

## Deckblatt des Abschlussberichts

Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen  
Geschäftsführung  
Naumannstr. 8  
01309 Dresden

**Projekt: 02/23**

**Laufzeit: 01.11.2023 – 31.10.2025**

**Thema: Was macht die Beatmung Frühgeborener so kritisch? - Physiologie und Physik der unreifen Lunge unter Druck.**

**Kurzbezeichnung: Physiologie und Physik der unreifen Lunge unter Druck.**

Projektleiterinnen:

Name, Vorname:	Prof. <sup>in</sup> Dr. rer. nat. Mareike Zink
Dienstbezeichnung/Funktion:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/ außerplanmäßige Professorin, Projektleiterin
Hochschule:	Universität Leipzig
Telefon:	0341/9732573
Email:	zink@physik.uni-leipzig.de
Name, Vorname:	Priv.-Doz. Dr. <sup>in</sup> rer. nat. Laube, Mandy
Dienstbezeichnung/Funktion:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Projektleiterin
Hochschule:	Universität Leipzig
Telefon:	0341/9720988
Email:	mandy.laube@medizin.uni-leipzig.de

Die Beantragung erfolgte durch den Direktor der Klinik/des Instituts:

Name, Vorname:	Prof. Dr. Frank Cichos
Dienstbezeichnung/Funktion:	Professor, stellvertretender Institutsdirektor Peter-Debye-Institut für die Physik der weichen Materie, Fakultät für Physik und Geowissenschaften
Hochschule:	Universität Leipzig

Das Forschungsprojekt wird durch die nachstehende wissenschaftliche Einrichtung und deren Vertreter unterstützt:

Name, Vorname:	Prof. Dr. Grundmann, Marius
Dienstbezeichnung/Funktion:	Dekan, Fakultät für Physik und Geowissenschaften
Hochschule:	Universität Leipzig

# Abschlussbericht zum Projekt „Physiologie und Physik der unreifen Lunge unter Druck“

## Hintergrund und Zielsetzung des Projekts

In Deutschland kommen ~10% aller Neugeborenen zu früh zur Welt, mit stetig steigender Inzidenz. **Frühgeborene** stellen damit eine der größten Patientengruppen dar. Die hohe Morbidität- und Mortalität dieser Frühgeborenen wird maßgeblich durch **pulmonale Komplikationen** bestimmt, wobei das Atemnotsyndrom die häufigste Todesursache darstellt. Viele Frühgeborene sind unmittelbar nach der Geburt auf eine **maschinelle Beatmung** (*mechanical ventilation*, **MV**) als lebensrettende Therapie angewiesen. Insbesondere bei sehr unreifen Frühgeborenen kann eine prolongierte MV jedoch schwerwiegende Folgen haben und zur Entwicklung **chronischer Lungenerkrankungen**, wie der Bronchopulmonalen Dysplasie, führen.

Im Gegensatz zur physiologischen Zwerchfellatmung, bei der ein Unterdruck erzeugt wird, basiert die MV auf der Applikation eines positiven hydrostatischen Drucks ( $p^{(+)}$ ) in der Lunge. Warum dieser Überdruck das Lungengewebe und seine Zellen schädigen kann, ist bislang nur unzureichend verstanden. Bisherige Studien adressierten vor allem biomedizinische Aspekte des adulten Lungengewebes und liefern nur begrenzt Erkenntnisse für die vulnerable fetale Lunge.

Das vorliegende interdisziplinäre Forschungsprojekt untersucht daher gezielt den **Einfluss von  $p^{(+)}$ , wie er bei der MV auftritt**, auf die Funktion, Viabilität und Regenerationsfähigkeit **fetaler Alveolarepithelzellen**. Zudem wird analysiert, ob der positive Luftdruck physikalische Zelleigenschaften wie die Zellbewegung verändert und dadurch regenerative Mechanismen, insbesondere die Migration von Epithelzellen zum Erhalt der epithelialen Integrität, beeinträchtigt werden. Mithilfe einer eigens entwickelten Druckkammer werden primäre fetale distale Lungenepithelzellen kontrolliert einem Überdruck ausgesetzt, um zelluläre Schädigungsmechanismen systematisch zu untersuchen.

Im Fokus der Untersuchungen stehen dabei die alveolare epitheliale Ionenkanalaktivität, sowie die Epithel- und Membranintegrität. Ergänzend wird die Fähigkeit zur Regeneration analysiert, um zu klären, inwieweit druckinduzierte Schäden reversibel sind oder zu irreversiblen Veränderungen der Zelleigenschaften führen. Die Charakterisierung der zellulären Schädigung erfolgt mittels elektrophysiologischer und biochemischer Analysen. Ziel dieses interdisziplinären Projekts, das Expertise aus Medizin, Zellbiologie, Physik und Materialwissenschaften vereint, war und ist es, die zugrunde liegenden Prozesse der beatmungsinduzierten Schädigung der unreifen Lunge besser zu verstehen und langfristig die Entwicklung optimierter Therapieansätze für frühgeborene Kinder zu ermöglichen.

## 1. Entwicklung des experimentellen Setups

Um den Einfluss eines positiven hydrostatischen Drucks auf die Alveolarzellen zu untersuchen wurde zunächst eine neuartige Mess- und Kultivierungskammer entwickelt und experimentell validiert. Dieses System ermöglicht die gleichzeitige Kultivierung von primären fetalen distalen Lungenepithelzellen (FDLE-Zellen) aus Ratten auf parallel geschalteten Zellkulturträgern unter definierten Druckbedingungen. Dabei werden die Zellen einem stabilen transepithelialen Druckgradienten ausgesetzt, der auf der apikalen Seite erhöhten hydrostatischen Druck und auf der basolateralen Seite Atmosphärendruck erzeugt. In diesem Setup ist eine

kontinuierliche Druckexposition über mehrere Stunden bis Tage möglich, wodurch sowohl akute als auch längerfristige Effekte auf die Zellfunktion untersucht werden konnten (Abb. 1). Ergänzend wurde eine zweite Druckkammer entwickelt, die eine homogene hydrostatische Druckerhöhung ohne Ausbildung eines Druckgradienten erlaubt (Abb. 2). Dadurch wurde es möglich, die Effekte eines reinen absoluten Druckanstiegs von denen eines transepithelialen Druckgradienten experimentell zu trennen. Beide Kammer-Systeme erlauben zudem eine kontrollierte Applikation der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen, sodass zusätzlich hyperoxische Bedingungen simuliert und dessen Einfluss auf den  $\text{Na}^+$ -Transport und die Zellviabilität untersucht werden konnten. Dieses methodische Setup bildet die Grundlage für die nachfolgenden funktionellen und zellbiologischen Analysen.



**Abb. 1:** Der Druckstopfen (links) dient zur Erzeugung eines definierten Druckgradienten bei der Kultivierung von FDLE-Zellmonolayern in 6-Well-Platten (rechts), die anschließend in der Ussing-Kammer analysiert werden. Dabei wird auf der apikalen Seite des Zellmonolayers ein erhöhter hydrostatischer Druck eingestellt, während die basolaterale Seite weiterhin dem Atmosphärendruck ausgesetzt ist. Auf diese Weise lassen sich die Auswirkungen eines gerichteten Druckunterschieds auf die epithelialen Transporteigenschaften gezielt untersuchen.



**Abb. 2:** Der Drucktopf dient zur Kultivierung von FDLE-Zellmonolayern unter gleichmäßigem, homogenem Luftdruck. Die 6-Well-Platten mit den Zellen werden in den Drucktopf eingesetzt, der sich während der gesamten Inkubationszeit im Zellkulturinkubator befindet. Über ein eigens entwickeltes Schlauchsystem kann der hydrostatische Druck im Inneren des Topfes präzise eingestellt und konstant gehalten werden, sodass die Zellen definierten Druckbedingungen ohne Ausbildung eines Druckgradienten ausgesetzt sind.

