

Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin

Geschäftsf. Direktor: Hr. G. Meder

Abteilung für Pneumologie. Leiter: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs Medizin der Phillips-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

Quantitativ-histologische Untersuchung der Auswirkungen einer inhalativen Stickstoffdioxid-Exposition der Maus – Einfluss von Expositionsdauer und Lebensalter

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Phillips-Universität Marburg

vorgelegt von Barbara Landenberger aus Minden

Marburg, 2008

Rückseite:

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Phillips-Universität Marburg am
27.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. H. Fehrenbach

1. Korreferent: Prof. Dr. J. Rüschoff
2. Korreferent: Prof. Dr. A. Pagenstecher

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD).....	1
1.2 Tiermodelle	4
1.3 Stickstoffdioxid (NO ₂), Vorkommen und Pathophysiologie.....	7
1.4 Stereologie	8
1.5 Zielsetzung.....	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Experimentelles Vorgehen	11
2.1.1 Versuchstiere und Präparation der Lungen	11
2.1.2 Versuchsgruppen und NO ₂ -Expositionsprotokoll.....	11
2.1.3 Fixation	12
2.1.4 Bestimmung des Lungenvolumens	12
2.1.5 Probennahme nach den Prinzipien des „systematic uniform random sampling“.....	13
2.1.6 Aufbereitung der Proben für die Lichtmikroskopie.....	13
2.2 Mikroskopische Auswertung	14
2.2.1 Lichtmikroskopie	14
2.2.2 Strukturparameter	14
2.3 Datenauswertung und Statistik	17
3. Ergebnisse.....	19
3.1 Körpergewicht und Organvolumen	19
3.2 Volumen-gewichtetes mittleres Volumen der parenchymalen Lufträume	22
3.3 Mean Chord Length.....	24
3.4 Alveolar- und Ductalvolumen.....	25
3.5 Oberflächendichte	26
3.6 Alveolaroberfläche.....	28
3.7 Septenvolumen	31
3.8 Parenchym/Nichtparenchym.....	35
4. Diskussion	36
4.1 Gewebsfixierung.....	36
4.2 Quantitativ-histologischer Untersuchungsansatz	36
4.3 Pathomechanismen der Emphysementwicklung.....	39
4.4 NO ₂ -Exposition an Mäuselungen als Modell für die COPD beim Menschen	40
4.5 Veränderungen Emphysem-relevanter Parameter auf NO ₂ -Exposition.....	44

4.6 Altersemphysem.....	48
4.7 Interaktionen zwischen Alter und NO ₂ -Exposition	53
4.8 Ausblick.....	56
5. Zusammenfassung	58
6. Tabellenverzeichnis	60
Tabelle 6.1: Probenaufarbeitung für die Lichtmikroskopie	60
Tabelle 6.2 Verwendete Formel.....	61
Tabelle 6.3 mittleres Organvolumen, volumengewichtetes mittleres Volumen der parenchymalen Lufträume, Mean Linear Chord Length, Oberflächendichte, Alveolaroberfläche.....	62
Tabelle 6.4 Volumen von Parenchym/Nichtparenchym, Alveole/Ductus, sowie ihre Volumendichten	64
Tabelle 6.5 Volumen von Luftraum gesamt/Septum/Kapillare, sowie ihre Volumendichten	66
Tabelle 6.6 gewichtsspezifisches Volumen des Septengewebes, gewichtsspezifische Alveolaroberfläche, Körpergewicht	68
7. Literaturverzeichnis.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Körpergewicht	20
Abbildung 2: mittleres Organvolumen	21
Abbildung 3: volumen-gewichtete mittlere Volumen der parenchymalen Lufträume	23
Abbildung 4: Mean Chord Length	24
Abbildung 5: Alveolar- und Ductalvolumina.....	26
Abbildung 6: Oberflächendichte	27
Abbildung 7: Alveolaroberfläche	29
Abbildung 8: Gewichtsspezifische Alveolaroberfläche.....	30
Abbildung 9: Volumendichte des Septengewebes	32
Abbildung 10 Gesamtvolumen des Septengewebes	33
Abbildung 11: Gewichtsspezifisches Septenvolumen.....	34

