschaften für diverse Untersuchungen herangezogen^[171, 172]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen dieser Art weitergeführt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Bronchialepithelzelllinie in der Lage ist, Zilien auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Diese Zilien sollten besonders für Fragestellungen verwendet werden können, in denen es um die Messung und die Beeinflussung der Ciliary Beat Frequency (CBF) gehen sollte. Da die Literatur bezüglich des Zilienbesatzes auf den Zellen sehr widersprüchlich ist, sollen die hier gemachten Ergebnisse zur Aufklärung der morphologischen Eigenschaften der BEAS-2B Zelllinie beitragen.

Nach der Kultivierung der BEAS-2B Zellen auf Deckgläschen konnten unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop sich bewegende, fädige Strukturen erkannt und mittels der Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet werden. Mit der Analysesoftware SAVA konnte eine stabile Frequenz von ungefähr 2 Hz über eine längere Zeit gemessen werden. Allerdings waren die rotierenden Strukturen nicht flächendeckend zu beobachten und mussten auf dem Deckgläschen gesucht werden; sie machten schätzungsweise an der Oberfläche einen Anteil von 10 % aus. Auch die Inkubation der Zellen mit Substanzen, deren CBF-erhöhende Eigenschaften bereits gezeigt werden konnten (siehe Kapitel 5.2), führte zu keiner Frequenzsteigerung. Auch nach der Inkubation der BEAS-2B Zellen mit der 2,5 mmolaren ATP-Lösung, wie sie bei der CBF-Messung der isolierten Axoneme zum Einsatz kam, konnte keine Frequenzsteigerung beobachtet werden.

Da die sich bewegenden Strukturen nicht eindeutig als Zilien identifiziert werden konnten, folgten weitere Untersuchungen, die Aufschluss über den exakten Aufbau der Zelloberfläche geben sollten. Die Aufnahmen der Zellen mit dem REM, die nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten und -bedingungen aufgenommen wurden, zeigen nicht wie angenommen einen flächendeckenden Zilienrasen. Lediglich ein Mikrovilli-Besatz, wie er in der Literatur beschrieben und gezeigt ist, ist auf der Zelloberfläche zu erkennen^[7]. Da Mikrovilli ebenso typisch für Bronchialepithelzellen sind wie Zilien, jedoch nur für die Oberflächenvergrößerung zuständig sind und sich

aufgrund ihrer Eigenschaften nicht bewegen können, sind damit die rotierenden Strukturen unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop nicht zu erklären. Zu bedenken ist weiterhin, dass die Bewegungen nicht flächendeckend über das gesamte Deckgläschen verteilt waren, sondern gezielt gesucht werden mussten. Dieser Aspekt erschwert die Präparation der Proben für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Es müsste genau der Teil der Probe präpariert werden, der tatsächlich die bewegenden Strukturen aufweist. Da aber nur ein kleiner Teil mit dem Elektronenmikroskop untersucht wurde, erwies sich die exakte Präparation als äußerst schwierig bis unmöglich.

Daher sollten weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Oberflächenstruktur durchgeführt werden. Da Zilien aufgrund ihrer Funktion einen speziellen Aufbau aufweisen, sollten sogenannte Zilienmarker nachgewiesen werden. Axonemales Dynein ist durch seine ATPase-Aktivität essenziell für die Bewegung der Zilien und ist zudem ein spezifischer Nachweisfaktor für Axoneme, da dieses Protein nur in den sich bewegenden Dyneinarmen vorkommt^[134, 135, 159]. β_1 -Tubulin ist ein weiteres für Zilien spezifisches Protein, dessen Existenz als Nachweis von Zilien auf der Oberfläche der BEAS-2B Zellen gilt. Durch Inkubation eines Anti- β_1 -Tubulin-Antikörpers (0,2-20 $\mu\text{g/ml}$) mit Zilien hat die Arbeitsgruppe um Vent *et al.* zeigen können, dass die ziliäre Schlagfrequenz u. a. vom Vorhandensein dieses Proteins abhängig ist, während andere Epitope des β -Tubulins, wie β_2 - und β_3 -Tubulin oder das α -Tubulin keinen Einfluss auf die CBF zeigten^[130].

Auch in dieser Arbeit konnte nach Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ des Anti- β_1 -Tubulin-Antikörpers eine verminderte ziliäre Schlagfrequenz beobachtet werden, bis die Zilien bei höheren Konzentrationen (20 $\mu\text{g/ml}$) des Antikörpers ihre Funktion vollständig einstellten. Dass die Bewegung der Zilien zudem von dem axonemalen Dynein abhängig ist, konnte ebenfalls durch Zugabe des entsprechenden Antikörpers beobachtet werden. Die Zilien verlangsamten hierbei ebenfalls ihre synchronen Schlagfrequenzen (bereits bei 2 $\mu\text{g/ml}$), bis es auch bei höheren Konzentrationen (10 $\mu\text{g/ml}$) zu einer Ziliostasis kam (Daten bei jeweils zwei unabhängigen Versuchen erhoben, aber nicht gezeigt).

Beide Zilienmarker konnten darüber hinaus in dieser Arbeit in der BEAS-2B Zelllinie mittels der Immunfluoreszenz, des Dot Blot-Verfahrens und des goldmarkierten Immunlabelings nachgewiesen werden. Durch alle drei Nachweismethoden kann somit die theoretische Voraussetzung für die Bildung von funktionsfähigen Zilien auf

den Zellen bestätigt werden. Um einen Vergleich mit eindeutig zilienbesetzten Zellen herstellen zu können, sollten die beiden Zilienmarker auch in den selbst angelegten und kultivierten Schweinetracheaepithel-Primärzellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Zwischen den beiden Aufnahmen sind bezüglich der Fluoreszenz keine Unterschiede zu erkennen. Lediglich die Form der Primärzellen unterscheidet sich von der der BEAS-2B Zellen. Wie bei der permanenten Zelllinie ist auch bei den mit Zilien besetzten Primärzellen die Fluoreszenz der Probe mit dem Anti- β_1 -Tubulin-Antikörper stärker ausgeprägt als bei der Probe mit dem Anti-Dynein-Antikörper.

Ob die mit der Hochgeschwindigkeitskamera auf den Deckgläschen aufgenommenen Bewegungen tatsächlich auf Zilien zurückzuführen sind, die durch Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop nicht getroffen wurden, oder ob es sich um Artefakte handelt, kann abschließend nicht geklärt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die BEAS-2B Zellen keinen flächendeckenden Zilienbesatz, sondern höchstens nur einzelne Zilien aufweisen. Für Fragestellungen, die die CBF-Messung betreffen, ist die Zelllinie somit nicht geeignet und muss in dem Fall durch andere Methoden ersetzt werden.

Mögliche Alternativmethoden, die stattdessen zur Messung der Ciliary Beat Frequency eingesetzt werden können, wurden daher ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit getestet, charakterisiert, bewertet und miteinander verglichen.

6.2 Vergleich der Methoden zur CBF-Messung

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden insgesamt vier verschiedene Modelle zur Messung der ziliären Schlagfrequenz im Arbeitskreis etabliert, bewertet und bezüglich ihrer Vor- und Nachteile miteinander verglichen. Die Modelle unterscheiden sich sowohl in der Methodik, im Aufbau, in der Komplexität, in der Lagerung der Objekte als auch in der Zeit- und Kostenintensität der Durchführung. Einen weiteren wichtigen Vergleichsparameter stellt die Herkunft der Ausgangsmaterialien dar. Es wurden Materialien von drei unterschiedlichen Spezies -Ratte, Schwein und Mensch- verwendet. So können sowohl vergleichende Aussagen über die Ergebnisse bezüglich der CBF-Messungen im Hinblick auf die

Spezies als auch im Hinblick auf den Aufwand und die Benutzerfreundlichkeit der verschiedenen Ausgangsmaterialien gemacht werden.

Zunächst wurde das Modell der Rattentrachea-Explantate etabliert. Diese Methode ist durch den mengenmäßig höchsten Einsatz von Tieren gekennzeichnet, jedoch erwies sich das Modell über den gesamten Versuchszeitraum als sehr zuverlässig und stabil. Allerdings stellen die im Minutentakt gemachten Aufnahmen nur eine Momentaufnahme der Zilien dar, was dazu führt, dass es innerhalb der Versuchsdauer zu Schwankungen der Messwerte kommt. In allen eingesetzten Methoden konnten diese aber durch entsprechend lange Inkubationsintervalle relativiert werden. Die Methode stellte sich als insgesamt sehr einfach und unkompliziert dar, da der Aufwand für Vorbereitung und Durchführung der Versuche sich im Vergleich zu den anderen Methoden als sehr gering erwies. Die Trachea musste den Ratten nur entnommen, gereinigt und in dünne Ringe geschnitten werden. Durch die Aufbewahrung im Medium und den regelmäßigen Mediumwechsel konnten die Explantate bis zu einer Woche ohne Funktionsverlust gelagert werden. Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass die Zeit von der Präparation bis zu einer möglichen Versuchsdurchführung nur einen Tag betrug.

Die zweite beschriebene Methode, um die CBF an Bronchial- bzw. Tracheaepithelmodellen messen zu können, stellt die Kultivierung von selbst angelegten Schweinetracheaepithel-Primärzellkulturen dar. Dazu wurden Tracheen von geschlachteten Schweinen verwendet und im Labor entsprechend präpariert. Im Vergleich zu der ersten beschriebenen Methode ist dieses Modell daher weitaus zeit- und kostenintensiver. Die Zeit zwischen der Präparation bis zur möglichen Versuchsdurchführung beträgt ca. vier Wochen, da die Zellen bis zur ersten Passagierung mindestens eine Woche in den Zellkulturflaschen und danach noch weitere drei Wochen in einer Air-Liquid-Schicht auf semipermeablen Membranen wachsen müssen. Nur so kann eine vollständige Ausdifferenzierung der Zelloberfläche mit einem entsprechenden Zilienbesatz gewährleistet werden. Ein Vorteil dieser Methode besteht in der Reduzierung zusätzlicher Tierversuche im Vergleich zu dem Rattentrachea-Modell. Die Tracheen wurden den Schweinen nach einer routinemäßigen Schlachtung zur Fleischgewinnung entnommen, so dass keine Tiere nur für diesen Trachea-Versuch getötet werden mussten. Allerdings zeigte sich ein deutlicher Nachteil dieses Modells in der Zuverlässigkeit der Ausführung. Im

Rahmen dieser Arbeit musste die Primärkultur fünfmal neu angelegt werden, um schließlich die Versuche in ihrer Gesamtheit durchführen zu können. Einerseits erwies sich die Kultivierung der Primärzellen als sehr komplex und schwierig, andererseits mussten neue Kulturen angelegt werden, da die Funktionalität und Beweglichkeit der Zilien nach den ersten beiden Passagen deutlich nachließen. Die Ergebnisse dieser Methode konnten jedoch im Vergleich ebenso gut reproduziert werden wie die der zuvor genannten Methode. Die durchschnittliche Basisfrequenz der Zilien auf den Primärzellen liegt unterhalb der durchschnittlichen Schlagfrequenz der Zilien im Rattentrachea-Modell. Während dort im Durchschnitt Frequenzen von 10 bis 20 Hz gemessen werden können, liegt das Ausgangsniveau der Zilien im Schweinetrachea-Primärzellmodell lediglich zwischen 7 und 10 Hz. Das Ausmaß der Frequenzveränderungen, jeweils bezogen auf den am Anfang aufgenommenen Kontrollwert, war mit identischen Substanzkonzentrationen in beiden Modellen aber vergleichbar.

Ein bereits von Hasti *et al.*, Sisson *et al.* und Vent *et al.* angewendetes Zilienmodell^[130, 137] beschreibt ein weiteres im Rahmen dieser Arbeit getestetes und charakterisiertes Modell zur CBF-Messung. Die Durchführung war der von Hasti *et al.* angelehnt, doch mussten einige Schritte variiert werden. So konnte der von der Arbeitsgruppe beschriebene Zentrifugationsschritt der isolierten Axoneme zur besseren Anheftung an den Wellboden einer 24er-Well-Platte nicht durchgeführt werden, da die Axoneme nach der Zentrifugation nicht mehr schlagfähig waren. Auch nach Zugabe der 2,5 mM ATP-Lösung konnten keine Schlagfrequenzen aufgenommen werden. Um den schädigenden Einfluss der Zentrifugation zu umgehen, wurden die Axoneme mit einem Deckgläschen fixiert und auf diese Weise auf einen Objektträger gedrückt, damit sie im inversen Phasen-Kontrast-Mikroskop sichtbar wurden.

Während der Aufwand dieser Methode vergleichbar mit dem der Schweinetrachea-Primärzellkultur ist, ergibt sich in dem kürzeren Zeitraum zwischen Präparation und möglicher Versuchsdurchführung ein entscheidender Vorteil für dieses Zilienmodell. Da theoretisch der Versuch sofort nach Präparation der Trachea durchgeführt werden kann, ist das hierfür benötigte Zeitintervall minimal. Allerdings erfordert die Präparation mehr Zeit als im Rattentrachea-Modell und vergleichbar viel Zeit wie im Schweinetrachea-Primärzellkulturmodell. Die Reproduzierbarkeit der

Schlagfrequenzmessungen ist im Verhältnis zu den anderen beschriebenen Methoden im gleichen Umfang gegeben, da nach Zugabe der ATP-Lösung die Energieversorgung der Zilien gewährleistet ist und die Frequenz über die gesamte Versuchsdauer konstant gehalten wird. Ein weiterer Vorteil besteht zusätzlich in der Lagerung. Zum einen ist sie sehr anspruchslos, da die separierten Axoneme aliquotiert in einer Sucroselösung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden, zum anderen können die Axoneme im Vergleich mit den anderen Modellen am längsten gelagert werden. Für sechs Monate sind sie unter den genannten Bedingungen lager- und einsetzbar. Zuletzt besteht ein deutlicher Unterschied zu den anderen Modellen in der durchschnittlichen Basisfrequenz der Kontrolle. Das Ausgangsniveau ist mit durchschnittlich 5 Hz im Vergleich am niedrigsten. Allerdings liegen die Frequenzänderungen, bezogen auf den jeweiligen Kontrollwert, im gleichen Verhältnis wie bei den anderen CBF-Modellen und haben daher keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Im Mittelpunkt des letzten Modells zur Messung der CBF, das getestet, bewertet und verglichen wurde, stehen die kommerziell erhältlichen EpiAirwayTM Membranen. Auf diesen Membranen wachsen humane Tracheaepithelzellen, die hier von gesunden Spendern gewonnen wurden. Die Membranen wurden bis zum 20. Kultivierungstag von den Herstellern versorgt und dann verschickt, so dass direkt und ohne Zeitverlust mit den Versuchen begonnen werden konnte. Da somit die eigene Präparation entfiel, war der Aufwand dieser Methode im Verhältnis zu den anderen am geringsten.

