

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von Typ II Pneumozyten aus Lungen adulter Schlachtrinder und die Entwicklung eines Kultursystems, in dem der Differenzierungsgrad der Zellen erhalten bleibt. Da die Ergebnisse der von AUGUSTIN (1987) entwickelten Isolierungsmethode für bovine Typ II Pneumozyten in den eigenen Untersuchungen nicht in vollem Umfang reproduziert werden konnten, wurde die Methode wie folgt modifiziert:

1. Durch Veränderungen der Temperatur aller verwendeten Lösungen auf durchgehend 37°C wird die Lebensfähigkeit der isolierten Zellen von etwa 60 % auf 91,3 % verbessert.
2. Die umfangreichen Verklebungen bei pelletierten Zellen der isolierten Rohzellsuspension, die zu hohen Zellverlusten führten, können durch den Zusatz von DNase in ihrer Entstehung gehindert und vollkommen aufgelöst werden.
3. Die Anreicherung der Typ II Pneumozyten über einen diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten wird durch einen weiteren Schritt, das 'Panning', bei dem Makrophagen und Leukozyten durch einen immunologischen Vorgang aus der Zellsuspension entfernt werden, von  $60,5 \pm 5\%$  auf  $70,3 \pm 5\%$  erhöht.

Zur Charakterisierung der frisch isolierten Typ II Pneumozyten anhand der Darstellung ihrer typischen Lamellarkörperchen eignet sich eine mod. Papanicolaou-Färbung, während bei kultivierten Typ II Pneumozyten am vorteilhaftesten eine Tannin-Polychrom-Färbung verwendet werden kann. Der Fluoreszenzfarbstoff Phosphin 3R dagegen ist zur Charakterisierung der Typ II Pneumozyten ungeeignet, da Makrophagen und Fibroblasten, die der Typ II Pneumozytensuspension beigemischt sein können, zu einem hohen Prozentsatz ebenfalls fluoreszierende Granula aufweisen.

Die in den entwickelten Kultursystemen zur Beschichtung der Kulturflächen eingesetzten extrazellulären Matrixsubstanzen, Kollagen Typ I und Laminin sowie das komplexe Substanzgemisch EHS-Matrigel, haben einen erheblichen Einfluß auf den Differenzierungsgrad der kultivierten Typ II Pneumozyten.

Bei Verwendung von EHS-Matrigel in der Kultur behalten die Zellen ihre Differenzierung für maximal 6 Tage ( kubische Gestalt, hoher Lamellarkörperchengehalt und stark positive alkalische Phosphatasereaktion). Sie ordnen sich dabei vermehrt zu alveolarähnlichen Strukturen und vermehren sich nicht. Dieses Kultursystem bietet die

Möglichkeit, Kurzzeituntersuchungen an weitgehend differenzierten Typ II Pneumozyten durchzuführen.

Dagegen zeigen die zur Kontrolle auf Glas oder Plastik kultivierten Zellen schon nach 3 Tagen starke Entdifferenzierungserscheinungen (Spreiten des Zytoplasmas, Bildung von Intermediärfilamenten, Verlust der Lamellarkörperchen und der alkalischen Phosphatase-Aktivität). Diese Entwicklung tritt auf kollagen- und lamininbeschichteten Kulturflächen weniger ausgeprägt und bei Lamininbeschichtung außerdem um 2 Tage verzögert auf.

Die beschriebenen morphologischen und histochemischen Entdifferenzierungserscheinungen sprechen für die Entwicklung eines Zelltyps, der sich dem Phänotyp des Typ I Pneumozyten annähert. Auch der Verlust des Bindungsvermögens für das Lektin *Maclura pomifera* (spez. für Typ II Pneumozyten), nicht aber für das Lektin *Ricinus communis* (spez. für Typ I Pneumozyten), belegen diese Entwicklung. Möglicherweise stellen diese Zellen einen nach Alveolarschädigung auftretenden 'Intermediärtyp' dar, der noch einige Charakteristika der Typ II Pneumozyten aufweist, sich aber zum Typ I Pneumozyten umdifferenzieren kann.