1. Einleitung

1.1 Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

An einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) sterben weltweit jährlich etwa drei Millionen Menschen. Damit belegt die COPD heute den vierten Platz in der weltweiten Todesstatistik (GOLD 2003). Für das Jahr 2020 wird erwartet, dass sie die dritthäufigste globale Todesursache und die fünfthäufigste weltweite Ursache für eine die Lebensqualität signifikant vermindernde physische Beeinträchtigung sein wird (Sin DD et al 2003).

Die Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) definiert die COPD als einen Krankheitszustand, der durch eine nicht vollständig reversible Atemwegsobstruktion charakterisiert ist. Diese ist zum einen progredient und zum anderen mit einer abnormen Entzündungsantwort der Lungen auf Noxen assoziiert (GOLD 2003). Die European Respiratory Society (ERS) klassifiziert die COPD als ein reduziertes maximales Expirationsvolumen und eine langsam erzwungene Entleerung der Lungen (slow forced emptying of the lungs), welche progredient verläuft und weitgehend irreversibel gegenüber der aktuell verfügbaren medikamentösen Behandlung ist (Mannino DM 2002). Die American Thoracic Society (ATS) versteht die COPD als einen Krankheitszustand, der durch die Präsenz einer Atemwegsobstruktion charakterisiert ist, die aus einer Chronischen Bronchitis oder einem Emphysem resultiert; die Atemwegsobstruktion ist progredient und kann von einer Hyperreaktivität der Atemwege begleitet und möglicherweise teilreversibel sein (Mannino DM 2002). Während GOLD und ATS eine pathophysiologisch geprägte Definition wählen, fokussiert die ERS auf diagnostische und therapeutische Aspekte. Die genaue Klassifikation der Atemwegsobstruktion, Reversibilität und Schwere der Erkrankung wird jedoch in jeder der drei Definitionen unterschiedlich formuliert.

Klinisch wird die Erkrankung durch chronischen Husten und Auswurf symptomatisch, der gemäß Definition über einen Zeitraum von drei Monaten innerhalb zwei aufeinander folgender Jahre auftritt, und ist mit einem Absinken der Einsekundenkapazität (FEV_1) assoziiert (Mannino DM 2002). Hierbei wird das nach langsamer tiefer Inspiration folgende forcierte Expirationsvolumen innerhalb der ersten Sekunde erfasst.

Pathologische Veränderungen umfassen die Einwanderung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und CD8-positiven T-Lymphozyten in Lungengefäße, Atemwege, und Lungenparenchym. Des Weiteren werden vergrößerte Drüsen und eine erhöhte Anzahl von Becherzellen beobachtet, was mit einer verstärkten Schleimsekretion einhergeht (Croxtton TL et al 2002; Suki B et al 2003; Wegmann M et

al 2003). Die physiologische Lungenstruktur erfährt durch die Zerstörung von Alveolarwänden und eine konsekutive permanente Vergrößerung des Luftraumes distal der terminalen Bronchiolen eine Veränderung im Sinne einer Emphyseentwicklung. Folge ist der Verlust des intraluminalen Drucks in den terminalen Atemwegen und der Lungenelastizität, welche durch eine im Rahmen von Umbauprozessen vermehrte Ablagerung von Kollagen zusätzlich verringert wird. Die Entlüftung der schmalen Atemwege ist eingeschränkt, insbesondere unter Belastung. Bei forcierter Expiration kann sich der vergrößerte Alveolarsack um den Bronchiolus vorstülpen. Folge ist ein expiratorischer Kollaps des Bronchiolus ohne vorherige Entlüftung der Alveolen (sog. air trapping-Phänomen). Klinisch macht sich dieser Prozess durch eine (Belastungs-)Dyspnoe bemerkbar (Mannino DM 2002).

Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung einer COPD ist das Rauchen. Dennoch entwickeln nur weniger als 25% der Raucher eine COPD und mehr als 15% der mit einer COPD assoziierten Todesfälle treten bei Nichtrauchern auf. Diese Ergebnisse lassen den Einfluss von weiteren Faktoren wie Umweltverschmutzung oder einer genetischen Prädisposition vermuten. Inwiefern erbliche Umstände als Risikofaktoren gewertet werden müssen, ist derzeit aber noch unklar. Gleichwohl hat man mit Hilfe von Fall-Kontroll-Studien Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer COPD und Polymorphismen der Gene für α_1 -Antitrypsin (Luft FC 1999), Tumornekrosefaktor- α und Surfactantprotein B identifiziert (Croxtton TL et al 2002).

Die Kosten, die der Volkswirtschaft durch COPD entstehen, sind immens. Eine Analyse aus dem Jahr 1996 in Deutschland belegt, dass die durch Rauchen ausgelöste COPD Kosten von 5,471 Milliarden Euro jährlich verursacht. Im Vergleich dazu belaufen sich die jährlichen Kosten die durch Lungenkrebs entstehen, der auf Rauchen zurückzuführen ist, auf 2,593 Milliarden Euro (GOLD 2003). Eine entsprechende Studie von 1993 aus den USA bezifferte die finanziellen Belastungen durch medizinische Behandlung allein auf 14,7 Milliarden US Dollar im Jahr. Werden Schätzungen über indirekt verursachte Kosten, beispielsweise hervorgerufen durch Arbeitszeit- und Produktivitätsausfall, hinzugenommen, steigen die finanziellen Belastungen für das Gesundheitssystem um 9,2 Milliarden US Dollar auf insgesamt 23,9 Milliarden US Dollar im Jahr 1993 (Mannino DM 2002).

Darüber hinaus belegte die National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III 1994), eine repräsentative US-Studie der amerikanischen Bevölkerung von 1988 – 1994, dass Prävalenz und Häufigkeit der COPD-Erkrankung abhängig davon, welcher Definition man sich bedient, innerhalb derselben Population unterschiedlich hoch ausfallen können. Während die American Thoracic Society (ATS) die Prävalenz der COPD in den USA auf 4,8 Millionen Erwachsene schätzte,

bezahlten GOLD und ERS die Prävalenz in den USA im gleichen Zeitraum auf 23,6 Millionen Erwachsene. Ursache der Differenzen ist die unterschiedliche Schwerpunktsetzung der diversen klinischen Symptome bei der Diagnosestellung: GOLD und ERS erklärten alle Patienten mit einer relevanten Atemwegobstruktion zu COPD-Kranken. Die ATS zählte dagegen nur solche Patienten als erkrankt, die unter einer relevanten Obstruktion und einem Emphysem oder Chronischer Bronchitis litten. Daneben verursacht ein Überfluss an Terminologie, der im Zusammenhang mit COPD in Gebrauch ist (bspw. Raucherlunge, Emphysem, chronische Bronchitis), Konfusion bei Patienten und nicht selten auch Ärzten (Croxtton TL et al 2003).

Hierdurch können sowohl die Bedeutung der COPD für Mortalität und Krankenhausaufenthalte einerseits, als auch Prävalenz und Häufigkeit der akuten Erkrankung andererseits, nicht verlässlich beurteilt werden. Aufgrund einer von Ärzten insgesamt eher zögerlich vorgenommenen Diagnosestellung und dem vergleichsweise geringen Bekanntheitsgrad der Erkrankung in der allgemeinen Öffentlichkeit, ist jedoch eher davon auszugehen, dass die Erkrankung in ihrer Bedeutung unterschätzt wird (GOLD 2003) und eine hohe Dunkelziffer vermutet werden muss (Mannino DM 2002).