Die Membranen stellten sich als äußerst einfach in der Handhabung dar, und die Zilien konnten im inversen Phasen-Kontrast-Mikroskop detailliert beobachtet und mit der Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen werden, da die Zellen auf durchsichtigen Membranen wuchsen. Einer der Hauptvorteile besteht darin, dass der Zilienbesatz auf der gesamten Fläche zu beobachten war und sich demnach mehrere Stellen auf Anrieb zur Untersuchung eigneten. Die erzielten Ergebnisse sind sehr gut durch drei bis vier voneinander unabhängigen Versuchen reproduzierbar. Allerdings verloren die Zilien innerhalb einer Woche an Aktivität, und der durchschnittliche CBF-Basiswert sank von ursprünglichen 15 Hz auf später durchschnittlichen 8 bis 10 Hz. Durch Wiederholungen einiger Substanzkonzentrationen zum Ende der Versuchsreihe konnten aber die gleichen

CBF-Veränderungen in Bezug auf den Kontrollwert beobachtet werden. Somit stellte der niedrigere Ausgangswert der CBF keinen Nachteil für die exakten Messungen dar. Die Lagerung der Membranen erwies sich als sehr einfach und zeitsparend. Da die Membranen durch Abstandshalter nicht in direktem Kontakt mit dem Wellboden stehen, sorgt das Medium, welches sie von unten umgibt, für die nötige Nährstoffzufuhr. Bei einem täglichen Wechsel des Mediums können die Membranen bis zu einer Woche verwendet werden. Nachteil dieser Methode ist die kostenintensive Anschaffung der Membranen; im Vergleich zu den anderen beschriebenen Methoden ist der Einsatz der EpiAirway™ Membranen die teuerste Alternative der CBF-Messung.

Allerdings könnte in weiteren Untersuchungen mit ähnlichen und weiterführenden Fragestellungen von Vorteil sein, dass die EpiAirway™ Membranen auch mit Tracheaepithelzellen von COPD-Patienten und von Rauchern erhältlich sind. Auf diese Weise könnten dadurch bedingte Unterschiede der ziliären Schlagfrequenz erkannt und analysiert werden.

Da im Hinblick auf die Präzision und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse keine relevanten Unterschiede der einzelnen Methoden und der Ausgangsmaterialien der verschiedenen Spezies festgestellt werden konnten, ist eine Beurteilung der Methoden nur unter den Aspekten der Durchführungsart und Anwenderfreundlichkeit sinnvoll.

Abschließend und zusammenfassend stellen die EpiAirway™ Membranen die einfachste, zeitsparendste, anwenderfreundlichste sowie facettenreichste, aber auch teuerste Methode zur CBF-Messung dar.

Ähnliche Vorzüge zeigt die Methode der Rattentrachea-Ringe, die vor allem durch die einfache Präparation und Lagerung überzeugt. Jedoch stellt sie darüber hinaus auch die Methode mit der höchsten Einsatzzahl von Tieren dar.

Zuletzt sind die Methoden der Schweinetrachea-Primärzellkultur und der isolierten Axoneme zu nennen. Beide sind in ihrer Durchführung sehr zeit- und arbeitsintensiv. Im Gegensatz zu den anderen beiden Modellen weisen sie einen komplizierteren und aufwendigeren Versuchsaufbau auf.

Wenn Vor- und Nachteile gegeneinander aufgewogen werden, bieten die Modelle der EpiAirway™ Membranen und der Rattentrachea-Ringe mehr Vorteile als die

anderen beiden Methoden und wären daher bei ähnlichen Fragestellungen, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit behandelt wurden, vorzuziehen.

6.3 Immunologische und zytotoxische Untersuchungen

RANTES-Messungen

Mit den RANTES-Messungen, die ebenfalls am Modell der BEAS-2B Zellen durchgeführt wurden, sollte getestet werden, welche Substanzen in der Lage sind, die Bronchialepithelzellen immunologisch positiv zu beeinflussen. Sollten verschiedene Wirkstoffe die RANTES-Sekretion hemmen können, so könnten sie einen großen Benefit in der Behandlung vieler Atemwegserkrankungen darstellen, da das Chemokin ein Triggerfaktor für ein weiteres Entzündungsgeschehen ist (siehe Kapitel 1.5.1). Dass die BEAS-2B Zelllinie nach Stimulation das Chemokin freisetzt und somit für diese Untersuchungen ein geeignetes Testmodell darstellt, wurde bereits in vielen vorangegangenen Arbeiten gezeigt^[1, 171, 172]. Die Testsubstanzen, die schon mehrfach auf die RANTES-reduzierenden Eigenschaften getestet wurden, sind u. a. Glucokortikoide^[154-156, 173], die gerade wegen ihren antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften in der Therapie von Atemwegserkrankungen eingesetzt werden. So konnte die Arbeitsgruppe um Stellato *et al.* zeigen, dass nach einer achtstündigen Vorinkubation der BEAS-2B Zellen mit Budesonid-Konzentrationen von 10^{-9} - 10^{-7} M und nachfolgender Stimulation mit 100 ng/ml TNF- α nach 24 Stunden die RANTES-Freisetzung gehemmt werden konnte. Mit der niedrigsten eingesetzten Budesonid-Konzentration von 10^{-9} M wurde die RANTES-Freisetzung dadurch auf ca. 30 % und mit 10^{-8} M sowie 10^{-7} M auf unter 10 % reduziert. Wurden die BEAS-2B Zellen nach der Vorinkubation mit 10^{-7} M Budesonid allerdings mit TNF- α plus IFN- γ in einer Konzentration von jeweils 100 ng/ml stimuliert, konnte die RANTES-Freisetzung in den Überstand nach 24 Stunden nur auf ca. 40 % gesenkt werden^[1].

In Bezug zu den in dieser Arbeit eingesetzten, aber geringer konzentrierten Stimulanzen TNF- α und IFN- γ (jeweils 10 ng/ml) können die RANTES-reduzierenden Eigenschaften einiger hier untersuchter Substanzen mit dem für das Budesonid gezeigten Effekt verglichen werden.

So konnte beobachtet werden, dass gerade die beiden ätherischen Öle Thymol und Myrtol, die bereits in der Therapie von Atemwegserkrankungen eingesetzt werden, die RANTES-Freisetzung in den hier eingesetzten Konzentrationen von 500 μM bzw. 0,1 % auf unter 10 % reduzieren können. Aber auch Silymarin, das bislang nur wegen seines hepatoprotektiven Effektes therapeutisch genutzt wird, konnte die Chemokin-Konzentration auf unter 10 % reduzieren.

Die bereits von Miyabayashi *et al.* gezeigte Hemmung der RANTES-Freisetzung der BEAS-2B Zellen nach Vorinkubation mit Isoprenalin und nachfolgender Stimulation der Zellen durch IL-1 β (1 ng/ml) sowie TNF- α (10 ng/ml)^[2] konnte in dem Ausmaß im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Während die Arbeitsgruppe von Miyabayashi *et al.* in diesem Modell der Chemokin-Messung einen Rückgang der RANTES-Freisetzung mit 100 μM Isoprenalin um 93,5 % zeigen konnte, wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen bei dieser Konzentration lediglich eine Hemmung auf 94,22 % beobachtet. Allerdings könnten die unterschiedlichen Ergebnisse mit den jeweiligen Versuchsbedingungen und -durchführungen erklärt werden. Während die Arbeitsgruppe von Miyabayashi *et al.* eine Inkubation von insgesamt 48 Stunden wählte, wurden die Zellen im Rahmen dieser Arbeit lediglich für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Die Arbeitsgruppe konnte zwar eine zeitabhängige Erhöhung der RANTES-Freisetzung nach Stimulation der Zellen mit dem Zytokin-Mix zeigen^[2], was für eine stärkere Sezernierung des Chemokins nach 48 Stunden sprechen würde, jedoch könnte auch eine doppelt so lange Inkubation der Zellen mit Isoprenalin eine stärkere Hemmung der RANTES-Freisetzung bedingen. Um das zu bestätigen, müssten weitere Versuche mit Isoprenalin durchgeführt werden, in denen die Inkubationszeit auf 48 Stunden zu verlängern wäre.

Der Effekt des Salbutamols hinsichtlich der RANTES-Hemmung war bereits in der Arbeitsgruppe von Hallsworth *et al.* Gegenstand der Untersuchungen^[57]. Allerdings dienten humane Primärkulturen glatter Atemwegsmuskulatur (ASM) der Arbeitsgruppe als Testmodell. Nachdem die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Salbutamol (10^{-9} bis 10^{-6} M) für 30 Minuten inkubiert und danach entweder mit IL-1 β (1 ng/ml) oder TNF- α (10 ng/ml) stimuliert wurden, konnte die

RANTES-Freisetzung in den Überstand bei der höchsten Salbutamol-Konzentration auf bis zu 50 % gesenkt werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den hier gezeigten, wird deutlich, dass Salbutamol an dem Modell der glatten Muskulatur offensichtlich einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die RANTES-Hemmung besitzt als an den BEAS-2B Zellen. Während hier mit 10 μM Salbutamol lediglich ein Rückgang des Chemokins auf ca. 97 % und mit 1000 μM auf 63 % beobachtet werden kann, ist mit der 1000fach niedrigeren Konzentration (1 μM) an der glatten Muskulatur eine Reduzierung auf ca. 50 % möglich. Im Zusammenspiel dieser beiden Zellarten ergibt sich auf diese Weise ein evtl. additiver Effekt, der die Therapie neben der Spasmolyse günstig beeinflusst. Diese synergistische Eigenschaft des Salbutamols könnte in weiteren Versuchen mit einer aus Bronchialepithelzellen und Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur bestehenden Co-Kultur untersucht werden.

Da die gezeigte Verminderung der RANTES-Sekretion mit in wässrigem Medium gelösten Silymarin erzielt wurde, müssen hauptsächlich die wasserlöslichen Bestandteile dafür verantwortlich sein. Da die in dem Gemisch vorkommenden und für die Indikation der toxischen Lebererkrankungen als wirksamer Hauptbestandteil geltenden Flavonolignane allerdings wenig wasserlöslich sind, wurde im Vergleich Silymarin in verschiedenen Konzentrationen DMSO (0,1, 0,2 und 0,3 %) und Ethanol (0,5 %) gelöst und auf seinen RANTES-beeinflussenden Effekt an BEAS-2B Zellen überprüft. Während in Medium gelöstes Silymarin in einer Konzentration von 100 μM die RANTES-Freisetzung auf ca. 6 % hemmt, reduziert die gleiche Silymarin-Konzentration in 0,1 % und 0,3 % DMSO die Chemokin-Sezernierung auf ca. 8 %. Die vollständige Lösung des Silymarins in 0,2 % DMSO reduziert den RANTES-Spiegel im Überstand der Zellen sogar nur auf 9,4 %. Wurde die Substanz dagegen in 0,5 % Ethanol gelöst, konnte die RANTES-Konzentration im Überstand auf 3,5 % gesenkt werden (Daten bei zwei unabhängigen Versuchen erhoben, aber nicht gezeigt.). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Silymarin in wässrigem Milieu gelöst in Bezug auf die RANTES-Freisetzung zu ähnlichen Resultaten führt wie die vollständige Lösung der Substanz in DMSO oder Ethanol. Anscheinend sind für die beobachteten Effekte hauptsächlich die vorwiegend wasserlöslichen Inhaltsstoffe des Silymarins, wie einige enthaltene Flavonoide, verantwortlich. Dieser Umstand würde

den Einsatz in der Therapie erleichtern, da die Resorption von wasserlöslichen Substanzen im humanen Organismus erheblich leichter ist.

Der von Matsuda *et al.* postulierte protektive Effekt des Silymarins auf β -Zellen des Pankreas^[80] kann somit mit den hier beobachteten RANTES-reduzierenden Eigenschaften ergänzt werden. Während das Silymarin hier im wässrigen Milieu gelöst wurde, wurde es von der Arbeitsgruppe um Matsuda *et al.* in DMSO vollständig in Lösung gebracht. Mit einer Silymarin-Konzentration von 100 μ M konnten Matsuda *et al.* zeigen, dass auch nach folgender Stimulation der Zellen durch ein Zytokin-Mix (IL-1 β und IFN- γ) ein protektiver Effekt hervorgerufen wird und Silymarin die β -Zellen des Pankreas vor der zytokinbedingten Schädigung schützen kann. Diese Eigenschaft des Silymarins kann demnach auch auf das Modell der Bronchialepithelzellen übertragen werden, die durch einen aus jeweils 10 ng/ml IFN- γ und TNF- α bestehenden Zytokin-Mix zur RANTES-Sezernierung angeregt wurden und ebenfalls durch die vorherige Inkubation mit der wässrigen Lösung des Silymarins geschützt wurden.