Einige dieser Zellen gewinnen dabei die Fähigkeit zur Proliferation zurück. Die in den entstehenden Proliferationsnestern auftretenden polygonalen, epithelialen Zellen, die kleine Lamellarkörperchen und eine Zunahme der alkalische Phosphatase zeigen, werden als unter in vitro-Bedingungen teilweise ausdifferenzierte Typ II Pneumozyten bewertet. Die zuletzt genannten Kultursysteme bieten sich als in vitro-Modell für die Untersuchung der Regenerations- und Reparationsabläufe im Alveolarbereich an.

## 6 Summary

Bettina Kränzlin:

Influence of different culture methods upon the differentiated stage of bovine type II pneumocytes.

The objective of this investigation was to isolate type II pneumocytes from bovine lungs (from slaughtered adult cattle) and to develop a culture system, in which the differentiated stage of type II pneumocytes can be well preserved.

Because the isolation of type II pneumocytes could not be reproduced to the same extent as showed by AUGUSTIN (1987), the following modifications proved to be necessary. 1. The temperature of working solutions was raised to 37°C, improving the viability of the isolated cells from approximately 60% up to 91,3%.

2. The extensive cell clumping of pelleted cells, which causes high cell loss was prevented and the clumps were broken up into individual cells by the addition of DNase.

3. The isolation of type II pneumocytes by centrifugation over a discontinuous Percoll-density gradient was improved by the addition of an immunological method, the 'panning', by which macrophages and leukocytes adhere to IgG-coated culture dishes. The cell yield can be raised from  $60,5 \pm 5\%$  up to  $70,3 \pm 5\%$ .

Freshly isolated cells can be identified by their typical lamellar inclusions with a modified Papanicolaou stain, while cultured type II pneumocytes may be stained clearly with a tannic acid and polychrome stain. The fluorescent dye phosphine 3R on the other hand is unsuitable for characterising type II pneumocytes, because macrophages and fibroblasts, which may contaminate the cell suspension, also contain fluorescent granules in a high percentage.

The different components of extracellular matrix, such as collagen type I, laminin and the complex mixture EHS-matrigel, which were used in the developed culture systems, appeared to have an important influence on the expression of the differentiated stage of type II pneumocytes.

When cultured on EHS-matrigel type II pneumocytes maintain their differentiated morphological characteristics for up to 6 days (cuboidal shape, high lamellar body content, high alkaline phosphatase). They form spherical, alveolar-like clusters and do not proliferate. This culture system offers a possibility for short-term investigations with type II pneumocytes, which are largely differentiated.

In contrast to the effects of EHS-matrices, type II pneumocytes cultured on plastic surfaces show typical signs of a dedifferentiated appearance (spreading and flattening, loss of lamellar bodies and alkaline phosphatase, formation of intermediate filaments). This marked dedifferentiation is less severe on collagen and laminin coated plates and is retarded for 2 days on laminin coated plates.

The above mentioned morphological and histochemical dedifferentiation indicates the development of a cell type, which is in the process of converting to a phenotype, similar to type I pneumocytes. The loss of ability of binding the lectin *Maclura pomifera* (specific for type II pneumocytes), while the binding of the lectin *Ricinus communis* (specific for type I pneumocytes) remains, may prove this change in phenotype. The new cells possibly represent an intermediate cell type, which occurs during alveolar remodeling after alveolar injury. These cells represent some characteristics of type II pneumocytes but may change to type I pneumocytes.

Some of the cells regain the ability to proliferate. Nests of polygonal, epithelial cells, occur containing small lamellar inclusions and showing an increase in alkaline phosphatase, and these cells are assumed to be type II pneumocytes, which take on a partly differentiated appearance under in vitro conditions. The last two culture systems offer a culture model to investigate the proceedings during regeneration and reparation in the alveolar region.