Trotz dieser alarmierenden Zahlen ist die Ätiologie der COPD weiterhin unklar. Fragen bezüglich genetischer Dispositionen, der genauen Bedeutung von Entzündungsreaktion, Apoptose und oxidativem Stress, den an Reaktionswegen beteiligten Proteasen, regulativ eingreifenden Mechanismen, möglichen Verknüpfungen zwischen COPD und Lungenkrebs bzw. Asthma u.a. bleiben offen. Die Therapie beschränkt sich aufgrund mangelnder Kenntnis der pathogenen Mechanismen auf eine Symptombehandlung. Man verfolgt hierbei gemäß den Richtlinien der GOLD eine 3-Stufen-Therapie, in der inhalative β -Sympathomimetika, Parasympatholytika und gegebenenfalls Cortison und Theophyllin zum Einsatz kommen. Eine Sauerstofflangzeittherapie (mindestens sechzehn Stunden/Tag) verbessert beim Auftreten einer chronischen Hypoxie die Langzeitüberlebensrate. Eine prophylaktische Impfung gegen Pneumokokken und Influenzavirusinfektion, begleitende Antibiose bei akuter Infektexazerbation und Sekretolytika, sowie Physiotherapie mit dem Schwerpunkt der pulmonalen Rehabilitation ergänzen die Basistherapie. Von essentieller Bedeutung ist das Aussetzen der Morbiditätsauslösenden und -fördernden Noxen (z.B. Rauchen!).

Dennoch kann eine Progression der Erkrankung mit diesen Maßnahmen zwar verzögert aber nicht aufgehalten werden.

1.2 Tiermodelle

Um die pathogenetischen Mechanismen der Emphysementwicklung verstehen und erfolgreiche Therapieansätze schaffen zu können, sind vielseitige Forschungsansätze notwendig. Tiermodelle werden benötigt, die die komplexe Pathophysiologie der COPD widerspiegeln und an denen sich Hypothesen über mögliche Mechanismen der Erkrankung auf ihre Relevanz hin prüfen lassen.

Erste Untersuchungen wurden schon vor 40 Jahren von Gross (1965) und Eriksson (1965) unternommen. Während Gross feststellte, dass eine intratracheale Instillation von Papain in die Lunge von Ratten ein Lungenemphysem hervorruft, beobachtete Eriksson den ursächlichen Zusammenhang zwischen einem Mangel an α_1 -Antitrypsin und einem frühen panlobulären Emphysem beim Menschen.

Inzwischen sind vielseitige Versuche unternommen worden, dieses komplexe Krankheitsbild so genau wie möglich zu imitieren. Neben der Verwendung traditioneller Tierversuche werden Untersuchungen an genetisch veränderten Mäusen durchgeführt, die Aufschlüsse über die spezifischen Funktionen von Genen bzw. ihren Produkten an Wachstum und Destruktion von Alveolen geben. Der angeborene Mangel verschiedener Proteine führt bei den Mausmutanten *blotchy* (Ranga V und Kleinerman J 1981; Fisk DE und Kuhn C 1976), *pallid* (Lungarella G et al 2001) und *tight skin* (Green MC et al 1976) zu spontaner Emphysementwicklung im Alter. Die Lunge der *blotchy* Maus beispielsweise zeigt strukturelle und funktionelle Abweichungen von der Norm. Verschiedene Grade einer Bindegewebsabnormalität werden als Ursache diskutiert. Die Tiere zeigen ein vergrößertes totales Lungenvolumen, eine deutlich erhöhte *Mean Linear Intercept Length*¹ und eine verringerte Alveolaroberfläche gegenüber Kontrolllungen normal entwickelter Mäuse.