Der beobachtete RANTES-reduzierende Effekt des Xylometazolins könnte auf den ersten Blick als positive Wirkung auf das Bronchialepithel angesehen werden, da aus der Applikation des α -Sympathomimetikums eine verminderte Entzündungsreaktion resultieren würde. Da aber im LDH-Test ein zytotoxischer Effekt des Xylometazolins auf die BEAS-2B Zellen gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass eine verminderte RANTES-Produktion lediglich durch eine geringere Zahl funktionstüchtig Zellen zustande kommt; der protektive Effekt des Xylometazolins wäre demnach nur vorgetäuscht. Die Anwendung von xylometazolinhaltigen Nasensprays *in vivo* sollte daher weiterhin als bedenklich eingestuft werden und jeder Einsatz mit einer gründlichen Nutzen-Risiko-Korrelation abgewogen werden. Allerdings konnte bei *in vivo* Untersuchungen der zytotoxische Effekt in dem Ausmaß nicht bestätigt werden, wie er auch in anderen Arbeiten *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Das könnte auf einen Verdünnungseffekt durch den applizierten Sprühstoß und den schützenden Mucus, der das Bronchialepithel bedeckt, zurückzuführen sein^[174].

Das ebenfalls häufig in Nasensprays enthaltene Benzalkoniumchlorid wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenso auf seinen RANTES-beeinflussenden Effekt überprüft. Jedoch stand bei diesen Versuchen die Frage im Vordergrund, ob die alleinige

Inkubation der Zellen mit dem Konservierungsmittel bzw. die Kombination mit TNF- α und IFN- γ einen Einfluss bzw. additiven Effekt auf die erhöhte Freisetzung des Chemokins hat. Die Ergebnisse zeigen, dass das Benzalkoniumchlorid *in vitro* zwar schon in geringen Konzentrationen zytotoxisch auf das Bronchialepithel wirkt, allerdings die Sezernierung des CCL5-Chemokins nicht beeinflusst. Weder die alleinige Inkubation der BEAS-2B Zellen mit dem Konservierungsmittel noch die Inkubation zusammen mit dem Zytokin-Mix zeigen einen über den alleinigen Effekt des TNF- α und IFN- γ hinausgehenden Einfluss auf den RANTES-Spiegel im Überstand. Zumindest auf die durch RANTES ausgelösten Entzündungsreaktionen im Atemwegsepithel übt Benzalkoniumchlorid anscheinend keine Wirkung aus.

Bezug nehmend auf die RANTES-Hemmung konnte gezeigt werden, dass alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Substanzen, mit Ausnahme des Losartans, in unterschiedlichem Ausmaß die RANTES-Freisetzung aus den BEAS-2B Zellen hemmen können. Sollte dieser Einfluss auch in *in vivo* Versuchen nachgewiesen werden können, wären die Substanzen eine gute Therapieoption für alle Atemwegserkrankungen, bei denen eine durch RANTES ausgelöste Entzündungsreaktion das Krankheitsbild charakterisiert.

LDH-Assay

Mit den durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen sollten mögliche schädigende Einflüsse der Substanzen auf das Bronchialepithel, die als pharmakologische Hemmwirkung missinterpretiert werden könnten, ausgeschlossen werden. Sollten die untersuchten Substanzen in vorherigen Versuchen die RANTES-Freisetzung hemmen können oder sich positiv auf die ziliäre Schlagfrequenz auswirken, könnten sie dennoch nicht in der Therapie eingesetzt werden, sollten sie membranschädigende Effekte am Bronchialepithel aufweisen. Aus diesem Grund musste eine evtl. von den Substanzen ausgehende Toxizität ausgeschlossen werden. Als Modell dafür diente die BEAS-2B Zelllinie.

Bei der Inkubation der Zellen mit Isoprenalin hätte die Instabilität der Substanz insbesondere bei höheren Temperaturen einige Probleme bereiten können. Da Isoprenalin in flüssigen Zubereitungen, speziell bei Wärme- und Lichteinwirkung sehr

instabil ist und einem langsamen Abbau unterworfen ist, hätte sich die korrekte Messung der Absorption als schwierig erweisen können. Da die Färbung, die die Zersetzung des Isoprenalins anzeigt, in den hier durchgeführten Untersuchungen jedoch nur sehr leicht war, beeinflusste diese die Messung der Absorption nicht. Dass das Isoprenalin nicht komplett abgebaut wurde und dadurch nicht mehr zytotoxisch auf die Zellen reagieren konnte, kann mit der höchsten Isoprenalin-Konzentration, die im Rahmen der Untersuchung eingesetzt wurde, gezeigt werden. 1000 μM Isoprenalin verursachten eine ca. 6 %ige Zytotoxizität. Wäre die Substanz abgebaut und damit nicht mehr wirksam gewesen, hätte auch hier keine Zytotoxizität beobachtet werden können. Außerdem hätten die Untersuchungen im Hinblick auf die RANTES-Freisetzung nach der 24stündigen Isoprenalin-Inkubation im Brutschrank keine Hemmung der Chemokin-Freisetzung zeigen können, da das Isoprenalin dann ebenfalls dem Abbau unterworfen wäre und damit nicht wirkungsvoll hätte sein können. In der Arbeitsgruppe von Miyabayashi *et al.* konnten sogar noch nach 48stündiger Inkubation der BEAS-2B Zellen bei 37 °C mit dem Isoprenalin Wirkungen beobachtet werden^[2].

Die bereits in geringen Konzentrationen gezeigte Zytotoxizität des häufig in freiverkäuflichen Nasensprays verwendeten Xylometazolins sollte zum verantwortungsbewussten Einsatz des α -Sympathomimetikums animieren. Selbst in einer 0,025 %igen Konzentration, wie es in Nasentropfen für Säuglinge enthalten ist, löst es *in vitro* eine erhebliche Schädigung des Bronchialepithels aus. Allerdings wird dieser Effekt *in vivo* anscheinend durch den vorhandenen und schützenden Schleimfilm auf dem Flimmerepithel in der Nase aufgehoben bzw. reduziert. Die Vernebelung der Substanz durch den Sprühstoß des Nasensprays und der zusätzliche Verdünnungseffekt aufgrund des Mucus bewirkt anscheinend *in vivo* eine deutlich geringere lokale Wirkstoffkonzentration an den Epithelzellen^[88]. Die gleiche Begründung wird für den von Boek *et al.* gezeigten *in vivo* Effekt des Xylometazolin auf die CBF des Flimmerepithels^[174] angegeben. Während in vielen Arbeiten der CBF-schädigende Effekt des Xylometazolins gezeigt werden konnte, kann dieser in den *in vivo* Untersuchungen von Boek *et al.* an gesunden Probanden nicht nachgewiesen werden.

Der gleiche Einwand ist trotz Verdünnungseffekt für das immer noch in Nasensprays verwendete Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid zu bedenken. Im Rahmen der hier durchgeführten Zytotoxizitäts-Tests konnten an den Bronchialepithelzellen für die Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen im Bereich von 0,0005 bis 0,02 % Toxizitäten von bis zu ca. 85 % beobachtet werden, so dass das im Nasenspray enthaltene Benzalkoniumchlorid höchstens unterhalb dieser Konzentrationen keine Schäden an den Zellmembranen verursacht. Da die übliche Konzentration des Benzalkoniumchlorids von im Handel befindlichen Nasensprays 0,02 % beträgt, müsste es ungefähr 100fach verdünnt werden, damit keine Schäden an den Zilien sowie an den Zellmembranen zu erwarten wären. Da der Verdünnungseffekt demnach sehr groß sein müsste, um keine zilio- und zytotoxischen Effekte hervorzurufen, sollte der Einsatz des Konservierungsmittels vermieden werden. Durch verschiedene neue Applikationstechniken, wie das COMOD[®]-System, ist dies bereits möglich, allerdings stellen diese Systeme eine kostenintensivere Alternative zu den herkömmlichen konservierungsmittelhaltigen Nasensprays dar.

Benzalkoniumchlorid-Konzentrationen über 0,02 % rufen laut den hier gemachten Untersuchungen keine Zytotoxizität an den BEAS-2B Zellen hervor. Diese auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse sind aber vergleichbar mit denen anderer Arbeiten^[175] und lassen sich mit der Wirkweise des Konservierungsmittels erklären. Da das Benzalkoniumchlorid zu den Tensiden gehört, bildet es ab der sogenannten kritischen mizellaren Konzentration (CMC) aus freien Benzalkoniumchlorid-Molekülen Mizellen, die kugelige Strukturen darstellen. Die hydrophoben Anteile befinden sich dabei im Inneren der Kugel, wobei die hydrophilen nach außen zeigen. Wie von Jelinek^[178] und Porkert^[175] postuliert, kann Benzalkoniumchlorid in Form dieser Mizellen die Zellmembranen nicht mehr permeabilisieren und trägt stattdessen zur Zellmembranfixierung ohne Zellyse bei. Auf diese Weise gelangt oberhalb der CMC des Benzalkoniumchlorids kein LDH mehr in den Überstand der Zellen und kann dort nicht mehr gemessen werden.

Da die CMC von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist, kann keine einheitliche CMC für das Benzalkoniumchlorid angegeben werden. Sie ist unter anderem bedingt von der Länge der N-Alkylreste, der Art sowie der Temperatur des Lösungsmittels, dem pH-Wert und dem Druck.

Durch den abrupten Abfall der Zytotoxizität in den Untersuchungen liegt die Vermutung nahe, dass die CMC des Benzalkoniumchlorids zwischen 0,02 und

0,04 % liegt. Dieser Wert liegt in einer Größenordnung mit in vorangegangenen Arbeiten angegebenen CMC-Werten^[175].

Die Zytotoxizität, die von Silymarin ausgelöst wird, wurde unter den gleichen Bedingungen wie in den anderen Modellen (RANTES-Freisetzung und CBF-Messung) untersucht, d. h. das wenig wasserlösliche Silymarin-Gemisch wurde in einem wässrigen Milieu gelöst. Obwohl das Substanzgemisch nur in DMSO oder Ethanol vollständig löslich ist, konnten auch in dem wässrigen Lösungsmittel hinsichtlich der RANTES-Freisetzung und der CBF-Beeinflussung positive Wirkungen erzielt werden. Im LDH-Assay zeigte das in Medium gelöste Silymarin in allen eingesetzten Konzentrationen keine Zytotoxizität.

Hinsichtlich der von den Substanzen ausgelösten Zytotoxizität konnte gezeigt werden, dass alle eingesetzten Wirkstoffe in den jeweiligen Konzentrationen, mit Ausnahme von Xylometazolin, Benzalkoniumchlorid in dem Bereich von 0,0005 bis 0,02 % und ungelöstem 2 %iges Myrtol *in vitro* keine Membranschäden an BEAS-2B Zellen verursachen. Es müssten nun *in vivo* Testungen erfolgen, mit denen man dieses Ergebnis für den Therapieeinsatz am humanen Organismus bestätigen kann.

6.4 CBF-Messungen am Rattentrachea-Explantat

Die CBF Messungen, die am Rattentrachea-Ring durchgeführt wurden, sollen Aufschluss darüber geben, welche Substanzen *in vitro* die ziliäre Schlagfrequenz erhöhen können und somit *in vivo* in der Therapie von Krankheiten eingesetzt werden könnten, die durch das Symptom einer verminderten Ciliary Beat Frequency (CBF) charakterisiert werden (siehe Kapitel 1.4).

Es wurden zum einen bereits untersuchte Wirkstoffe wie Isoprenalin und Salbutamol eingesetzt, um das Modell zunächst etablieren und Aussagen über dessen Richtigkeit und Reproduzierbarkeit treffen zu können. Zum anderen wurden auch Substanzen auf ihre CBF-beeinflussenden Effekte überprüft, die bisher in der Therapie von Atemwegserkrankungen keinen Einsatz finden.

Um ausschließen zu können, dass die Ethernarkose zur Tötung der Tiere einen Einfluss auf die CBF hat, wurden zu Beginn Vergleichsversuche mit Trachea-Ringen

von Ratten durchgeführt, die durch Barbituratnarkose getötet wurden. Da keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der ziliären Schlagfrequenz beobachtet werden konnten (Daten erhoben, aber nicht gezeigt), wurden die Tiere für weitere Versuche durch die übliche Ethernarkose getötet.

Die allgemeine Schwierigkeit der ziliären Schlagfrequenzmessung liegt in der Anfälligkeit des Flimmerepithels. Da Zilien generell sehr sensibel auf äußere Einflüsse reagieren, müssen diese für eine korrekte Messung weitestgehend ausgeschlossen werden. Das Mikroskop muss sowohl einen vibrations- als auch frequenzarmen Standort haben. Außerdem müssen die Objekte während der Messungen ausschließlich in einer gleichbleibend temperierten Durchflusskammer liegen. Da jede nur geringfügige Temperaturänderung die ziliäre Schlagfrequenz beeinflusst, muss gewährleistet sein, dass auch das zufließende Medium mit der entsprechend konzentrierten Substanz gleichbleibend temperiert ist. Dieser Umstand wurde bereits sowohl in einigen Arbeiten gezeigt^[145], in deren Mittelpunkt die CBF-Messung stand, als auch in eigenen Versuchen bestätigt, in denen die CBF-Veränderungen bei 21 °C bzw. bei 37 °C aufgenommen und ausgewertet wurden (Daten erhoben, aber nicht gezeigt). Es zeigten sich deutliche Frequenzänderungen, die bereits bei geringeren Temperaturschwankungen zu einem Bias der Versuchsergebnisse führen. Des Weiteren sollte ein kontinuierlicher, pulsarmer und volumenkonstanter Austausch des in der Durchflusskammer enthaltenen Mediums über eine Perfusionspumpe gegeben sein, um Schwankungen durch unregelmäßige äußere Einflüsse ausschließen zu können.