In einem zweiten, von uns entwickelten experimentellen Setup wurden FDLE-Zellen auf vergrößerten Zellkultureinsätzen kultiviert, um die pro Experiment verfügbare Zellzahl deutlich zu erhöhen (Abb. 3). Dieses System ermöglichte es, neben funktionellen Messungen auch zellbiochemische Analysen mit ausreichender Materialmenge durchzuführen. Ziel dieses Versuchsansatzes war es, zu untersuchen, inwieweit ein transepithelialer Druckgradient, wie zuvor beschrieben, die Viabilität der fetalen Alveolarepithelzellen beeinflusst und ob diese Veränderungen mit einer Beeinträchtigung der Membranintegrität der FDLE-Zellen

einhergehen. Durch die vergrößerte Zelloberfläche konnten druckinduzierte Effekte auf Zellschädigung und Viabilität zuverlässiger erfasst und miteinander korreliert werden.



**Abb. 3:** ThinCert-Kultureinsätze in einer 6-Well-Platte mit selbst entwickelten Druck-Gradienten-Stopfen (links). Verbindung der Stopfen über ein Schlauchsystem mit einem wassergefüllten U-Rohr als Sperrflüssigkeit (Mitte). Ansteuerung des hydrostatischen Drucks über eine angeschlossene Gasflasche mit Druckminderer. Die Erhöhung des Drucks auf einer Seite des U-Rohrs erzeugt eine definierte Druckdifferenz, die über das Schlauchsystem auf die apikale Seite des Zellmonolayers übertragen wird.

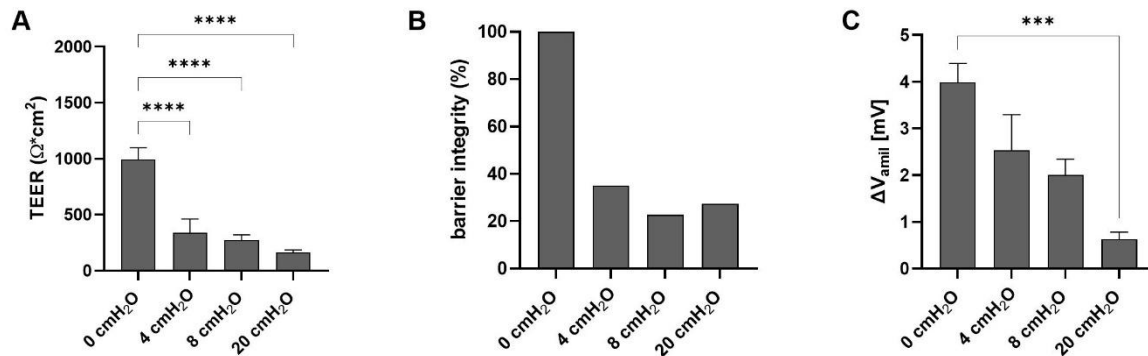
## 2. Darstellung druckinduzierter pathologischer Einflüsse

Zunächst wurde der Einfluss positiven hydrostatischen Drucks auf den epithelialen  $\text{Na}^+$ -Transport sowie die  $\text{Na}^+$ -Kanalfunktion an der apikalen Oberfläche alveolarer Epithelzellen untersucht. Da der transepitheliale  $\text{Na}^+$ -Transport eine zentrale Rolle bei der Flüssigkeitsresorption in den Alveolen spielt, kommt ihm insbesondere für die postnatale Lungenadaptation eine zentrale physiologische Bedeutung zu. Ergänzend wurde der Zusammenhang zwischen hydrostatischem Druck, Epithelintegrität und Zellviabilität fetaler Alveolarepithelzellen analysiert, um druckinduzierte funktionelle Veränderungen in einen zellbiologischen Kontext einzuordnen.

Während der Druckapplikation wurden die FDLE-Zellen unter *Air-Liquid-Interface* (ALI-) Bedingungen kultiviert, das heißt, der Zellmonolayer war an der Oberseite (apikal) der Luft ausgesetzt, während die Unterseite (basolateral) weiterhin über ein Nährmedium versorgt wurde. Diese Kultivierungsform ahmt die natürliche Situation in den Alveolen der Lunge nach, bei der das Epithel auf der einen Seite mit Luft und auf der anderen Seite mit Flüssigkeit in Kontakt steht. Nach der Kultivierung der FDLE-Zellen unter transepithelialen Druckgradienten beziehungsweise unter homogenem Luftdruck wurden die Zellmonolayer funktionell in der Ussing-Kammer untersucht.

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER, *transepithelial electrical resistance*) als Maß für die Integrität der epithelialen Barriere zeigte bereits nach einstündiger Druckexposition eine signifikante Abnahme. Druckgradienten von 4  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 8  $\text{cmH}_2\text{O}$  und 20  $\text{cmH}_2\text{O}$ , bei 21%  $\text{O}_2$ , führten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollepithelien bei 0  $\text{cmH}_2\text{O}$  zu einer Reduktion des TEER um mehr als 60% (Abb. 4A). Entsprechend war die strukturelle Integrität des Epithelmonolayers, definiert als  $\text{TEER} > 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , nach Druckapplikation nur noch bei etwa 30% der Monolayer erhalten (Abb. 4B).

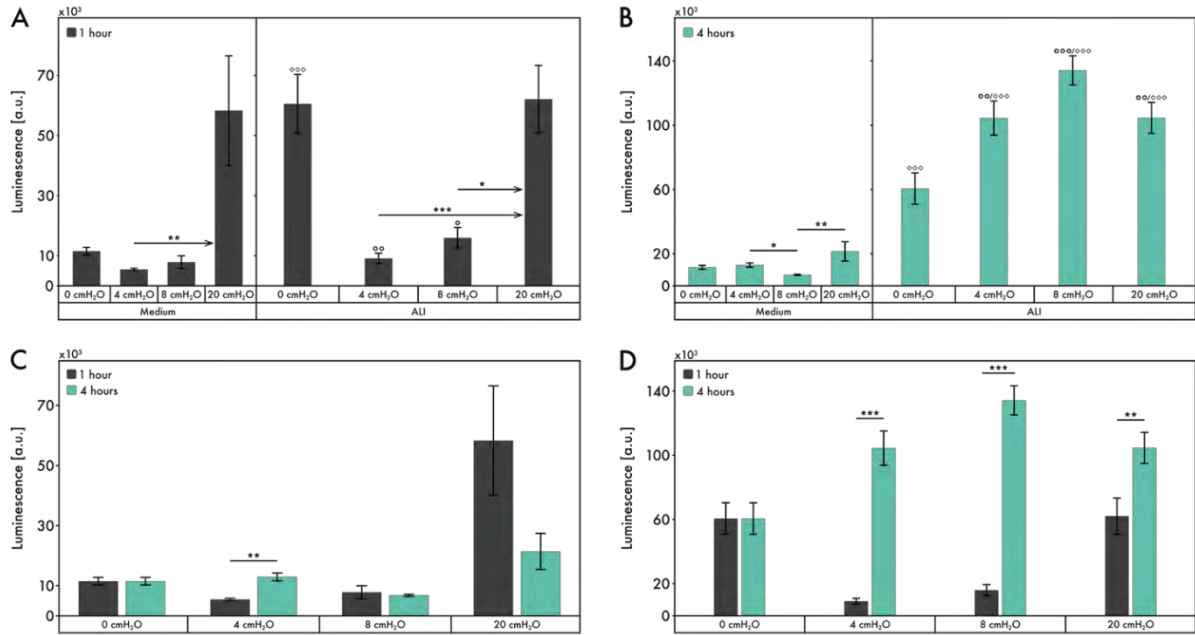
Darüber hinaus führte die einstündige Druckapplikation zu einer signifikanten Abnahme des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Transports sowie der Aktivität des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals (ENaC). Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Druckhöhe (Abb. 4C). Eine Beeinträchtigung dieses Transportmechanismus ist eng mit der Entstehung eines Atemnotsyndroms assoziiert und könnte die klinische Situation der ohnehin vulnerablen Frühgeborenen zusätzlich verschärfen. Die vorliegenden Daten deuten somit darauf hin, dass bereits kurzfristige Druckexpositionen die Barrierefunktion und den Ionentransport des fetalen Alveolarepithels erheblich beeinträchtigen.