Ein weiteres Problem jeglicher ziliärer Schlagfrequenzmessungen stellen einige Lösungsmittel dar, mit denen die zu testenden Substanzen gemischt werden müssen, um sie vollständig in Lösung zu bringen. Ethanol-Konzentrationen bis 0,45 % beeinflussen das Schlagvermögen der Zilien in den hier untersuchten Modellen nicht, während höher konzentrierte Lösungen eine Erhöhung der CBF bzw. in sehr hohen Konzentrationen (ab 50 %) den irreversiblen Stillstand der Zilien induzieren. DMSO kann bis zu einer Konzentration von 0,3 % ebenfalls ohne CBF-beeinflussende Effekte auf das Explantat gegeben werden. Allerdings verursachen viskose Flüssigkeiten eine Erniedrigung der CBF oder sogar einen irreversiblen Stillstand der Zilien. Aus diesem Grund konnte nach der Zugabe des Präparates Aspecton® Hustentropfen in allen eingesetzten Konzentrationen nur eine irreversible CBF-Hemmung festgestellt werden. Die schützende Schleimschicht, die *in vivo* als

feiner Film über dem Bronchialepithel liegt und u. a. der Verdünnung solcher hochviskosen Flüssigkeiten dient, ist hier aufgrund des permanenten Spülens in der Durchflussskammer eventuell bereits beschädigt oder komplett entfernt worden, so dass die beobachtete Ziliostasis *in vivo* mit einem intakten Schleimfilm nicht auftritt.

Eine weitere allgemeine Schwierigkeit der ziliären Schlagfrequenzmessung, besonders in Bezug auf die korrekte Auswertung, besteht in der Schwankung der aufgenommenen CBF-Werte. Da im Minutentakt die Frequenzen der Zilien für ein paar Sekunden mittels Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen werden, diese aber nur eine Momentaufnahme hunderter synchronschlagender Zilien widerspiegelt, führt dies unweigerlich zu Ausreißern in der Statistik. Dieses Problem kann durch lange Aufnahmeintervalle relativiert werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche wurden die verschiedenen Substanzkonzentrationen für jeweils 20 Minuten zu dem Explantat gegeben, nachdem die Durchflussskammer mindestens zweimal mit der gleichen Substanzkonzentration durchspült wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit durfte während der Spülphase allerdings nicht verändert werden, um die ziliäre Schlagfrequenz dadurch nicht zu beeinflussen. Von den letzten 15 Minuten der Inkubation wurden jeweils Durchschnittswerte ermittelt. Die Kontrollwerte wurden auf die gleiche Weise bestimmt.

Nachdem der bereits von einigen Arbeiten gezeigte CBF-erhöhende Effekt der beiden β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin und Salbutamol^[59, 164] im Rahmen der hier durchgeführten Versuche mit dem Rattentrachea-Modell in einem ähnlichen Ausmaß bestätigt werden konnte, sollten auch weitere Substanzen getestet werden.

Während die Substanzen Harpagosid und Losartan die ziliäre Schlagfrequenz vermindern bzw. keinen CBF-beeinflussenden Effekt zeigen, können die Wirkstoffe Silymarin, Myrtol und Thymol die CBF des Flimmerepithels des Ratten-Ringes erhöhen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die beiden bereits in der Therapie von Atemwegserkrankungen eingesetzten Wirkstoffe Myrtol und Thymol neben ihren in anderen Arbeiten gezeigten spasmolytischen, sekretomotorischen und sekretolytischen Wirkungen (siehe Kapitel 1.6.7 und 1.6.8) in den hier eingesetzten Konzentrationen zusätzlich die CBF *in vitro* erhöhen. Das bedeutet, dass die typischen Symptome solcher Krankheitsbilder, wie zähflüssiger Schleim und seine verminderte Transportgeschwindigkeit, nach Anwendung dieser Substanzen durch

einen zusätzlichen Wirkmechanismus behandelt werden und sich der Nutzen für den Patienten erhöht. Allerdings muss beachtet werden, dass die hier verwendeten Substanzkonzentrationen außerhalb der im Sputum bzw. Blut nachgewiesenen Konzentrationen nach Thymol- oder Myrtol^[177]-Einnahme liegen. Die Arbeitsgruppe von Han *et al.* setzte in ihrem Modell der CBF-Messung Myrtol-Konzentrationen im Bereich von 75 bis 300 ng/ml und damit im therapeutischen Bereich ein, konnte damit aber *in vitro* keine Beeinflussung der CBF zeigen^[168].

Dass auch das in der Prophylaxe und Therapie von Leberintoxikationen eingesetzte Silymarin CBF-erhöhende Eigenschaften besitzt, überrascht und zeigt damit ein evtl. neues Indikationsgebiet dieses Substanzgemisches. Da darüber hinaus die RANTES-Freisetzung konzentrationsabhängig durch Silymarin vermindert wird und im LDH-Test keine membranschädigende Wirkung erkennbar ist, könnte es ebenso wie das Thymol und das Myrtol in der Therapie von Atemwegserkrankungen mit dem Symptom einer verringerten ziliären Schlagfrequenz sowie einer durch RANTES hervorgerufenen Entzündungsreaktion von großem Nutzen sein. Die mukoziliäre Clearance könnte wieder hergestellt und so einer sekundären bakteriellen Infektion vorgebeugt werden können. Durch die RANTES-reduzierende Eigenschaft könnte es eine evtl. vorhandene Entzündung stoppen und die Therapie zusätzlich günstig beeinflussen. Diese Eigenschaften müssten durch weitere *in vitro* sowie *in vivo* Versuche bestätigt werden.

Während Ibudilast in Deutschland nicht zugelassen ist, wird der Wirkstoff in Japan in der Asthmatherapie eingesetzt. Die Arbeitsgruppe von Ganbo *et al.* konnte zeigen, dass der Wirkstoff neben antiinflammatorischen Eigenschaften die Schlagfrequenz von Zilien der Nasenschleimhaut konzentrationsabhängig in einem Bereich von 4,6-46 μM erhöhen kann^[116]. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte bezüglich der RANTES-Freisetzung nur in der höchsten eingesetzten Konzentration von 200 μM eine signifikante Reduzierung des Chemokins beobachtet werden. In den niedrigeren Konzentrationen von 50 und 100 μM beeinflusste die Substanz das Freisetzungsverhalten von RANTES nicht. Im LDH-Test konnte jedoch schon für die geringste Ibudilast-Konzentration von 50 μM eine leichte membranschädigende Wirkung auf die BEAS-2B Zellen gezeigt werden. Das bedeutet, dass die von Ganbo *et al.* gezeigte CBF-erhöhende Eigenschaft mit einer Ibudilast-Konzentration erreicht

werden kann, die noch nicht zytotoxisch wirkt. Die RANTES-Hemmung allerdings kann im Unterschied dazu nur auf Kosten einer Membranschädigung erreicht werden, da für diese Wirkung höhere Substanz-Konzentrationen benötigt werden.

Wie beim Xylometazolin könnte auch hier der Grund dafür sein, dass durch die ausgelöste Zytotoxizität weniger funktionsfähige Zellen vorhanden sind.

Im Vergleich mit den anderen untersuchten Wirkstoffen bieten die Substanzen, die neben einer CBF-Erhöhung und einer RANTES-Reduzierung zusätzlich keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen, eine bessere Ausgangslage für eine erfolgreiche Therapie von Atemwegserkrankungen.

Da der von Laudanno *et al.* postulierte antiinflammatorische Effekt des Angiotensin-II-Rezeptor-Blockers Losartan am Gastrointestinaltrakt^[119] nicht durch eine Reduzierung der RANTES-Freisetzung aus den BEAS-2B Zellen ergänzt werden und die Substanz ebenso wenig die ziliäre Schlagfrequenz beeinflussen kann, ist für diesen Arzneistoff kein günstiges Wirkprofil im Hinblick auf Atemwegserkrankungen zu erwarten.

6.5 Biologische Relevanz der eingesetzten Substanzkonzentrationen

Um einen Bezug zu dem therapeutischen Einsatz der Substanzen herstellen zu können, muss die biologische Relevanz der in den hier beschriebenen Versuchen eingesetzten Substanzkonzentrationen bekannt sein. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten Dosis-Wirkungskurven der einzelnen eingesetzten Substanzen ermittelt werden, damit ein evtl. vorhandener konzentrationsabhängiger Effekt dargestellt werden kann. Inwieweit diese Konzentrationen, die am Zell- oder Explantatmodell eine Wirkung zeigten, auch biologisch relevant sind, soll im Folgenden ermittelt werden. Dabei können über das wahre Ausmaß der Resorption und des Metabolismus der Substanzen nur ungenaue Angaben gemacht werden. Vor allem der ungewisse Aspekt, nicht zu wissen, welcher Anteil der Substanzen tatsächlich an den vorgesehenen Wirkort gelangt, z. B. ins Bronchialsystem, und dort zur Wirkung kommt, macht diese Berechnungen sehr vage. Da darüber hinaus die Kinetik nicht für alle hier untersuchten Arzneistoffe

bekannt ist, können die theoretischen physiologischen Wirkspiegel nur für folgende Substanzen verglichen werden:

Die empfohlene Tagesdosierung von Silymarin beträgt für die Indikation toxischer Leberschäden 200-400 mg. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 482,44 g/mol des Silymarins errechnet sich bei einem angenommenen Verteilungsvolumen von 70 Litern und einer vollständigen Resorption der Substanz daraus ein Blutspiegel von 5,9 bis 11,8 μM . Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Silymarin-Konzentrationen lagen zwischen 10 und 1000 μM .

Allerdings sind bei Silymarin für die günstigen Effekte bezüglich der RANTES-Hemmung und der CBF-Erhöhung offensichtlich nur die hauptsächlich wasserlöslichen Inhaltsstoffe verantwortlich. Durch die Anwendung eines Spezialextraktes, der nur diese wasserlöslichen Substanzen enthält, könnte die Dosierung daher entsprechend angepasst werden.

In der Therapie der degenerativen Erkrankungen des Bewegungsapparates beträgt die Tagesdosierung der Teufelskrallenwurzel als Analgetikum bzw. Antirheumatikum 4,8 g Droge. Der vom Europäischen Arzneibuch geforderte Gehalt des Harpagosids der Arzneidroge beträgt mindestens 1,2 % und entspricht damit ungefähr 58 mg pro Tag. Mit einem Molekulargewicht von 490 g/mol und einem angenommenen Verteilungsvolumen von 70 Litern sowie einer vollständigen Resorption der Substanz errechnet sich ein Wirkstoffspiegel im Blut von 1,66 μM Harpagosid. Die in den hier durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Harpagosid-Konzentrationen lagen zwischen 10 und 1000 μM .

Die Aspecton[®] Hustentropfen, die bei Erkältungskrankheiten der Atemwege mit zähflüssigem Schleim und zur Besserung der Beschwerden bei akuter Bronchitis angewendet werden, enthalten in 10 ml Hustentropfen 2,114 g Thymiankraut-Dickextrakt. Die Tagesdosis für Erwachsene beträgt ein- bis dreimal täglich 30 bis 60 Tropfen, wobei 1 ml 30 Tropfen entspricht^[129]. Die maximale Tageshöchstdosierung entspricht demnach 180 Tropfen bzw. 6 ml Aspecton[®] Hustentropfen und damit 1,268 g Thymiankraut-Dickextrakt. Geht man von einem Verteilungsvolumen von 70 Liter und einer vollständigen Resorption der Aspecton[®] Hustentropfen aus, so erhält man eine Konzentration von 0,086 mg/ml Körpervolumen. Die Konzentrationen der

Hustentropfen, die auf ihre RANTES-reduzierende Eigenschaft getestet wurden lagen zwischen 0,5 und 2 mg/ml und damit oberhalb dieses berechneten maximalen Spiegels der Aspecton[®] Hustentropfen.

Myrtol wird in der Therapie von akuter und chronischer Bronchitis und Sinusitis in Form von magensaftresistenten Kapseln (z. B. Gelomyrtol[®] forte) in einer Tagesdosierung von 600 bis 1200 mg eingenommen. Der Blut- bzw. Sputumspiegel liegt 1-3 Stunden nach der Applikation bei 150 ng/ml bzw. 100 ng/ml je Inhaltsstoff Limonen, Cineol und Pinen^[177]. Die niedrigste im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Myrtol-Konzentration liegt ca. 300 Mal über diesen gemessenen Arzneistoffspiegeln.

Wie bereits erwähnt, konnten die auch in dieser Arbeit gezeigten zytotoxischen Effekte von Xylometazolin und Benzalkoniumchlorid auf die Bronchialschleimhaut in den handelsüblichen Konzentrationen *in vivo* nicht beobachtet werden. Als Begründung wird zum einen die Applikationsart des Nasensprays gesehen, wodurch ein feines Aerosol entsteht und das Xylometazolin somit nicht in voller Konzentration das Flimmerepithel erreicht. Zum anderen dient der auf dem Flimmerepithel gelagerte Schleimfilm wahrscheinlich als Schutzschicht und verdünnt die Xylometazolin-Konzentration zusätzlich. In den hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen wurde dieser Schleimfilm durch das mehrmalige Spülen wahrscheinlich beschädigt bzw. entfernt.

Losartan wird, oral eingenommen, nur zu 33 % resorbiert, wobei das Verteilungsvolumen 34 Liter beträgt^[118]. In der Therapie der Hypertonie beträgt die Tagesmaximaldosierung 91,52 mg Losartan. Bei einer molaren Masse von 422,9 g/mol errechnet sich daraus ein Spiegel von ungefähr 2 µM. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen lagen bis zu 100 Mal höher.

6.6 Ausblick

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass einige Substanzen ein günstiges Wirkprofil bezüglich der Reduktion der RANTES-Freisetzung und der positiven CBF-Beeinflussung besitzen, ohne gleichzeitig zytotoxische Eigenschaften zu zeigen. Dieses Wirkspektrum wurde nicht nur bei Arzneizubereitungen beobachtet, die bereits bei Atemwegserkrankungen eingesetzt werden, sondern auch bei Wirkstoffen mit bislang anderen Indikationsgebieten.

Da Wirkstoffe mit Kombination dieser Eigenschaften positiven Einfluss auf einige Atemwegserkrankungen nehmen könnten, sollten in zukünftigen Versuchen weitere Substanzen bezüglich ihrer potenziellen RANTES-reduzierenden und gleichzeitigen CBF-beeinflussenden Eigenschaften untersucht werden.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Modellen zur Messung der ziliären Schlagfrequenz könnten weitere Wirkstoffe mit bereits bekanntem sekretolytischen sowie -motorischen Wirkprofil auf ihre zusätzlichen CBF-beeinflussenden Effekte getestet werden. Für das Ambroxol, das bereits in der Therapie des Hustens zur Sekretolyse eingesetzt wird, gab es dazu in der Arbeitsgruppe von Disse *et al.* bereits Untersuchungen^[176]. Auch das Ambroxol zeigt in den durchgeführten Untersuchungen den Zusatznutzen der Erhöhung der ziliären Schlagfrequenz.

Weitere interessante Wirkstoffe, deren CBF-Beeinflussung in zukünftigen Versuchen mittels dieser Methode überprüft werden könnte, wären das N-Acetylcystein, das wie das Ambroxol als Mukolytikum eingesetzt wird. Darüber hinaus könnten aber auch Arzneidroge und ihre Inhaltsstoffe zum Einsatz kommen, die ebenfalls schon als Expektoranzien eingesetzt werden. Dies wären zum einen saponinhaltige Substanzen wie die Primelwurzel oder die Efeublätter, zum anderen ätherische Öle wie das Eukalyptus-, Pfefferminz- und Anisöl. Da sie in ihrer Zusammensetzung dem Myrtol ähnlich sind, wäre in diesem Fall auch ein Vergleich mit dem durch das Myrtol beeinflussenden Effekt auf die CBF interessant. Durch evtl. gezeigte Unterschiede der ätherischen Öle hinsichtlich ihrer CBF-Beeinflussung könnten auf diese Weise den einzelnen Inhaltsstoffen Wirkungen zugeordnet werden.

Da die hier gezeigten Wirkungen des Silymarins bezüglich der RANTES-reduzierenden und CBF-erhöhenden Eigenschaften durch eine wässrige Lösung des Substanz-Gemisches hervorgerufen wurden, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, welche Bestandteile für die gezeigten Effekte verantwortlich sind. Da die meisten Inhaltsstoffe und vor allem die hauptwirksamen Bestandteile, die für die hepatoprotektiven Eigenschaften der Arzneidroge verantwortlich gemacht werden, nicht wasserlöslich sind, würde eine Bestimmung dieser Bestandteile zur weiteren Aufklärung der wirksamen Inhaltsstoffe führen. Außerdem wäre eine Applikation von bekannten wasserlöslichen Substanzen, die die genannten Eigenschaften aufweisen, wesentlich einfacher und effektiver, da sie besser resorbiert werden könnten.

Eine weitere interessante Fragestellung für zukünftige Untersuchungen besteht in der Überprüfung einer therapeutischen Überlegenheit einer Multitarget-Therapie. So könnte es durch Kombination einiger Arzneistoffe oder einzelner Inhaltsstoffe zu synergistischen Effekten kommen, die über die Einzeleffekte der jeweiligen Substanzen hinaus gehen und somit eine effektivere Therapie bedingen als ihre alleinige Anwendung.

7 Zusammenfassung

Morphologische Charakterisierung der BEAS-2B Zellen

Die BEAS-2B Zelllinie wurde im Rahmen dieser Arbeit auf einen Zilienbesatz der Zelloberfläche untersucht. Dazu wurden Aufnahmen der Zelloberfläche mit einem Elektronenmikroskop angefertigt und es sollte mit drei unterschiedlichen Methoden die Existenz der Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein in den Zellen überprüft werden.

Ergebnisse

- Die BEAS-2B Zellen zeigen auf den elektronmikroskopischen Aufnahmen keine in Gruppen stehenden Zilien, wie es für das Bronchialepithel *in vivo* charakteristisch wäre.
- Auch durch verschiedene Kultivierungsbedingungen können die Zellen nicht zur Ausbildung eines Zilienrasens angeregt werden.
- Es können jedoch stabile Frequenzen auf den Zellen nach 2-3 Wochen Wachstumszeit von ca. 2 Hz aufgenommen werden.
- Die aufgenommenen Frequenzen können durch bekannte CBF-erhöhende Substanzen nicht beeinflusst werden.
- Die Zilienmarker β_1 -Tubulin und axonemales Dynein können nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen

- Die nachgewiesene Existenz der Zilienmarker stellt die theoretische Voraussetzung für die Zilienausbildung auf der Oberfläche der BEAS-2B Zellen dar.
- Aufgrund des Fehlens eines Zilienrasens kommen die BEAS-2B Zellen als Modell der ziliären Schlagfrequenzmessung allerdings nicht in Frage und müssen durch Alternativmethoden ersetzt werden.
- Warum die Zelllinie dennoch zilienspezifische Proteine enthält und an einigen Stellen Frequenzen aufgenommen werden können, kann abschließend nicht geklärt werden.

Weitere Modelle zur Messung der CBF

Da die BEAS-2B Zellen nach den gezeigten Ergebnissen nicht zur Bestimmung der ziliären Schlagfrequenz geeignet sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Modelle getestet, bewertet und miteinander verglichen.

Ergebnisse

- Die EpiAirway™ Membranen mit humanen Tracheaepithelzellen stellen die teuerste, aber einfachste und schnellste Methode zur Messung der ziliären Schlagfrequenz dar.
- Das Modell der Rattentrachea-Explantate zeigt seine Vorzüge ebenfalls in der kurzen und einfachen Versuchsvorbereitung und -durchführung, ist aber die Methode mit der höchsten Tiertötungsrate.
- Zu den aufwändigeren Methoden zählen die Modelle der isolierten Axoneme und der Schweine-Primärkultur, die arbeits- und zeitintensiver sind. Im Vergleich zu den anderen beiden Methoden stellen sie allerdings die kostengünstigeren Modelle dar.
- Unterschiede hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der hier vorgestellten Methoden sind nicht relevant und daher vernachlässigbar.
- Die Zilien auf der selbst angelegten Schweine-Primärkultur können nur nach den ersten beiden Passagen beobachtet werden.

Schlussfolgerungen

- Die Bandbreite der zur Verfügung stehenden Modelle zur CBF-Messung ist groß und facettenreich. Je nach Komplexität der durchzuführenden Versuchsreihe kann aus verschiedenen Modellen die jeweils passende Methode herausgesucht werden.
- Das passende Modell kann ausschließlich unter dem Gesichtspunkt der Versuchsvorbereitung und -durchführung ausgesucht werden, da bezüglich der Richtigkeit und Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Methoden keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen sind.
- Es kann keine permanenten Zelllinien mit Zilienbesatz geben, da mit den hier gemachten Ergebnissen die von Neugebauer *et al.* postulierte These^[144]

bestätigt werden kann, dass die Zilien offensichtlich nicht zu den sich teilenden Zellen gehören.

Eigenschaften	Rattentrachea-Modell	Schweine-Primärzellkultur	Zilienmodell nach Hasti <i>et al.</i>	EpiAirway™ Membranen
Ausgangsgewebe	Organ	Zellen	isolierte Axoneme	Zellen
Spezies	Ratte	Schwein	Schwein	Mensch
Reproduzierbarkeit	gegeben	gegeben	gegeben	gegeben
Stabilität	gegeben	gegeben	gegeben	gegeben
Aufwand der Durchführung	mittel	hoch	hoch	niedrig
Zeit zwischen Präparation und möglichem Versuchsbeginn	1 Tag	4 Wochen	sofort	Versuchsbeginn sofort nach Lieferung
durchschnittliche Basisfrequenz	10-20 Hz	7-10 Hz	5 Hz	8-15 Hz
Lagerung	1 Woche, Brutschrank	< 1 Woche, Brutschrank	6 Monate, eingefroren	1 Woche, Brutschrank
Versuchstiereinsatz	sehr hoch	im Rahmen routinemäßiger Schlachtung	im Rahmen routinemäßiger Schlachtung	keine Tiere
Kosten	Tieranschaffung und -haltung	in der Regel keine	in der Regel keine	hoch

Tab. 7.1: Vergleich und Gegenüberstellung der verschiedenen Methoden zur CBF-Messung

Beeinflussung der LDH-Aktivität, der RANTES-Freisetzung sowie der CBF-Veränderung am Modell der Rattentrachea

Am Modell der BEAS-2B Zellen wurden verschiedene Substanzen auf ihre zytotoxischen und immunregulierenden Eigenschaften überprüft. Testsubstanzen, die in der Lage sind nach der Inkubation mit den Zellen die RANTES-Freisetzung zu reduzieren und darüber hinaus keine schädigenden Einflüsse auf die Zellmembran auszuüben, könnten einen positiven Einfluss auf die Therapie von Atemwegserkrankungen nehmen.

Ergebnisse

- Zu den membranschädigenden Substanzen gehören sehr hohe Konzentrationen von Thymol (ab 1000 μM), Benzalkoniumchlorid (0,005 % - 0,01 %), Xylometazolin und Ibudilast (ab 2 %).
- Alle anderen eingesetzten Testsubstanzen zeigen keine LDH-Aktivität im Überstand.
- Benzalkoniumchlorid und Losartan haben keinen Einfluss auf die RANTES-Freisetzung der BEAS-2B Zellen.
- Alle anderen eingesetzten Testsubstanzen können die RANTES-Freisetzung konzentrationsabhängig in unterschiedlichem Ausmaß reduzieren.
- Die RANTES-Hemmung der Substanzen Silymarin, Myrtol und Thymol liegt sogar in einem ähnlichen Bereich wie die einiger Glucokortikoide.
- Das Fertigpräparat Aspecton[®] Hustentropfen, welches für die Therapie der Erkältungskrankheiten der Atemwege mit zähflüssigem Schleim und der akuten Bronchitis bereits zugelassen ist, kann die Chemokin-Freisetzung ebenfalls hemmen.

Schlussfolgerungen

- Bereits bekannte und in der Therapie von Atemwegserkrankungen eingesetzte Wirkstoffe, wie Thymol oder Myrtol, aber auch Substanzen mit anderen Indikationen, z. B. das hepatoprotektive Silymarin, könnten aufgrund der Ergebnisse die Therapie von Erkrankungen wie Asthma bronchiale günstig beeinflussen.

- Auch das in allen eingesetzten Konzentrationen membranschädigende Xylometazolin zeigt einen RANTES-hemmenden Effekt. Allerdings könnte die Membranschädigung selber einen Mechanismus auslösen, der verhindert, dass das Chemokin in den Überstand frei gelassen wird. Auf jeden Fall würde der Einsatz des Xylometazolin zwar einen evtl. günstigen Einfluss auf die RANTES-Konzentration haben, allerdings auf Kosten der Zytotoxizität.
- Die Ergebnisse des ELISA verdeutlichen zudem, dass der β_2 -Rezeptor-Agonist Salbutamol neben der eigentlichen bronchodilatatorischen Wirkung einen hemmenden Effekt auf die RANTES-Sezernierung ausübt. Hiermit kann ein weiterer günstiger Einfluss dieser Substanz auf die Therapie von Atemwegserkrankungen erklärt werden.

Mit den CBF-Messungen an dem Rattentrachea-Ring sollten sämtliche in dem LDH-Assay und dem RANTES-ELISA eingesetzte Substanzen auf ihre Beeinflussung der ziliären Schlagfrequenz überprüft werden. Neben der Hemmung der RANTES-Freisetzung deutet eine Steigerung der CBF und damit der mukoziliären Clearance auf einen evtl. günstigen Therapieeinfluss von Atemwegserkrankungen hin.

Ergebnisse

- Neben Testsubstanzen wie Thymol oder Myrtol, deren sekretomotorischen Eigenschaften bereits bekannt sind, können auch Substanzen mit anderen Indikationen, wie z. B. das Silymarin, die CBF erhöhen.
- Das Ausmaß der CBF-Erhöhung des Thymols, des Myrtols und des Silymarins in den hier eingesetzten Konzentrationen ist mit der von Salbutamol ausgelösten Steigerung der ziliären Schlagfrequenz vergleichbar.

Schlussfolgerungen

- Neben dem bereits bekannten günstigen Einfluss des Silymarins in der Therapie von akuten und chronischen Leberintoxikationen könnte auch der Einsatz des Substanzgemisches in der Behandlung von Atemwegserkrankungen einen günstigen Effekt haben.
- Für die gezeigten CBF- und RANTES-beeinflussenden Effekte des Silymarins sind die hauptsächlich wasserlöslichen Inhaltsstoffe verantwortlich.