**Abb. 4:** Druckinduzierte Beeinträchtigung von FDLE-Zellen. Die einstündige Druckapplikation erfolgte bei 21%  $\text{O}_2$  unter ALI-Bedingungen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. **A:** Druckinduzierte TEER-Abnahme ( $n = 20-24$ ;  $***p < 0,001$ ). **B:** Druckinduzierte Abnahme der Epithelintegrität (Anteil der FDLE-Zellen mit  $\text{TEER} > 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). **C:** Druckinduzierte Abnahme des Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Transports ( $\Delta V_{\text{amil}}$ ) ( $n = 5-24$ ; nur FDLE-Zellen mit  $\text{TEER} > 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $***p < 0,001$ ).

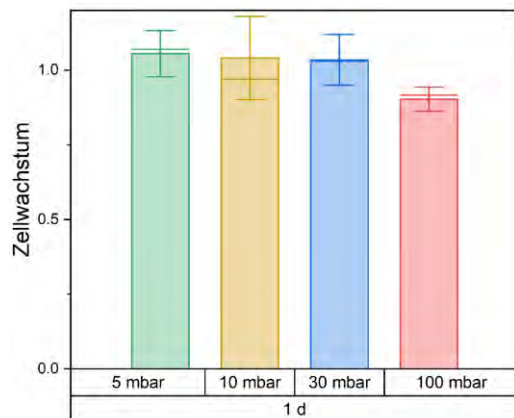
Zur Untersuchung der Zytotoxizität und der Membranintegrität nach Druckexposition wurde das CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Promega) eingesetzt. Dieses Verfahren basiert auf der Messung sogenannter *Cell-Death*-Proteasen, die ausschließlich bei Verlust der Membranintegrität in den Überstand freigesetzt werden und somit als sensitiver Marker für zelluläre Schädigung dienen. Die FDLE-Zellen wurden sowohl unter vollständig mit Medium bedeckten Bedingungen (*submerged*) als auch unter ALI-Bedingungen verschiedenen Druckgradienten über eine Dauer von 1 h bzw. 4 h ausgesetzt.

Insbesondere ein Druckgradient von 20  $\text{cmH}_2\text{O}$  führte sowohl nach ein- als auch nach vierstündiger Exposition zu einer signifikanten Zunahme der Zytotoxizität, unabhängig von der jeweiligen Kultivierungsbedingung (Abb. 5A/B). Unter *submerged*-Bedingungen zeigte die Verlängerung der Druckexposition von 1 h auf 4 h keinen wesentlichen zusätzlichen Einfluss auf die Zytotoxizität (Abb. 5C). Demgegenüber führte unter ALI-Bedingungen eine längere Inkubationsdauer zu einer signifikanten weiteren Zunahme der Zytotoxizität (Abb. 5D), was auf eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber mechanischer Belastung bei gleichzeitiger Luft-Exposition hinweist.



**Abb. 5:** Druckinduzierte Beeinträchtigung von FDLE-Zellen. Die FDLE-Zellen wurden für 1 h bzw. 4 h einem hydrostatischen Druckgradienten von 4, 8 oder 20 cmH<sub>2</sub>O bei 21 % O<sub>2</sub> unter ALI- oder *submerged*-Bedingungen ausgesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. **A:** Unter *submerged*-Bedingungen zeigte sich nach einstündiger Druckapplikation ausschließlich bei 20 cmH<sub>2</sub>O eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität (n = ...; \*\*p<0,01). Unter ALI-Bedingungen kam es ebenfalls bei 20 cmH<sub>2</sub>O zu einer signifikanten Zunahme der Zytotoxizität, zudem unterschieden sich 4 und 8 cmH<sub>2</sub>O signifikant von 20 cmH<sub>2</sub>O (n = ...; \*p<0,05 bzw. \*\*\*p<0,001). **B:** Nach vierstündiger Druckapplikation war unter *submerged*-Bedingungen bei 20 cmH<sub>2</sub>O im Vergleich zu 8 cmH<sub>2</sub>O eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität nachweisbar (n = ...; \*\*p<0,01). Unter ALI-Bedingungen zeigten bereits 4, 8 und 20 cmH<sub>2</sub>O eine signifikante Zunahme der Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrolle (n = ...; °°p<0,01 bzw. °°°p<0,001). Im direkten Vergleich von ALI- zu *submerged*-Bedingungen war die Zytotoxizität bei allen Druckstufen einschließlich der Kontrolle signifikant erhöht (◇◇◇p<0,001). **C:** Vergleich der ein- vs. vierstündigen Druckapplikation unter *submerged*-Bedingungen. Insgesamt zeigten sich nur geringe zeitabhängige Effekte, mit einem signifikanten Unterschied bei 4 cmH<sub>2</sub>O (\*\*p<0,01). **D:** Vergleich der ein- vs. vierstündigen Druckapplikation unter ALI-Bedingungen. Bei allen Druckgradienten war die Zytotoxizität nach vierstündiger Exposition signifikant höher als nach einstündiger Applikation (4 und 8 cmH<sub>2</sub>O: \*\*\*p<0,001; 20 cmH<sub>2</sub>O: \*\*p<0,01). Für die Kontrolle (0 cmH<sub>2</sub>O) zeigten sich keine signifikanten zeitabhängigen Unterschiede.

Weiterhin haben wir als Kontrolle FDLE im Drucktopf unter homogenem hydrostatischem Druck kultiviert und hier eine mögliche Veränderung der Zellzahl im Monolayer als Funktion des Drucks erforscht (Abb. 6).



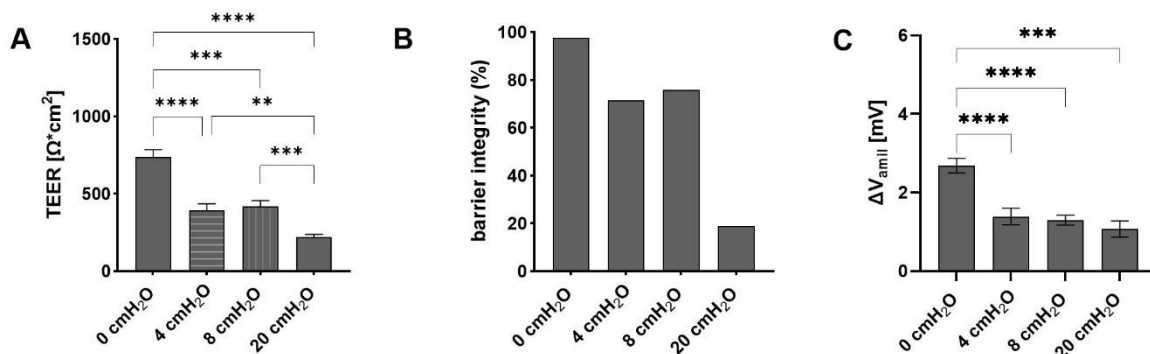
**Abb. 6:** Zellzahl von FDLE Zellen nach einem Tag Kultivierung in der homogenen Druckkammer für unterschiedliche hydrostatische Drücke. Wie erwartet hat ein homogener Druck keinen Einfluss auf das hier untersuchte Zellverhalten, da die genutzten Drücke in der Größenordnung von Luftdruckschwankungen der Atmosphäre sind bzw. zwischen verschiedenen barometrischen Höhen, in denen eine normale Lungenfunktion vorliegt.