Gemessene Beeinflussung der LDH-Aktivität, der RANTES-Freisetzung sowie der CBF-Veränderung am Modell der Rattentrachea

Substanzen	LDH-Aktivität (Zytotoxizität)	RANTES- Freisetzung	CBF am Trachea-Ring
Isoprenalin	∅	↓	↑↑
Salbutamol	∅	↓↓	↑↑
Silymarin	∅	↓↓	↑↑
Harpagosid	∅	↓	∅
Myrtol	∅	↓↓	↑↑
Thymol	zytotoxisch ab 1000 µM	↓↓	↑↑
Benzalkoniumchlorid	zytotoxisch im Bereich von 0,005 %- 0,02 %	∅	↓↓
Xylometazolin	zytotoxisch ab 0,025 %	↓↓	↓↓ siehe Mickenhagen et al. ^[88]
Ibudilast	zytotoxisch ab 50 µM	↓	↑ siehe Ganbo et al. ^[116]
Losartan	Versuche nicht durchgeführt, da keine Effekte auf CBF und RANTES	∅	∅
Vitamin D ₃	∅	↓	-
Aspecton [®] Hustentropfen	∅	↓↓	↓

Tab. 7.2: Übersicht der Ergebnisse bezüglich der LDH-, RANTES- und CBF beeinflussenden Effekte

∅ kein Einfluss, ↓ Erniedrigung der RANTES-Spiegel, ↑ Steigerung der CBF, ↓↓ deutliche Senkung der RANTES-Spiegel bzw. der CBF, ↑↑ deutliche Steigerung der CBF, - Versuche nicht durchgeführt

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Untere Atemwege 2 http://www.gesundheit.de/anatomie-lexikon/atemwegssystem/bronchien.shtml	2
Abb. 1.2	Querschnitt durch die Trachea 3 Wissen Media Verlag GmbH, Gütersloh/München	3
Abb. 1.3	Koordinierter Zilienschlag 5	5
Abb. 1.4	Schematische Zeichnung eines Flimmerepithels 7	7
Abb. 1.5	elektronenmikroskopischer Zilienquerschnitt..... 9	9
Abb. 1.6	molekularbiologischer Aufbau eines Mikrovillus 10	10
Abb. 1.7	Schematische Zeichnung eines Bürstensaums..... 10	10
Abb. 1.8	Strukturformel des (R)-Salbutamols 13	13
Abb. 1.9	Strukturformel des Isoprenalins 13	13
Abb. 1.10	Strukturformel des Silibinins 15	15
Abb. 1.11	Strukturformel des Xylometazolins..... 17	17
Abb. 1.12	Strukturformel des Benzalkoniumchlorids 18	18
Abb. 1.13	Strukturformel des Thymols 20	20
Abb. 1.14	Strukturformel des (R)-(+)-Limonen, 1,8-Cineols, (+)- α -Pinen..... 21	21
Abb. 1.15	Strukturformel des Losartans 23	23
Abb. 1.16	Strukturformel des 1α , 25-Dihydroxycholecalciferol 24	24
Abb. 5.1	Durch Salbutamol und Isoprenalin induzierte Senkung der RANTES-Konzentration 62	62
Abb. 5.2	Durch Silymarin und Harpagosid induzierte Senkung der RANTES-Konzentration 63	63
Abb. 5.3	Durch Xylometazolin induzierte Senkung der RANTES-Konzentration 64	64
Abb. 5.4	Durch Thymol, Myrtol und Ethanol induzierte Senkung der RANTES-Konzentration 66	66
Abb. 5.5	Durch Ibudilast und Losartan induzierte Senkung der RANTES-Konzentration 67	67
Abb. 5.6	Durch Vitamin D ₃ und Aspecton [®] Hustentropfen induzierte Senkung der RANTES-Konzentration 69	69
Abb. 5.7	Durch Salbutamol und Isoprenalin induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen 72	72
Abb. 5.8	Durch Silymarin und Harpagosid induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen 73	73
Abb. 5.9	Durch Xylometazolin induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen..... 74	74
Abb. 5.10	Durch Benzalkoniumchlorid induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen..... 76	76
Abb. 5.11	Durch Thymol und Myrtol induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen..... 77	77

Abb. 5.12	Durch Ibudilast induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen .	78
Abb. 5.13	Durch Vitamin D ₃ und Aspecton® Hustentropfen induzierte LDH-Aktivität im Überstand der BEAS-2B Zellen	79
Abb. 5.14	Entfernung des apikalen Mediums nach dem fünften Kultivierungstag.....	82
Abb. 5.15	Entfernung des apikalen Mediums nach dem fünften Kultivierungstag.....	82
Abb. 5.16	Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, ohne Spülen.....	83
Abb. 5.17	Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, mit Spülen	83
Abb. 5.18	Entfernung des apikalen Mediums nach einem Tag, ohne Spülen	84
Abb. 5.19	Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, ohne Spülen.....	84
Abb. 5.20	Entfernung des apikalen Mediums nach einem Tag, mit Spülen	84
Abb. 5.21	Entfernung des apikalen Mediums nach fünf Tagen, mit Spülen	84
Abb. 5.22	Dot Blot der BEAS-2B Zellen	86
Abb. 5.23	Dot Blot der BEAS-2B Zellen	86
Abb. 5.24	Nachweis des β_1 -Tubulins in der BEAS-2B Zelllinie mittels Immunfluoreszenz	87
Abb. 5.25	Nachweis des Dyneins in der BEAS-2B Zelllinie mittels Immunfluoreszenz ..	87
Abb. 5.26	Nachweis des β_1 -Tubulins in der Schweine-Primärkultur mittels Immunfluoreszenz	88
Abb. 5.27	Nachweis des Dyneins in der Schweine-Primärkultur mittels Immunfluoreszenz	88
Abb. 5.28	Nachweis des β_1 -Tubulins in der BEAS-2B Zelllinie mittels TEM	90
Abb. 5.29	Negativprobe durch Fehlen des Anti- β_1 -Tubulin-Antikörpers.....	90
Abb. 5.30	Nachweis des Dyneins in der BEAS-2B Zelllinie mittels TEM	91
Abb. 5.31	Negativprobe durch Fehlen des Anti-Dynein-Antikörpers.....	91
Abb. 5.32	Durch Salbutamol und Isoprenalin beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate	94
Abb. 5.33	Durch Silymarin und Harpagosid beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate	95
Abb. 5.34	Durch Benzalkoniumchlorid beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate	97
Abb. 5.35	Durch Thymol und Myrtol beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate	99
Abb. 5.36	Durch Losartan beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Rattentrachea-Explantate	100
Abb. 5.37	Durch Salbutamol, Thymol und Silymarin beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der Schweinetrachea-Primärzellen	103
Abb. 5.38	Durch Salbutamol, Thymol und Silymarin beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der isolierten Axoneme	105
Abb. 5.39	Durch Salbutamol beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der EpiAirway™ Membranen	107

Abb. 5.40	Durch Thymol und Silymarin beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der EpiAirway™ Membranen	108
Abb. 5.41	Durch Myrtol und Ethanol beeinflusste Änderung der Ciliary Beat Frequency (CBF) am Modell der EpiAirway™ Membranen	109
Abb. 5.42	Aufnahmen der EpiAirway™ Membranen mit dem REM	112
Abb. 5.43	Aufnahmen der EpiAirway™ Membranen mit dem TEM	113

9 Literaturverzeichnis

1. Stellato, C., Beck, L.A., Gorgone, G.A. et al.
Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids
J Immunol, 155 (1) (1995) 410-8
2. Miyabayashi, K., Maruyama, M., Yamada, T. et al.
Isoproterenol suppresses cytokine-induced RANTES secretion in human lung epithelial cells through the inhibition of c-jun N-terminal kinase pathway
Biochem Biophys Res Commun, 350 (3) (2006) 753-61
3. Takeda, N., Sumi, Y., Prefontaine, D. et al.
Epithelium-derived chemokines induce airway smooth muscle cell migration
Clin Exp Allergy, 39 (7) (2009) 1018-26
4. Yoon, J.S., Kim, H.H., Lee, Y. et al.
Cytokine induction by respiratory syncytial virus and adenovirus in bronchial epithelial cells
Pediatr Pulmonol, 42 (3) (2007) 277-82
5. Fabel, H.
Pneumologie, 2. Auflage
Urban & Schwarzenberg (1995)
6. Ehrhardt, C.
Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models
Springer Verlag (2008)
7. Junqueira, L.C.U.
Histologie, 6. Auflage
Springer Medizin Verlag Heidelberg (2005)
8. www.gesundheit.de/anatomie-lexikon/atemwegssystem/bronchien.shtml
Abrufdatum: 01/2010
9. Wissen Media Verlag GmbH
Gütersloh/München
10. Rennard, S.I., Rickard, K.A., Spurzem, J.R. et al.
Airways inflammation
Chest, 101 (3 Suppl) (1992) 30S-32S
11. Thompson, A.B., Robbins, R.A., Romberger, D.J. et al.
Immunological functions of the pulmonary epithelium
Eur Respir J, 8 (1) (1995) 127-49
12. Saloga, J.
Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis, 1. Auflage
Schattauer Verlag (2005)

13. Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I. et al.
Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes
Cancer Res, 48 (7) (1988) 1904-9
14. Reddel, R.R., Salghetti, S.E., Willey, J.C. et al.
Development of tumorigenicity in simian virus 40-immortalized human bronchial epithelial cell lines
Cancer Res, 53 (5) (1993) 985-91
15. Dingermann, T.
Pharmazeutische Biologie: molekulare Grundlagen und klinische Anwendung
Springer Medizin Verlag Heidelberg (2002)
16. Kaliner, M., Shelhamer, J.H., Borson, B. et al.
Human respiratory mucus
Am Rev Respir Dis, 134 (3) (1986) 612-21
17. Kaliner, M.A.
The airways: Neural control in health and disease
Informa Healthcare (1988)
18. Lucas, A.M., Douglas, L.C.
Principles underlying ciliary activity in the respiratory tract. A comparison of nasal clearance in man, monkey and other mammals.
Arch of Otolaryngology - Head & Neck Surgery, 20 (4) (1934) 518-541
19. Nadel, J.A., Widdicombe, J.H., Peatfield, A.C.
Regulation of airway secretion, ion transport and water movement
in A.P. Fishman (Hrsg.) *The Respiratory Society, Handbook of Physiology*
American Physiological Society, (1985) 419-445
20. Afzelius, B.A.
Cilia-related diseases
J Pathol, 204 (4) (2004) 470-7
21. Blouin, J.L., Meeks, M., Radhakrishna, U. et al.
Primary ciliary dyskinesia: a genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity
Eur J Hum Genet, 8 (2) (2000) 109-18
22. Fliegauf, M., Benzing, T., Omran, H.
When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies
Nat Rev Mol Cell Biol, 8 (11) (2007) 880-93
23. Ibanez-Tallon, I., Heintz, N., Omran, H.
To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease
Hum Mol Genet, 12 Spec No 1 (2003) R27-35
24. Hornef, N., Olbrich, H., Horvath, J. et al.
DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects
Am J Respir Crit Care Med, 174 (2) (2006) 120-6

25. Lee, L., Campagna, D.R., Pinkus, J.L. et al.
Primary ciliary dyskinesia in mice lacking the novel ciliary protein Pcdp1
Mol Cell Biol, 28 (3) (2008) 949-57
26. Schwabe, G.C., Hoffmann, K., Loges, N.T. et al.
Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations
Hum Mutat, 29 (2) (2008) 289-98
27. Zariwala, M.A., Knowles, M.R., Omran, H.
Genetic defects in ciliary structure and function
Annu Rev Physiol, 69 (2007) 423-50
28. Horvath, J., Fliegau, M., Olbrich, H. et al.
Identification and analysis of axonemal dynein light chain 1 in primary ciliary dyskinesia patients
Am J Respir Cell Mol Biol, 33 (1) (2005) 41-7
29. Livraghi, A., Randell, S.H.
Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance
Toxicol Pathol, 35 (1) (2007) 116-29
30. Rubin, B.K.
Mucus structure and properties in cystic fibrosis
Paediatr Respir Rev, 8 (1) (2007) 4-7
31. Donaldson, S.H., Boucher, R.C.
Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease
Curr Opin Pulm Med, 9 (6) (2003) 486-91
32. Speckmann, E.J.
Bau und Funktion des menschlichen Körpers, 20. Auflage
Urban & Fischer Verlag (2004)
33. Schiebler, T.H.
Anatomie, 10. Auflage
Steinkopff Verlag (2007)
34. Diedrich, K.
Gynäkologie und Geburtshilfe, 2. Auflage
Springer Verlag (2006)
35. Welsch, U.
Sobotta Lehrbuch Histologie, 2. Auflage
Urban & Fischer (2006)
36. Folkerts, G., Nijkamp, F.P.
Airway epithelium: more than just a barrier!
Trends Pharmacol Sci, 19 (8) (1998) 334-41
37. Romagnoli, M., Vachier, I., Tarodo de la Fuente, P. et al.
Eosinophilic inflammation in sputum of poorly controlled asthmatics
Eur Respir J, 20 (6) (2002) 1370-7

38. Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y. et al.
Eosinophilic inflammation in asthma
N Engl J Med, 323 (15) (1990) 1033-9
39. Kroegel, C., Virchow, J.C., Jr., Luttmann, W. et al.
Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I)
Eur Respir J, 7 (3) (1994) 519-43
40. Kroegel, C., Warner, J.A., Virchow, J.C., Jr. et al.
Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part II)
Eur Respir J, 7 (4) (1994) 743-60
41. Warner, J.A., Kroegel, C.
Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils
Eur Respir J, 7 (7) (1994) 1326-41
42. Kroegel, C.
Asthma bronchiale: Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie
Thieme Verlag (2002)
43. Hochstetter, R., Dobos, G., Kimmig, D. et al.
The CC chemokine receptor 3 CCR3 is functionally expressed on eosinophils but not on neutrophils
Eur J Immunol, 30 (10) (2000) 2759-64
44. Nagase, H., Miyamasu, M., Yamaguchi, M. et al.
Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils
Int Arch Allergy Immunol, 125 Suppl 1 (2001) 29-32
45. Teran, L.M., Noso, N., Carroll, M. et al.
Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways
J Immunol, 157 (4) (1996) 1806-12
46. Busse, W.W., Lemanske, R.F., Jr.
Asthma
N Engl J Med, 344 (5) (2001) 350-62
47. Ying, S., Taborda-Barata, L., Meng, Q. et al.
The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES in the skin of human atopic subjects: relationship to eosinophil, T cell, and macrophage recruitment
J Exp Med, 181 (6) (1995) 2153-9
48. Palmqvist, C., Wardlaw, A.J., Bradding, P.
Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma
Br J Pharmacol, 151 (6) (2007) 725-36

49. Humbert, M., Ying, S., Corrigan, C. et al.
Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3
Am J Respir Cell Mol Biol, 16 (1) (1997) 1-8
50. Rojas-Ramos, E., Avalos, A.F., Perez-Fernandez, L. et al.
Role of the chemokines RANTES, monocyte chemotactic proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma
Eur Respir J, 22 (2) (2003) 310-6
51. Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Rusznak, C. et al.
The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro
Pulm Pharmacol, 5 (4) (1992) 257-63
52. Zhang, L., Han, D., Sanderson, M.J.
Effect of isoproterenol on the regulation of rabbit airway ciliary beat frequency measured with high-speed digital and fluorescence microscopy
Ann Otol Rhinol Laryngol, 114 (5) (2005) 399-403
53. Ingels, K.J., Meeuwssen, F., Graamans, K. et al.
Influence of sympathetic and parasympathetic substances in clinical concentrations on human nasal ciliary beat
Rhinology, 30 (3) (1992) 149-59
54. Tamaoki, J., Chiyotani, A., Sakai, N. et al.
Stimulation of ciliary motility mediated by atypical beta-adrenoceptor in canine bronchial epithelium
Life Sci, 53 (20) (1993) 1509-15
55. Barnes, P.J., Basbaum, C.B.
Mapping of adrenergic receptors in the trachea by autoradiography
Exp Lung Res, 5 (3) (1983) 183-92
56. Carstairs, J.R., Nimmo, A.J., Barnes, P.J.
Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung
Am Rev Respir Dis, 132 (3) (1985) 541-7
57. Hallsworth, M.P., Twort, C.H., Lee, T.H. et al.
beta(2)-adrenoceptor agonists inhibit release of eosinophil-activating cytokines from human airway smooth muscle cells
Br J Pharmacol, 132 (3) (2001) 729-41
58. Hardman, J.G.
Goodman und Gilman Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie, 9. Auflage
McGraw-Hill Professional (1998)
59. Lopez-Vidriero, M.T., Jacobs, M., Clarke, S.W.
The effect of isoprenaline on the ciliary activity of an in vitro preparation of rat trachea
Eur J Pharmacol, 112 (3) (1985) 429-32

60. Dingermann, T., Loew, D.
Phytopharmakologie, 1. Aufl.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (2003)
61. Wichtl, M.H.
Teedrogen und Phytopharmaka, 4. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (2002)
62. Wichtl, M.H.
Teedrogen und Phytopharmaka, 5. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (2008)
63. *Martindale*, 35. Auflage
Pharmaceutical Press (2006)
64. *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 6.0*
65. Flora, K., Hahn, M., Rosen, H. et al.
Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease
Am J Gastroenterol, 93 (2) (1998) 139-43
66. Luper, S.
A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1
Altern Med Rev, 3 (6) (1998) 410-21
67. Shaker, E., Mahmoud, H., Mnaa, S.
Silymarin, the antioxidant component and Silybum marianum extracts prevent liver damage
Food Chem Toxicol, (2009)
68. Morishima, C., Shuhart, M.C., Wang, C.C. et al.
Silymarin Inhibits In Vitro T-Cell Proliferation and Cytokine Production in Hepatitis C Virus Infection
Gastroenterology, (2009)
69. Gharagozloo, M., Velardi, E., Bruscoli, S. et al.
Silymarin suppress CD4+ T cell activation and proliferation: Effects on NF-kappaB activity and IL-2 production
Pharmacol Res
70. Campos, R., Garrido, A., Guerra, R. et al.
Acetaminophen hepatotoxicity in rats is attenuated by silybin dihemisuccinate
Prog Clin Biol Res, 280 (1988) 375-8
71. Valenzuela, A., Garrido, A.
Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin
Biol Res, 27 (2) (1994) 105-12
72. Valenzuela, A., Lagos, C., Schmidt, K. et al.
Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat
Biochem Pharmacol, 34 (12) (1985) 2209-12

73. Campos, R., Garrido, A., Guerra, R. et al.
Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver
Planta Med, 55 (5) (1989) 417-9
74. Lah, J.J., Cui, W., Hu, K.Q.
Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines
World J Gastroenterol, 13 (40) (2007) 5299-305
75. Jung, H.J., Park, J.W., Lee, J.S. et al.
Silibinin inhibits expression of HIF-1alpha through suppression of protein translation in prostate cancer cells
Biochem Biophys Res Commun, 390 (1) (2009) 71-6
76. Wu, K.J., Zeng, J., Zhu, G.D. et al.
Silibinin inhibits prostate cancer invasion, motility and migration by suppressing vimentin and MMP-2 expression
Acta Pharmacol Sin, 30 (8) (2009) 1162-8
77. Lin, C.J., Sukarieh, R., Pelletier, J.
Silibinin inhibits translation initiation: implications for anticancer therapy
Mol Cancer Ther, 8 (6) (2009) 1606-12
78. Ralhan, R., Pandey, M.K., Aggarwal, B.B.
Nuclear factor-kappa B links carcinogenic and chemopreventive agents
Front Biosci (Schol Ed), 1 (2009) 45-60
79. Muriel, P.
NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy
J Appl Toxicol, 29 (2) (2009) 91-100
80. Matsuda, T., Ferreri, K., Todorov, I. et al.
Silymarin protects pancreatic beta-cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH2-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways
Endocrinology, 146 (1) (2005) 175-85
81. Boje, K., Lechtenberg, M., Nahrstedt, A.
New and known iridoid- and phenylethanoid glycosides from Harpagophytum procumbens and their in vitro inhibition of human leukocyte elastase
Planta Med, 69 (9) (2003) 820-5
82. Lanhers, M.C., Fleurentin, J., Mortier, F. et al.
Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of Harpagophytum procumbens
Planta Med, 58 (2) (1992) 117-23
83. Baghdikian, B., Lanhers, M.C., Fleurentin, J. et al.
An analytical study, anti-inflammatory and analgesic effects of Harpagophytum procumbens and Harpagophytum zeyheri
Planta Med, 63 (2) (1997) 171-6

84. Kaszkin, M., Beck, K.F., Koch, E. et al.
Downregulation of iNOS expression in rat mesangial cells by special extracts of Harpagophytum procumbens derives from harpagoside-dependent and independent effects
Phytomedicine, 11 (7-8) (2004) 585-95
85. Loew, D., Mollerfeld, J., Schrodter, A. et al.
Investigations on the pharmacokinetic properties of Harpagophytum extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis in vitro and ex vivo
Clin Pharmacol Ther, 69 (5) (2001) 356-64
86. Ahmed, B., Al-Rehaily, A.J., Al-Howiriny, T.A. et al.
Scropolioside-D2 and harpagoside-B: two new iridoid glycosides from Scrophularia deserti and their antidiabetic and antiinflammatory activity
Biol Pharm Bull, 26 (4) (2003) 462-7
87. van de Donk, H.J., Zuidema, J., Merkus, F.W.
Correlation between the sensitivity of the ciliary beat frequency of human adenoid tissue and chicken embryo tracheas for some drugs
Rhinology, 20 (2) (1982) 81-7
88. Mickenhagen, A., Siefer, O., Neugebauer, P. et al.
[The influence of different alpha-sympathomimetic drugs and benzalkoniumchlorid on the ciliary beat frequency of in vitro cultured human nasal mucosa cells]
Laryngorhinootologie, 87 (1) (2008) 30-8
89. Curtis, L.N., Carson, J.L.
Computer-assisted video measurement of inhibition of ciliary beat frequency of human nasal epithelium in vitro by xylometazoline
J Pharmacol Toxicol Methods, 28 (1) (1992) 1-7
90. Marquardt, H.
Lehrbuch der Toxikologie
Spektrum, akademischer Verlag, Heidelberg (1997)
91. Boek, W.M., Romeijn, S.G., Graamans, K. et al.
Validation of animal experiments on ciliary function in vitro. II. The influence of absorption enhancers, preservatives and physiologic saline
Acta Otolaryngol, 119 (1) (1999) 98-101
92. Joynson, J.A., Forbes, B., Lambert, R.J.
Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials
J Appl Microbiol, 93 (1) (2002) 96-107
93. Falbe, J.
Römpf-Chemie-Lexikon, 10. völlig überarb. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997)
94. Severina, II, Muntyan, M.S., Lewis, K. et al.
Transfer of cationic antibacterial agents berberine, palmatine, and benzalkonium through bimolecular planar phospholipid film and Staphylococcus aureus membrane
IUBMB Life, 52 (6) (2001) 321-4

95. Battaglia, F., Scambia, G., Distefano, M. et al.
[Quaternary ammonium salts in gynecology and obstetrics]
Minerva Ginecol, 52 (11) (2000) 471-84
96. Riechelmann, H., Deutsche, T., Stuhlmiller, A. et al.
Nasal toxicity of benzalkonium chloride
Am J Rhinol, 18 (5) (2004) 291-9
97. EuAB
Monographie "Thymian-Thymi herba"
Europäisches Arzneibuch 1997, NT 1999, Nr. 865
98. Monographie
Bundes-Anzeiger Nr. 122
vom 06.07.1988
99. Monographie
Kommission E
Bundes-Anzeiger, Nr. 122
100. Kalemba, D., Kunicka, A.
Antibacterial and antifungal properties of essential oils
Curr Med Chem, 10 (10) (2003) 813-29
101. Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. et al.
Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents
J Appl Bacteriol, 76 (6) (1994) 626-31
102. Begrow, F., Engelbertz, J., Feistel, B. et al.
Impact of Thymol in Thyme Extracts on Their Antispasmodic Action and Ciliary Clearance
Planta Med, (2009)
103. Wienkotter, N., Begrow, F., Kinzinger, U. et al.
The effect of thyme extract on beta2-receptors and mucociliary clearance
Planta Med, 73 (7) (2007) 629-35
104. Meister, A., Bernhardt, G., Christoffel, V. et al.
Antispasmodic activity of Thymus vulgaris extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects
Planta Med, 65 (6) (1999) 512-6
105. Engelbertz, J., Schwenk, T., Kinzinger, U. et al.
Thyme extract, but not thymol, inhibits endothelin-induced contractions of isolated rat trachea
Planta Med, 74 (12) (2008) 1436-40
106. Frohne, D.
Systematik des Pflanzenreichs, 5. Auflage
Deutscher Apotheker Verlag (1998)
107. Schilcher, H.
Leitfaden Phytotherapie, 3. Auflage
Urban & Fischer Verlag (2007)

108. Meister, R., Wittig, T., Beuscher, N. et al.
Efficacy and tolerability of myrtol standardized in long-term treatment of chronic bronchitis. A double-blind, placebo-controlled study. Study Group Investigators
Arzneimittelforschung, 49 (4) (1999) 351-8
109. Matthys, H., de Mey, C., Carls, C. et al.
Efficacy and tolerability of myrtol standardized in acute bronchitis. A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled parallel group clinical trial vs. cefuroxime and ambroxol
Arzneimittelforschung, 50 (8) (2000) 700-11
110. Behrbohm, H., Kaschke, O., Sydow, K.
[Effect of the phytogetic secretolytic drug Gelomyrtol forte on mucociliary clearance of the maxillary sinus]
Laryngorhinootologie, 74 (12) (1995) 733-7
111. Wenigmann, M.
Phytotherapie, 1. Aufl.
Urban & Fischer Verlag (1999)
112. Souness, J.E., Villamil, M.E., Scott, L.C. et al.
Possible role of cyclic AMP phosphodiesterases in the actions of ibudilast on eosinophil thromboxane generation and airways smooth muscle tone
Br J Pharmacol, 111 (4) (1994) 1081-8
113. Kawasaki, A., Hoshino, K., Osaki, R. et al.
Effect of ibudilast: a novel antiasthmatic agent, on airway hypersensitivity in bronchial asthma
J Asthma, 29 (4) (1992) 245-52
114. Kishi, Y., Ohta, S., Kasuya, N. et al.
Ibudilast: a non-selective PDE inhibitor with multiple actions on blood cells and the vascular wall
Cardiovasc Drug Rev, 19 (3) (2001) 215-25
115. Huang, Z., Liu, S., Zhang, L. et al.
Preferential inhibition of human phosphodiesterase 4 by ibudilast
Life Sci, 78 (23) (2006) 2663-8
116. Ganbo, T., Hisamatsu, K., Mizukoshi, A. et al.
Effect of ibudilast on ciliary activity of human paranasal sinus mucosa in vitro
Arzneimittelforschung, 45 (8) (1995) 883-6
117. Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T. et al.
Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists
Pharmacol Rev, 45 (2) (1993) 205-51
118. www.fachinfo.de
Losartan
Abrufdatum: 01/2010
119. Laudanno, O.M., Cesolari, J.A.
[Angiotensin II AT1 receptor antagonists as antiinflammatory and gastric protection drugs]
Acta Gastroenterol Latinoam, 36 (2) (2006) 76-80