### 3. Darstellung druckinduzierter pathologischer Einflüsse unter Hyperoxie

Da Frühgeborene im klinischen Alltag neben der mechanischen Beatmung häufig zusätzlich einer erhöhten Sauerstoffkonzentration ausgesetzt sind, stellt Hyperoxie einen weiteren relevanten Stressfaktor für das unreife Lungenepithel dar. Um die kombinierten Effekte von positivem hydrostatischem Druck und erhöhter Sauerstoffkonzentration unter klinisch relevanten Bedingungen abzubilden, wurden die beschriebenen Experimente ergänzend unter einer Sauerstoffatmosphäre von 60% wiederholt. Auf diese Weise konnte untersucht werden, inwieweit Hyperoxie die druckinduzierten Veränderungen der Barrierefunktion und des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Transports zusätzlich verstärkt oder modifiziert.

Nach Kultivierung der FDLE-Zellen unter Druckgradienten bei einer Sauerstoffkonzentration von 60% wurden die Zellen ebenfalls in der Ussing-Kammer funktionell untersucht. Auch unter hyperoxischen Bedingungen zeigte die TEER-Messung bereits nach einstündiger Druckexposition eine signifikante Abnahme (Abb. 7A). Im Vergleich zu den normoxischen Bedingungen (21%  $\text{O}_2$ ) konnte auch zwischen den verschiedenen Druckgradienten 4  $\text{cmH}_2\text{O}$  und 8  $\text{cmH}_2\text{O}$  gegenüber 20  $\text{cmH}_2\text{O}$  signifikante Unterschiede festgestellt werden. Entsprechend war auch die strukturelle Integrität des Epithelmonolayers nach Druckapplikation unter hyperoxischen Bedingungen reduziert (Abb. 7B). Der Anteil intakter Monolayer lag bei 4  $\text{cmH}_2\text{O}$  und 8  $\text{cmH}_2\text{O}$  bei über 70%, wohingegen die Epithelintegrität bei 20  $\text{cmH}_2\text{O}$  unter 20% lag. Eine erhöhte Vulnerabilität des fetalen Alveolarepithels gegenüber der kombinierten Belastung durch Druck und Sauerstoff ließ sich nicht eindeutig feststellen.

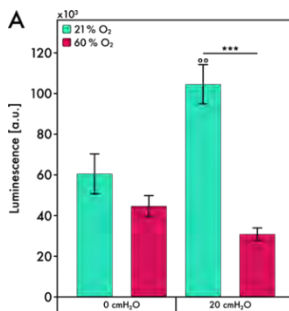
Auch der epitheliale  $\text{Na}^+$ -Transport sowie die Aktivität des ENaC waren unter 60%  $\text{O}_2$  nach einstündiger Druckexposition signifikant vermindert (Abb. 7C). Im direkten Vergleich zu 21%  $\text{O}_2$  zeigte sich eine zusätzliche Reduktion der ENaC-Aktivität bereits bei 4  $\text{cmH}_2\text{O}$  und 8  $\text{cmH}_2\text{O}$ . Damit verstärkte Hyperoxie die druckinduzierte funktionelle Beeinträchtigung des  $\text{Na}^+$ -Transports bei niedrigeren Druckgradienten. Da der epitheliale  $\text{Na}^+$ -Transport essenziell für die alveoläre Flüssigkeitsresorption und die postnatale Lungenadaptation ist, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination aus mechanischer Beatmung und erhöhter Sauerstoffkonzentration die Entstehung eines Atemnotsyndroms zusätzlich begünstigen könnte.



**Abb. 7:** Druckinduzierte Beeinträchtigung von FDLE-Zellen. Die 1-stündige Druckapplikation erfolgte bei 60%  $\text{O}_2$  unter ALI-Bedingungen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. **A:** Druckinduzierte TEER-Abnahme ( $n = 33-43$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ;  $****p < 0,0001$ ). **B:** Druckinduzierte Abnahme der Epithelintegrität (Anteil der FDLE-Zellen mit  $\text{TEER} > 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). **C:** Druckinduzierte Abnahme des Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Transports ( $\Delta V_{\text{amil}}$ ) ( $n = 7-42$ ; ausgewertet wurden nur FDLE-Zellen mit  $\text{TEER} > 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $***p < 0,001$  bzw.  $****p < 0,0001$ ).

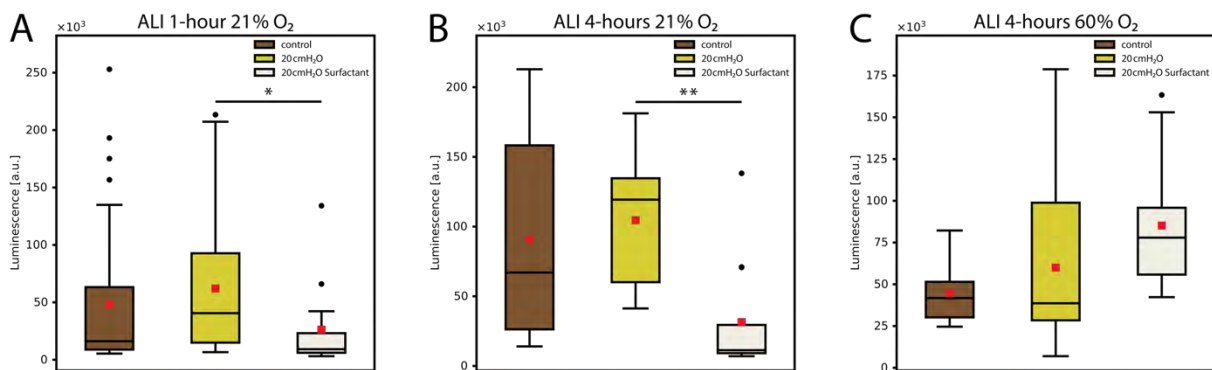


Zur Untersuchung der druckinduzierten Zytotoxizität von FDLE-Zellen unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen wurden die Zellen unter ALI-Bedingungen für vier Stunden Druckgradienten von 4, 8 und 20 cmH<sub>2</sub>O bei 21% beziehungsweise 60% O<sub>2</sub> ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Sauerstoffkonzentrationen ausschließlich bei der höchsten Druckstufe von 20 cmH<sub>2</sub>O nachweisen ließ (Abb. 8). Ein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle (0 cmH<sub>2</sub>O) und 20 cmH<sub>2</sub>O trat hingegen nur unter normoxischen Bedingungen bei 21% O<sub>2</sub> auf. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Hyperoxie die druckinduzierte Zytotoxizität insbesondere bei hohen Druckbelastungen zusätzlich moduliert.



**Abb. 8: Druckinduzierte Zytotoxizität von FDLE-Zellen unter normoxischen und hyperoxischen Bedingungen.** Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Vierstündige Druckapplikation von 4, 8 und 20 cmH<sub>2</sub>O bei 21% bzw. 60% O<sub>2</sub> unter ALI-Bedingungen zur Bestimmung der druckinduzierten Zytotoxizität. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Sauerstoffkonzentrationen zeigte sich ausschließlich bei 20 cmH<sub>2</sub>O ( $n = \dots$ ;  $***p < 0,001$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle (0 cmH<sub>2</sub>O) und 20 cmH<sub>2</sub>O trat nur unter 21% O<sub>2</sub> auf ( $^{\circ}p < 0,01$ ).

Wir haben weitere Untersuchungen durchgeführt, um die Auswirkungen von klinisch genutztem Surfactant auf FDLE-Zellen unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen in Gegenwart eines Druckgradienten zu untersuchen (Abb. 9). Das Surfactant wurde unter ALI-Bedingungen vor der Druckexposition zugeführt.



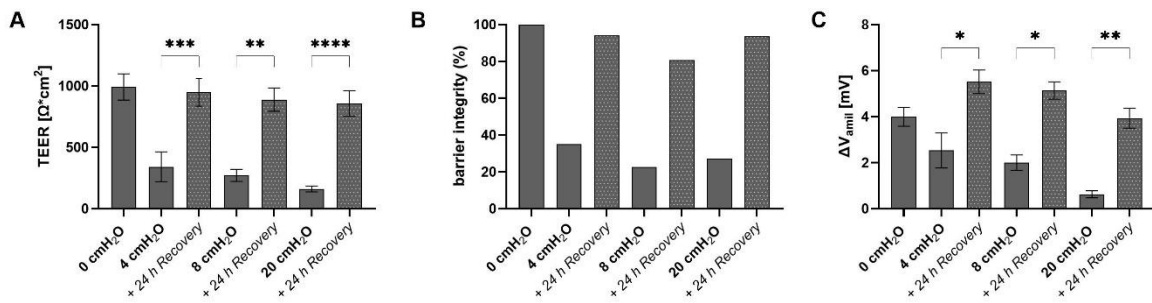
**Abb. 9:** Surfactant verbessern die Membranintegrität von FDLE-Zellen, die Druck ausgesetzt sind. Die Zellen wurden unter ALI-Bedingungen mit folgenden Druckgradienten kultiviert (braun – 0 cmH<sub>2</sub>O; gelb/beige – 20 cmH<sub>2</sub>O): **A** 1 Stunde 21 % O<sub>2</sub>, **B** 4 Stunden 21 % O<sub>2</sub> und **C** 4 Stunden 60 % O<sub>2</sub>. Beigefarbene Kästen zeigen die zusätzliche Anwendung von Surfactant. Rote Quadrate geben die Mittelwerte an, während die Mittellinien die Mediane (50. Perzentil) darstellen; die unteren und oberen Ränder des Kastens stellen das 1. und 3. Quartil dar; Punkte stellen Ausreißer dar. Signifikanzwerte sind mit Sternchen gekennzeichnet (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Bei einer Sauerstoffkonzentration von 21% O<sub>2</sub> zeigten Zellen mit appliziertem Surfactant eine höhere zelluläre Membranintegrität als unter reinen ALI Bedingungen, sowohl bei einstündiger (keine Signifikanz) als auch vierstündiger (signifikanter Unterschied) Druckapplikation. Bei einem O<sub>2</sub>-Level von 60% und einer Druckapplikation von 4 h hingegen zeigten Messungen ohne Surfactant eine höhere zelluläre Membranintegrität als jene mit Surfactant, jedoch ohne statistische Signifikanz.

## 4. Zelluläre Regenerationsfähigkeit

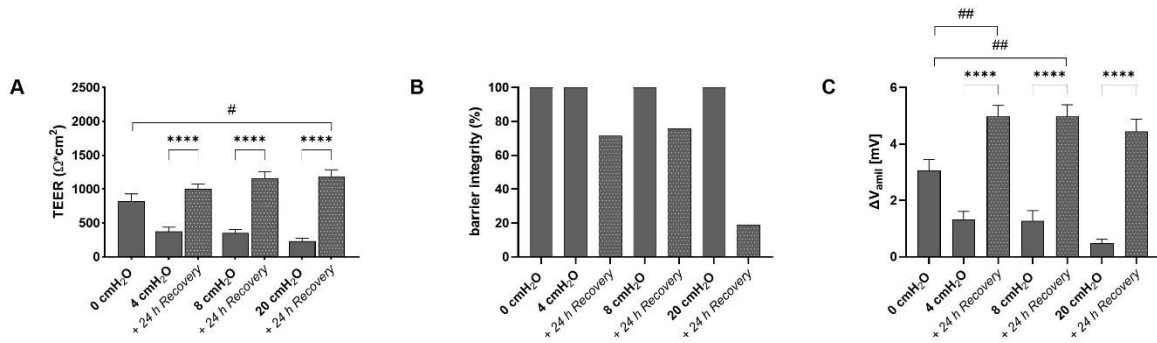
Zur Untersuchung möglicher Regenerationsprozesse der FDLE-Zellen wurde nach der Druckapplikation eine definierte Erholungsphase integriert. Ziel war es zu klären, ob die druckinduzierten Veränderungen irreversibel sind oder ob eine funktionelle Wiederherstellung der epithelialen Eigenschaften erfolgen kann. Nach der Erholungsphase wurden die Epithelbarriere, die epitheliale Integrität sowie die Aktivität der Na<sup>+</sup>-Kanäle erneut untersucht. Die funktionellen Analysen erfolgten mittels Ussing-Kammer-Messungen zur Bestimmung des TEER sowie des Amilorid-sensitiven Na<sup>+</sup>-Transports ( $\Delta V_{amil}$ ) unter verschiedenen Druckgradienten und Sauerstoffkonzentrationen. Sämtliche Experimente wurden unter ALI-Bedingungen durchgeführt, wobei die Druckapplikation jeweils über eine Stunde erfolgte.

Nach einer 24-stündigen Erholungsphase konnte die zuvor beobachtete druckinduzierte Beeinträchtigung der FDLE-Zellen weitgehend aufgehoben werden. Sowohl der TEER als Maß für die Barrierefunktion, die Integrität des Epithelmonolayers als auch der epitheliale Na<sup>+</sup>-Transport normalisierten sich auf das Niveau der unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 10A–C). Diese vollständige funktionelle Wiederherstellung spricht für einen überwiegend reversiblen Einfluss der applizierten Druckgradienten auf das fetale Alveolarepithel.



**Abb. 10:** Regeneration der druckinduzierten Beeinträchtigung von FDLE-Zellen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die einstündige Druckapplikation erfolgte bei 21% O<sub>2</sub> unter ALI-Bedingungen. **A:** Druckinduzierte TEER-Abnahme vor bzw. nach 24-stündiger Erholung (n = 20-34; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001: TEER vor vs. nach 24 h). **B:** Druckinduzierte Abnahme der Epithelintegrität vor bzw. nach 24 h Erholung. **C:** Druckinduzierte Abnahme des Amilorid-sensitiven Na<sup>+</sup>-Transports ( $\Delta V_{amil}$ ) vor bzw. nach 24-stündiger Erholung (n = 5-32; ausgewertet wurden nur FDLE-Zellen mit TEER > 250  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ; \*p<0,05 bzw. \*\*p<0,01:  $\Delta V_{amil}$  vor vs. nach 24 h).