120. Feldman, D.
Vitamin D - Band 1, 2. Auflage
Academic Pr Inc (2004)
121. Blaney, G.P., Albert, P.J., Proal, A.D.
Vitamin D metabolites as clinical markers in autoimmune and chronic disease
Ann N Y Acad Sci, 1173 (2009) 384-90
122. Holick, M.F.
Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits
Clin J Am Soc Nephrol, 3 (5) (2008) 1548-54
123. Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P. et al.
Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review
J Neuroimmunol, 194 (1-2) (2008) 7-17
124. Newton-Bishop, J.A., Beswick, S., Randerson-Moor, J. et al.
Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels are associated with breslow thickness at presentation and survival from melanoma
J Clin Oncol, 27 (32) (2009) 5439-44
125. Wietrzyk, J., Filip, B., Milczarek, M. et al.
The influence of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 1,24-dihydroxyvitamin D3 on alphavbeta3 integrin expression in cancer cell lines
Oncol Rep, 20 (4) (2008) 941-52
126. Jeffery, L.E., Burke, F., Mura, M. et al.
1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3
J Immunol, 183 (9) (2009) 5458-67
127. Riachy, R., Vandewalle, B., Kerr Conte, J. et al.
1,25-dihydroxyvitamin D3 protects RINm5F and human islet cells against cytokine-induced apoptosis: implication of the antiapoptotic protein A20
Endocrinology, 143 (12) (2002) 4809-19
128. Riachy, R., Vandewalle, B., Moerman, E. et al.
1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects human pancreatic islets against cytokine-induced apoptosis via down-regulation of the Fas receptor
Apoptosis, 11 (2) (2006) 151-9
129. Fachinformation
Aspecton® DS Hustentropfen
Stand 2005
130. Vent, J., Wyatt, T.A., Smith, D.D. et al.
Direct involvement of the isotype-specific C-terminus of beta tubulin in ciliary beating
J Cell Sci, 118 (Pt 19) (2005) 4333-41
131. King, S.M.
The dynein microtubule motor
Biochim Biophys Acta, 1496 (1) (2000) 60-75

132. King, S.M.
AAA domains and organization of the dynein motor unit
J Cell Sci, 113 (Pt 14) (2000) 2521-6
133. Gibbons, I.R., Rowe, A.J.
Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia
Science, 149 (3682) (1965) 424-426
134. Satir, P., Barkalow, K., Hamasaki, T.
The control of ciliary beat frequency
Trends Cell Biol, 3 (11) (1993) 409-12
135. Hamasaki, T., Barkalow, K., Satir, P.
Regulation of ciliary beat frequency by a dynein light chain
Cell Motil Cytoskeleton, 32 (2) (1995) 121-4
136. Sisson, J.H., Pavlik, J.A., Wyatt, T.A.
Alcohol stimulates ciliary motility of isolated airway axonemes through a nitric oxide, cyclase, and cyclic nucleotide-dependent kinase mechanism
Alcohol Clin Exp Res, 33 (4) (2009) 610-6
137. Hastie, A.T., Dicker, D.T., Hingley, S.T. et al.
Isolation of cilia from porcine tracheal epithelium and extraction of dynein arms
Cell Motil Cytoskeleton, 6 (1) (1986) 25-34
138. Wyatt, T.A., Forget, M.A., Adams, J.M. et al.
Both cAMP and cGMP are required for maximal ciliary beat stimulation in a cell-free model of bovine ciliary axonemes
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 288 (3) (2005) L546-51
139. Kinnula, V.L., Yankaskas, J.R., Chang, L. et al.
Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro
Am J Respir Cell Mol Biol, 11 (5) (1994) 568-76
140. Papadopoulos, T., Ionescu, L., Dammrich, J. et al.
Type I and type IV collagen promote adherence and spreading of human type II pneumocytes in vitro
Lab Invest, 62 (5) (1990) 562-9
141. Shoji, S., Rickard, K.A., Ertl, R.F. et al.
Bronchial epithelial cells produce lung fibroblast chemotactic factor: fibronectin
Am J Respir Cell Mol Biol, 1 (1) (1989) 13-20
142. Horowitz, E., Zhang, Z., Jones, B.H. et al.
Patterns of expression of sperm flagellar genes: early expression of genes encoding axonemal proteins during the spermatogenic cycle and shared features of promoters of genes encoding central apparatus proteins
Mol Hum Reprod, 11 (4) (2005) 307-17
143. Gomperts, B.N., Kim, L.J., Flaherty, S.A. et al.
IL-13 regulates cilia loss and foxj1 expression in human airway epithelium
Am J Respir Cell Mol Biol, 37 (3) (2007) 339-46

144. Neugebauer, P., Endepols, H., Mickenhagen, A. et al.
Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells
Eur Arch Otorhinolaryngol, 260 (6) (2003) 325-30
145. Mercke, U., Hakansson, C.H., Toremalm, N.G.
The influence of temperature on mucociliary activity. Temperature range 20 degrees C-40 degrees C
Acta Otolaryngol, 78 (5-6) (1974) 444-50
146. Sisson, J.H., Tuma, D.J., Rennard, S.I.
Acetaldehyde-mediated cilia dysfunction in bovine bronchial epithelial cells
Am J Physiol, 260 (2 Pt 1) (1991) L29-36
147. Forget, M.A., Sisson, J.H., Spurzem, J.R. et al.
Ethanol increases phosphodiesterase 4 activity in bovine bronchial epithelial cells
Alcohol, 31 (1-2) (2003) 31-8
148. Wyatt, T.A., Forget, M.A., Sisson, J.H.
Ethanol stimulates ciliary beating by dual cyclic nucleotide kinase activation in bovine bronchial epithelial cells
Am J Pathol, 163 (3) (2003) 1157-66
149. Stennert, E., Siefer, O., Zheng, M. et al.
In vitro culturing of porcine tracheal mucosa as an ideal model for investigating the influence of drugs on human respiratory mucosa
Eur Arch Otorhinolaryngol, 265 (9) (2008) 1075-81
150. Siegfried, J.M., Nesnow, S.
Cytotoxicity of chemical carcinogens towards human bronchial epithelial cells evaluated in a clonal assay
Carcinogenesis, 5 (10) (1984) 1317-22
151. Kitamura, H., Shibagaki, T., Inayama, Y. et al.
Growth and differentiation of human distal airway epithelial cells in culture. Effects of small amounts of serum in defined medium
Lab Invest, 63 (3) (1990) 420-8
152. Kondo, M., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H.
Simple technique for culture of highly differentiated cells from dog tracheal epithelium
Am J Physiol, 261 (2 Pt 1) (1991) L106-17
153. Stock, T.
Kultur normaler humaner Bronchialepithelzellen und ihre toxikologische Anwendungsprüfung
Dissertation (2002)
154. Wang, J.H., Devalia, J.L., Sapsford, R.J. et al.
Effect of corticosteroids on release of RANTES and sICAM-1 from cultured human bronchial epithelial cells, induced by TNF-alpha
Eur Respir J, 10 (4) (1997) 834-40
155. Meyer, J.E., Berner, I., Teran, L.M. et al.
RANTES production by cytokine-stimulated nasal fibroblasts: its inhibition by glucocorticoids
Int Arch Allergy Immunol, 117 (1) (1998) 60-7

156. Wingett, D., Forcier, K., Nielson, C.P.
Glucocorticoid-mediated inhibition of RANTES expression in human T lymphocytes
FEBS Lett, 398 (2-3) (1996) 308-11
157. Platz, J.
Modifikation der Genexpression respiratorischen Epithels mittels Oligonukleotiden zur Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege
Dissertation (2004)
158. Endres, M.
Entwicklung eines bioartifiziellen Trachealersatzes: Charakterisierung humaner respiratorischer Epithelzellen in Expansions- und Differenzierungskulturen
Dissertation (2005)
159. Lüllmann-Rausch, R.
Taschenlehrbuch Histologie
2. Auflage (2006)
160. Boek, W.M., Romeijn, S.G., Graamans, K. et al.
Validation of animal experiments on ciliary function in vitro. I. The influence of substances used clinically
Acta Otolaryngol, 119 (1) (1999) 93-7
161. Klocker, N., Verse, T., Rudolph, P.
[The protective effect of dexpanthenol in nasal sprays. First results of cytotoxic and ciliary-toxic studies in vitro]
Laryngorhinootologie, 82 (3) (2003) 177-82
162. Verdugo, P., Johnson, N.T., Tam, P.Y.
beta-Adrenergic stimulation of respiratory ciliary activity
J Appl Physiol, 48 (5) (1980) 868-71
163. Kanthakumar, K., Cundell, D.R., Johnson, M. et al.
Effect of salmeterol on human nasal epithelial cell ciliary beating: inhibition of the ciliotoxin, pyocyanin
Br J Pharmacol, 112 (2) (1994) 493-8
164. Frohock, J.I., Wijkstrom-Frei, C., Salathe, M.
Effects of albuterol enantiomers on ciliary beat frequency in ovine tracheal epithelial cells
J Appl Physiol, 92 (6) (2002) 2396-402
165. Hofmann, T., Gugatschga, M., Koidl, B. et al.
Influence of preservatives and topical steroids on ciliary beat frequency in vitro
Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 130 (4) (2004) 440-5
166. Hofmann, T., Wolf, G., Koidl, B.
[In vitro studies of the effect of vasoconstrictor nose drops on ciliary epithelium of human nasal mucosa]
Laryngorhinootologie, 74 (9) (1995) 564-7

167. Berg, O.H., Lie, K., Steinsvag, S.K.
The effects of topical nasal steroids on rat respiratory mucosa in vivo, with special reference to benzalkonium chloride
Allergy, 52 (6) (1997) 627-32
168. Han, D., Wang, N., Zhang, L.
The effect of myrtol standardized on human nasal ciliary beat frequency and mucociliary transport time
Am J Rhinol Allergy, 23 (6) (2009) 610-4
169. Puchelle, E., Peault, B.
Human airway xenograft models of epithelial cell regeneration
Respir Res, 1 (3) (2000) 125-8
170. Kessel, R.G., Kardon, R.H.
Tissues and organs: a text-atlas of scanning electron microscopy
W.H. Freeman & Co Ltd. (1979)
171. Fujisawa, T., Kato, Y., Atsuta, J. et al.
Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by TH2- and TH1-derived cytokines
J Allergy Clin Immunol, 105 (1 Pt 1) (2000) 126-33
172. Jaeschke, A.
Der Einfluss von Histamin auf die Zytokin- und Chemokinproduktion bei humanen Bronchialepithelzellen
Dissertation (2007)
173. Wang, J.H., Devalia, J.L., Xia, C. et al.
Expression of RANTES by human bronchial epithelial cells in vitro and in vivo and the effect of corticosteroids
Am J Respir Cell Mol Biol, 14 (1) (1996) 27-35
174. Boek, W.M., Graamans, K., Natzijl, H. et al.
Nasal mucociliary transport: new evidence for a key role of ciliary beat frequency
Laryngoscope, 112 (3) (2002) 570-3
175. Porkert, U.A.
Zyto- und genotoxische Wirkung von Benzalkoniumchlorid in vitro und in vivo
Dissertation (2006)
176. Disse, B.G., Ziegler, H.W.
Pharmacodynamic mechanism and therapeutic activity of ambroxol in animal experiments
Respiration, 51 Suppl 1 (1987) 15-22
177. Wittig, T.
Myrtol standardisiert: Eine klinische Dokumentation, 4. Auflage
Ergebnisse Verlag (2005)
178. Jelinek, A.
In-vitro-Toxizität grenzflächenaktiver Substanzen: Wirkung auf Zellmembran, mitochondriale Funktion und Apoptose
Dissertation (2001)

Danke!

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem „Doktorvater“ Herrn Prof. Dr. Eugen J. Verspohl bedanken. Zum einen für die Überlassung dieses Themas, das mich immer wieder vor neue Herausforderungen gestellt hat und vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Zum anderen aber auch für Deine Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Die drei Jahre bei Dir haben mich positiv beeinflusst. Danke Eugen!

Auch meinem Arbeitskreis gilt ein sehr großer Dank für eine wirklich schöne Zeit! Durch Euch habe ich selbst in schwierigeren und mühsamen Zeiten die Freude an der Arbeit nie verloren. Ich danke Euch für Eure Unterstützung, Eure Freundschaft und für die unzähligen lustigen, feucht fröhlichen und unterhaltsamen Stunden!

Herrn Prof. Dr. Schmidt danke ich für seine Mühe als Zweitgutachter dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie und Analytik von Herrn Prof. Dr. Reichelt aus dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik, besonders Frau Rasch und Frau Malkus möchte ich recht herzlich danken. Für die immer nette und vor allem schnelle Erledigung der mikroskopischen Aufnahmen gilt Ihnen mein besonderer Dank!

Dem Schlachthof der Familie Wilczek in Lippetal-Herzfeld danke ich für die freundliche Überlassung der zahlreichen Schweinetracheen.

Herrn Dr. Stremmel von der Firma Nikon danke ich für die sehr hilfsbereite und oft sehr schnelle und spontane Leihgabe diverser mikroskopischer Zubehörartikel.

Bei meinen Wahlpflichtfachstudenten Anna Pieper, Kristina Laege und Carolin Elixmann möchte ich mich ganz herzlich für ihren persönlichen Einsatz und ihre Sicht der Dinge aus einer anderen Perspektive bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Nur durch Eure unermüdliche Unterstützung und Euren Rückhalt von Anfang an, war diese Arbeit überhaupt erst möglich. Ihr habt mich immer in allen Lebensbereichen unterstützt und habt so einen sehr großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. Vielen Dank für Alles, Ihr seid die Besten!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund Sebastian bedanken. Du warst die Zeit über immer am nächsten dran. Die Erfolge, genauso wie die vielen kleinen Rückschritte, hast Du am deutlichsten zu spüren bekommen. Dass Du trotzdem immer zu mir gestanden und mich gerade in den schwierigeren Zeiten ertragen und unterstützt hast, dafür verdienst Du meinen größten Dank und Respekt!