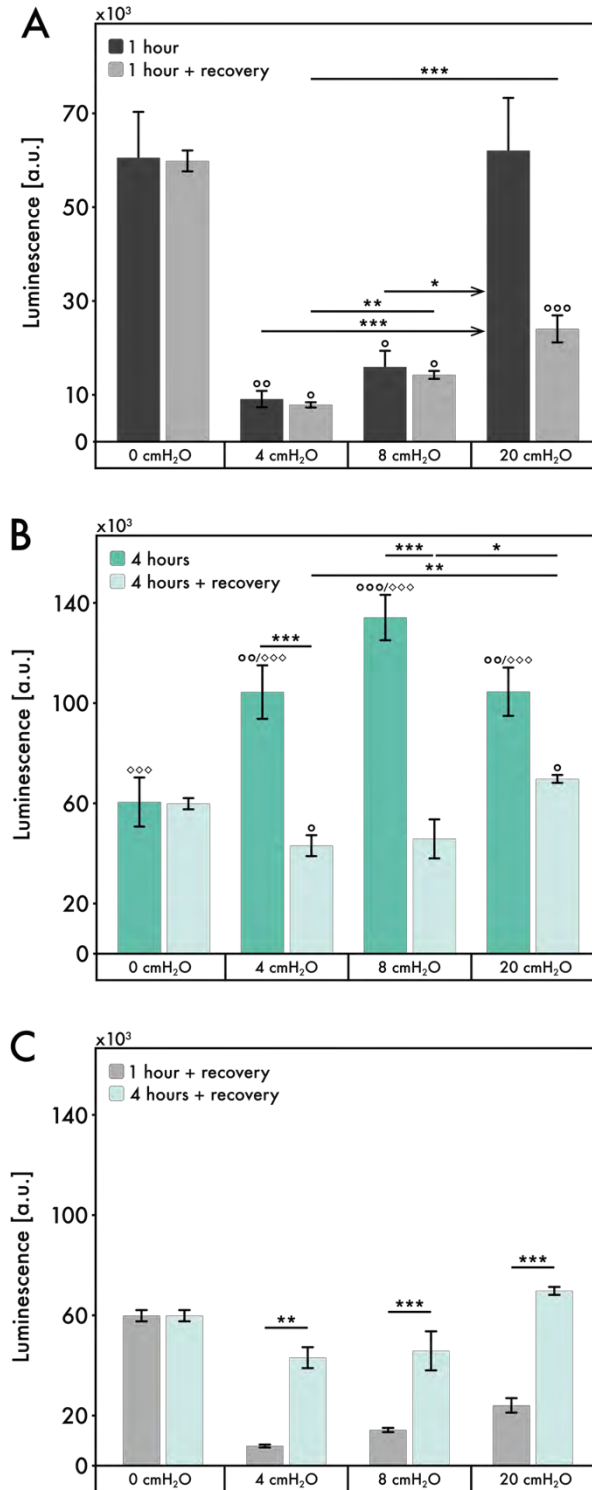
Unter hyperoxischen Bedingungen (60% O<sub>2</sub>) zeigte sich darüber hinaus ein verstärkter Erholungseffekt. Die 24-stündige Regenerationsphase führte hier nicht nur zur vollständigen Aufhebung der druckinduzierten Schädigung von Epitheleigenschaften und Na<sup>+</sup>-Transport, sondern zu einer signifikanten Überschreitung des Kontrollniveaus (Abb. 11B/D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine erhöhte Sauerstoffkonzentration die zellulären Reparatur- und Regenerationsprozesse zusätzlich stimulieren kann. Insgesamt belegen diese Daten, dass die durch mechanische Belastung ausgelösten funktionellen Einschränkungen des fetalen Alveolarepithels prinzipiell reversibel sind und dass Hyperoxie diese Regenerationsprozesse unter den hier untersuchten Bedingungen sogar verstärken kann.



**Abb. 11:** Regeneration der druckinduzierten Beeinträchtigung von FDLE-Zellen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Die einstündige Druckapplikation erfolgte bei 60% O<sub>2</sub> unter ALI-Bedingungen. **A:** Druckinduzierte TEER-Abnahme vor bzw. nach 24-stündiger Erholung (n=17-23; \*\*\*\*p<0,0001: TEER vor vs. nach 24 h; #p<0,05: verglichen mit 0 cmH<sub>2</sub>O). **B:** Druckinduzierte Abnahme der Epithelintegrität vor bzw. nach 24 h Erholung. **C:** Druckinduzierte Abnahme des Amilorid-sensitiven Na<sup>+</sup>-Transports ( $\Delta V_{amil}$ ) vor bzw. nach 24-stündiger Erholung (n = 16-23; ausgewertet wurden nur FDLE-Zellen mit TEER > 250 Ω\*cm<sup>2</sup>; \*\*\*\*p<0,0001:  $\Delta V_{amil}$  vor vs. nach 24 h; ###p<0,001: verglichen mit 0 cmH<sub>2</sub>O).

Nachdem im Rahmen der Ussing Kammer-Messungen gezeigt werden konnte, dass sich die druckinduzierten Einschränkungen der epithelialen Barrierefunktion nach einer 24-stündigen Erholungsphase weitgehend zurückbilden, stellte sich die Frage, inwieweit diese funktionelle Regeneration mit einer Wiederherstellung der Zellviabilität und Membranintegrität einhergeht. Zur weiterführenden Charakterisierung der Regenerationsprozesse wurde daher ergänzend die Zytotoxizität der FDLE-Zellen nach der Erholungsphase mittels CytoTox-Glo™-Assay untersucht. Dadurch konnte differenziert werden, ob die beobachtete Normalisierung der TEER-Werte auf einer Regeneration der Membranintegrität beruht oder trotz funktioneller Erholung weiterhin membranschädigende Prozesse bestehen.

Die Analyse der druckinduzierten Zytotoxizität im Vergleich zwischen akuter Schädigung und 24-stündiger Erholungsphase zeigte eine ausgeprägte Abhängigkeit sowohl von der Höhe als auch von der Dauer der Druckexposition. Nach einstündiger Druckbelastung kam es akut zu einer druckabhängigen Zunahme der Zytotoxizität, während sich nach 24-stündiger Erholung bei der höchsten Druckstufe von 20 cmH<sub>2</sub>O lediglich ein Trend zur Reduktion der Zytotoxizität abzeichnete (Abb. 12A). Demgegenüber war nach vierstündiger Druckapplikation die akute Zytotoxizität deutlich stärker ausgeprägt. Nach der 24-stündigen Erholungsphase zeigte sich hier zwar bei niedrigen Druckstufen von 4 und 8 cmH<sub>2</sub>O eine signifikante Abnahme der Zytotoxizität, bei 20 cmH<sub>2</sub>O blieb die Membranschädigung jedoch weiterhin erhöht (Abb. 12B). Der direkte Vergleich zwischen ein- und vierstündiger Druckexposition verdeutlichte, dass eine längere Druckbelastung sowohl akut als auch nach der Erholungsphase zu einer signifikant höheren Zytotoxizität führte (Abb. 12C). Dies gilt für alle untersuchten Druckstufen und zeigt, dass die Dauer der mechanischen Belastung einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Zellschädigung und die nachfolgende Regenerationsfähigkeit des FDLE-Epithels hat. Insgesamt belegen diese Ergebnisse, dass eine längere Druckexposition die Regenerationsfähigkeit des FDLE-Epithels nachhaltig einschränkt, während kürzere Druckbelastungen deutlich besser kompensiert werden können.



**Abb. 12:** Druckinduzierte Zytotoxizität von FDLE-Zellen: Vergleich zwischen akuter Schädigung und 24-stündiger Erholungsphase. FDLE-Zellen wurden für 1 h bzw. 4 h einem hydrostatischen Druckgradienten bei 21% O<sub>2</sub> unter ALI-Bedingungen ausgesetzt. Die Zytotoxizität wurde unmittelbar nach der Druckapplikation sowie nach einer 24-stündigen Erholungsphase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. **A:** Nach einstündiger Druckbelastung zeigte sich – wie zuvor beschrieben – eine druckabhängige Zunahme der Zytotoxizität. Nach 24-stündiger Erholung zeigte sich bei 20 cmH<sub>2</sub>O ein Trend zur Reduktion der Zytotoxizität (n = ...). **B:** Auch nach vierstündiger Druckapplikation zeigte sich eine druckabhängige Erhöhung der Zytotoxizität. Nach 24-stündiger Erholung war die Zytotoxizität bei 4 und 8 cmH<sub>2</sub>O deutlich reduziert (n = ...; \*\*\*p<0,001). **C:** Nach vierstündiger Druckapplikation war die Zytotoxizität nach 24-stündiger Erholung signifikant höher als nach einstündiger Exposition (4 cmH<sub>2</sub>O: \*\*p<0,01; 8 cmH<sub>2</sub>O bzw. 20 cmH<sub>2</sub>O: \*\*\*p<0,001).

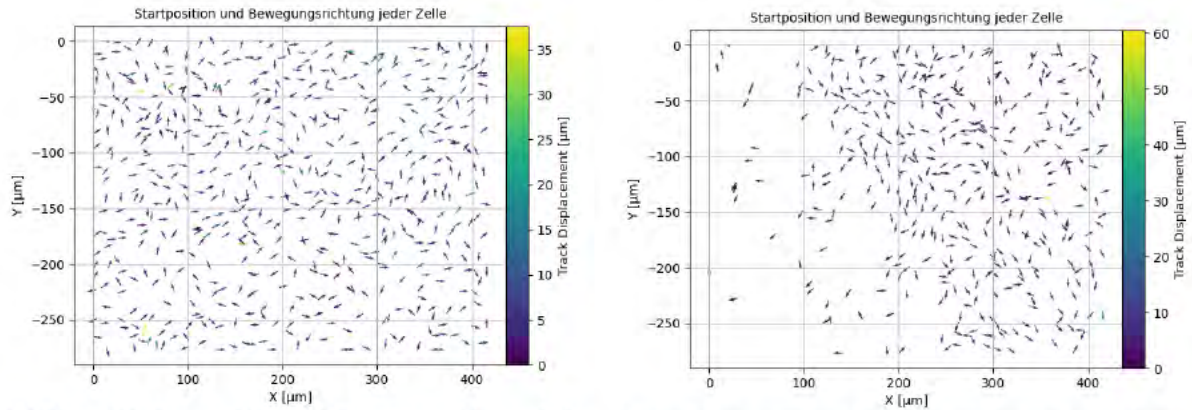


Innerhalb des Projekts gingen wir außerdem der Frage nach, welchen Einfluss physikalische Zelleigenschaften wie Dynamik und Migration auf die Integrität epithelialer Monolayer haben. Ziel war es zu klären, ob durch erhöhten hydrostatischen Druck entstandene Defekte im Zellmonolayer durch verbleibende Epithelzellen geschlossen werden können. Eine solche Defektheilung würde eine koordinierte Zellmigration sowie eine begleitende Proliferation voraussetzen und könnte zur funktionellen Wiederherstellung der alveolaren Barriere beitragen. Gleichzeitig bestand die Fragestellung, ob die mechanische Belastung durch Druck eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) induziert. Eine solche Zelltypumwandlung würde sich in einer veränderten Zellbewegung widerspiegeln, da Epithelzellen typischerweise eine kollektive, korrelierte Migration zeigen, während mesenchymale Zellen überwiegend als Einzelzellen unkorreliert wandern.

Zur quantitativen Analyse dieser potenziellen Wundheilungsmechanismen wurden FDLE-Monolayer unter definierten Druckgradienten kultiviert und anschließend mit einem Lebendfarbstoff markiert. Die Zellbewegungen wurden über mehrere Stunden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie aufgezeichnet. Auf Grundlage der aufgenommenen Zeitrastersequenzen wurden sowohl zeitliche Autokorrelationen der Zellbewegung als auch räumliche Korrelationen zwischen benachbarten Zellen berechnet. Zur objektiven Auswertung dieser Bewegungsprofile wurden im Rahmen des Projekts speziell angepasste computergestützte Analysealgorithmen entwickelt, die die Zellpositionen aus den Bilddaten extrahieren und Positionsänderungen über die Zeit quantitativ erfassen. Dieses methodische Vorgehen ermöglichte eine differenzierte Charakterisierung der Zellmigration und ihrer Koordination unter Druckbelastung. So wurden Analyse-Tools für folgende Zellbewegungen programmiert:

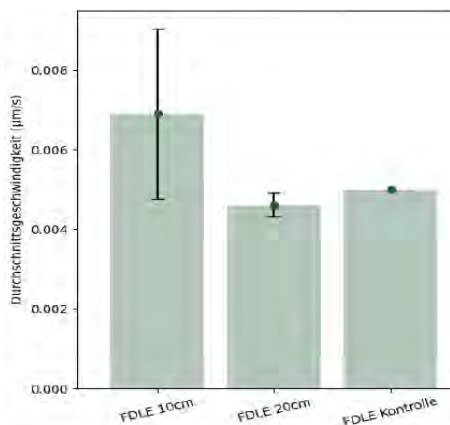
- Darstellung der Zellbewegung als Vektorfeld
- Darstellung des Geschwindigkeitsverlaufs aller Zellen im Monolayer
- Korrelation der Gesamtbewegung / Positionen der Zellen zueinander (Quantifizierung der Bewegungsrichtung untereinander)
- Zeitkorrelationen der Bewegungsrichtung im Monolayer
- Zellbewegung relativ zur Wunde/Defekt im Monolayer
- Veränderung der Wunde/Defektgröße im Monolayer
- Maximal zurückgelegte Distanz der Zellbewegung
- Gesamtdistanz der Zellbewegung
- Maximalgeschwindigkeit + Durchschnittsgeschwindigkeit

Ein exemplarisches Vektorfeld der Bewegungsrichtungen von FDLE-Zellen innerhalb eines Monolayers ist in Abb. 13 dargestellt. Die Farbkodierung verdeutlicht, dass die Zellbeweglichkeit nach der Applikation eines hydrostatischen Druckgradienten von 20 cmH<sub>2</sub>O über einen Zeitraum von vier Stunden deutlich erhöht ist. Derzeit kann jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden, ob diese gesteigerte Dynamik auf einen verstärkten Zellverlust mit daraus resultierendem Platzangebot zurückzuführen ist oder ob sie durch eine Destabilisierung der Tight Junctions und/oder eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Zellen bedingt ist.



**Abb. 13:** Links: Vektordarstellung der Startpositionen und Bewegungsrichtungen einzelner FDLE-Zellen mit Farbkodierung der innerhalb von 4 h zurückgelegten Gesamtstrecke unter Kontrollbedingungen ohne Druck. Rechts: Entsprechende Darstellung der FDLE-Zellen im Monolayer nach vierstündiger Kultivierung unter einem Druckgradienten von 20 cmH<sub>2</sub>O.

Da sich bei der Kultivierung unter erhöhtem hydrostatischem Druck im Monolayer Löcher bilden, stellt sich bei möglichen Regenerationsmechanismen zum Schließen der Löcher durch Proliferation und Migration die Frage, wie mobil die Zellen überhaupt sind. Nur eine gute Dynamik in Form von Zellen, die genügend Traktionskräfte zur Fortbewegung ausüben können, kann hier zu einer Regeneration beitragen. Daher haben wir u.a. die mittleren Geschwindigkeiten der Zellen bei der Bewegung im Monolayer untersucht (Abb. 14). Hierbei zeigt sich zum einen, dass auch in einem dichten Monolayer (Kontrolle) Zellbewegung stattfindet. Die Zellen zeigen eine erhöhte Geschwindigkeit unter 10 cmH<sub>2</sub>O Druckgradient auf, was darauf hindeutet, dass trotz Lochbildung und eine mögliche Apoptose der Zellen die verbleibenden Zellen eine bessere Dynamik aufweisen. Eine weitere Druckerhöhung auf 20 cmH<sub>2</sub>O wiederum führt zu einer Verlangsamung der Zellen, was sich negativ auf Regeneration des Monolayers auswirken kann.



**Abb. 14:** Durchschnittsgeschwindigkeiten von FDLE Zellen im Monolayer unter verschiedenen hydrostatischen Drücken. Der große Fehlerbalken bei 10 cmH<sub>2</sub>O rührt daher, dass sich im Monolayer Löcher bilden und Zellen mit mehr freier Fläche bessere Bewegungsmöglichkeiten haben. Auf der anderen Seite kann dieser zusätzliche Platz von geschädigten Zellen nicht durch Migration ausgenutzt werden, wenn diese aufgrund von hohen hydrostatischen Drücken geschädigt werden (20 cmH<sub>2</sub>O).

## 5. Projektverwertung

Die erste Publikation der o.g. Forschungsergebnisse zum Einfluss von Druckgradienten auf den Na<sup>+</sup>-Transport in FDLE-Zellen, sowie zur Zellviabilität und Regenerationsmechanismen wird zeitnah eingereicht (geplant für Januar 2026). Außerdem gehen wir davon aus, dass die Ergebnisse zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Zellveränderungen auf molekularer Skala ebenfalls zu einer Publikation in einem peer-review Journal führen werden,

so dass dieses Projekt trotz der kurzen Dauer von nur 2 Jahren als sehr erfolgreich betrachtet werden kann.

Weiterhin möchten wir darauf hinweisen, dass unsere Forschungsarbeiten innerhalb des Projektes durch die Biophysical Society international ausgezeichnet wurden (<https://www.biophysics.org/news-room/why-ventilators-can-be-tough-on-preemie-lungs>).

Auch wurde unser Doktorand Jonas Naumann, der auf diesem Projekt beschäftigt ist, aufgrund seiner hervorragenden wissenschaftlichen Leistung im Jahr 2024 ausgewählt, um am Nobelpreisträgertreffen in Lindau teilzunehmen, wo er mit Nobelpreisträgern über unsere Forschungsarbeit diskutieren konnte.

Zum Schluss ist hervorzuheben, dass Frau PD Dr. Laube, eine der Projektleiterinnen, im Zusammenhang mit dem Projekt mit dem Johannes-Wenner-Preis der Deutschen Lungenstiftung e.V. und der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie (GPP) ausgezeichnet wurde (<https://lungenstiftung.de/presse/dr-mandy-laube-aus-leipzig-erhaelt-den-johannes-wenner-forschungspreis-ueber-15-000-euro-fuer-zukunftsweisende-arbeit-zum-besseren-schutz-von-fruehgeborenen>).

## **6. Zusammenfassung und Ausblick**

Im Rahmen des Projekts „Physiologie und Physik der unreifen Lunge unter Druck“ wurde der Einfluss positiven hydrostatischen Drucks, wie er bei der maschinellen Beatmung frühgeborener Kinder auftritt, auf die Funktion und Integrität fetaler alveolarer Epithelzellen untersucht. Hintergrund ist die hohe klinische Relevanz beatmungsassoziierter Lungenschäden, insbesondere bei sehr unreifen Frühgeborenen, deren Lungengewebe gegenüber mechanischen Belastungen besonders vulnerabel ist.

Mithilfe neu entwickelter Druckkammersysteme konnten primäre fetale distale Lungenepithelzellen unter definierten Druckgradienten kultiviert werden. Die funktionelle Analyse mittels Ussing-Kammer zeigte bereits nach kurzer Druckexposition eine ausgeprägte Beeinträchtigung der epithelialen Barrierefunktion, erkennbar durch eine starke Abnahme des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER), eine reduzierte Epithelintegrität sowie eine signifikante Hemmung des Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Transports. Diese Effekte traten bereits bei niedrigen Druckgradienten auf und verstärkten sich mit zunehmendem Druck. Unter hyperoxischen Bedingungen (60%  $\text{O}_2$ ) zeigten sich ebenfalls deutliche druckinduzierte Funktionseinschränkungen. Während eine zusätzliche strukturelle Vulnerabilität des Epithels nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, führte Hyperoxie insbesondere bei niedrigen Druckgradienten zu einer weiteren Reduktion des  $\text{Na}^+$ -Transports. Die Zytotoxizitätsanalysen belegten zudem, dass vor allem hohe Druckgradienten mit einer signifikanten Zellmembranschädigung einhergehen. Ein zentraler Schwerpunkt des Projekts lag auf der Untersuchung der Regenerationsfähigkeit des fetalen Alveolarepithels. Nach einer 24-stündigen Erholungsphase normalisierten sich unter normoxischen Bedingungen sowohl die Barrierefunktion als auch der  $\text{Na}^+$ -Transport weitgehend, was auf eine überwiegend reversible Druckschädigung hinweist. Unter hyperoxischen Bedingungen zeigte sich sogar eine über das Kontrollniveau hinausgehende funktionelle Wiederherstellung, was auf eine stimulierende Wirkung erhöhter Sauerstoffkonzentrationen auf zelluläre Reparaturprozesse hindeutet. Die Zytotoxizitätsanalysen zeigten jedoch, dass lange Druckexpositionen (4 h) die Regenerationsfähigkeit deutlich stärker einschränken als kurze Belastungen (1 h). Ergänzend wurden physikalische Zelleigenschaften wie Dynamik und Migration analysiert, um mögliche Wundheilungsmechanismen des Epithels zu charakterisieren. Die mikroskopische Analyse

der Zellbewegung ergab eine deutlich erhöhte Zellmobilität nach hoher Druckexposition. Ob diese auf Zellverlust, auf eine Destabilisierung der Zell-Zell-Kontakte oder auf eine epithelial-mesenchymale Transition zurückzuführen ist, bleibt Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass positiver hydrostatischer Druck die Barrierefunktion, den Ionentransport und die Zellviabilität des fetalen Alveolarepithels erheblich beeinträchtigt, diese Effekte jedoch in weiten Teilen reversibel sind. Dauer und Höhe der mechanischen Belastung sind dabei entscheidende Einflussgrößen. Die gewonnenen Erkenntnisse liefern wichtige Beiträge zum Verständnis beatmungsinduzierter Lungenschäden und können langfristig zur Optimierung der Beatmungsstrategien bei Frühgeborenen beitragen.

## **7. Populärwissenschaftliche Zusammenfassung**

Frühgeborene Kinder haben häufig noch unreife Lungen. Viele von ihnen sind direkt nach der Geburt auf eine künstliche Beatmung angewiesen, um überhaupt atmen zu können. Diese lebenswichtige Behandlung kann jedoch auch Nebenwirkungen haben: Der durch die Beatmung entstehende Überdruck in der Lunge kann das empfindliche Lungengewebe schädigen und langfristig zu schweren Lungenerkrankungen führen. Warum das passiert und wie stark diese Schäden sind, ist bislang nur unzureichend verstanden. In diesem Projekt wurde deshalb untersucht, wie sich dieser Druck auf Lungenzellen von frühgeborenen Tieren auswirkt. Dazu wurden spezielle Versuchsanlagen entwickelt, mit denen die Zellen unter genau einstellbarem Druck und unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen kultiviert werden konnten – ähnlich wie bei einer Beatmung im Brutkasten. Die Ergebnisse zeigen, dass schon kurze Druckbelastungen die Schutzfunktion der Lungenzellen schwächen und wichtige Transportprozesse stören. Hoher Druck kann zudem direkte Zellschäden verursachen. Positiv ist jedoch, dass sich viele dieser Schäden nach einer Erholungsphase wieder zurückbilden – vor allem, wenn die Druckbelastung nicht zu lange andauert. Außerdem zeigte sich, dass sich die Zellbeweglichkeit nach starkem Druck deutlich erhöht. Ob dies der Reparatur dient oder auf krankhafte Veränderungen hinweist, wird weiter untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse helfen, die künstliche Beatmung bei Frühgeborenen in Zukunft noch schonender zu gestalten und das Risiko von Lungenschäden zu verringern.