Entsprechende Veränderungen wurden bei Mäusen mit konstitutiver Überexpression spezifischer Gene (z.B. Kollagenasen- oder Thrombozyten-Wachstumsfaktor B) oder solchen mit fehlenden Komponenten wie Elastin oder Surfactantprotein D beobachtet (Croxtton TL et al 2002).

Daneben zeigten Mausmodelle mit lungenspezifischer Expression charakteristischer Zytokine wie Interleukin 11, Interferon γ und Interleukin 13 Lungenabnormalitäten wie emphysematöse Läsionen oder muköse Metaplasie, die nicht auf eine aberrante Entwicklung der Lunge zurückzuführen sind (Croxtton TL et al 2002).

Während jedoch die genetischen Ursachen bei den beschriebenen Mausmodellen vielfach bekannt sind, ist die pathophysiologische Basis einer fehlgeleiteten Lungenentwicklung und einer im Alter zunehmenden Vergrößerung der

¹ Hierbei werden Schnittpunkte zwischen der Alveolarwand und einer Testlinie mit bekannter Länge gezählt, woraus Informationen über eine mögliche Luftraumerweiterung gezogen werden können.

Gasaustauschräume (Pinkerton KE und Green FHY 2004) beim Menschen noch nicht ausreichend verstanden. Da auch das Krankheitsbild der COPD besonders Menschen mit höherem Lebensalter betrifft, sind mögliche Interaktionen zwischen der durch die COPD bedingte und die physiologische Altersemphysementwicklung zu bedenken. Allerdings gibt es bisher nur wenige Forschungsergebnisse über Ursachen des bekannten physiologischen Altersemphysems.

Pinkerton und Green (2004) bewerten den Alterungsprozess der Mäuselunge im Sinne einer Zunahme des Lungenvolumens mit signifikanter Luftraumerweiterung. Diese Volumenzunahme ist eine mögliche Ursache für eine Vergrößerung der Alveolaroberfläche und wird unter anderem durch das kontinuierliche Wachstum der Alveolar- und Duktal-Volumina sichtbar (Pinkerton KE, Green FHY 2004). Auch Verbeken und Mitarbeiter (1992) schließen anhand experimenteller Studien über funktionelle Charakteristika von senilen Lungen (bspw. Vergrößerung von alveolärem Volumen und *Mean Linear Intercept* (MLI) auf eine Spezies übergreifende Atemwegserweiterung im Alter. Escolar und Mitarbeiter untersuchten die Lungen von sechzehn und 56 Wochen alten Tieren anhand stereologisch ermittelter Parameter. Sie beobachteten hierbei eine Luftraumerweiterung bei der älteren Tierpopulation, jedoch keine gesicherten emphysematösen Veränderungen (Escolar JD et al 1994).

Studien über die Relevanz des Alterns für das Auftreten einer COPD führten u.a. Escolar und Mitarbeiter (1996), Fanucchi und Plopper (2004), Chang und Mitarbeiter (1986), Smiley-Jewell und Van Winkle (2004) durch, gelangten jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Fanucchi und Plopper (2004) kamen anhand ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass wenige Wochen alte Jungtiere vor der Entwöhnung von der Muttermilch weniger anfällig gegenüber Schadstoffexposition der Lunge seien und auch weniger Veränderungen in der Zusammensetzung der pulmonalen Enzyme zeigten als Jungtiere nach der Entwöhnung von der Muttermilch sowie erwachsene Tiere. Allerdings beobachteten sie eine verzögerte Lungenentwicklung der Jungtiere. Auch Chang und Mitarbeiter (1986) stellten eine zumindest gleich hohe, wenn nicht höhere Sensitivität nahezu erwachsener (sechs Wochen alter) Tiere gegenüber 24 Stunden alten Tieren fest, die gleichsam über sechs Wochen (sieben Tage/Woche, 23 Stunden/Tag) hinweg (0,5 ppm-6,0ppm) NO₂ ausgesetzt waren.

Smiley-Jewell und Van Winkle (2004) stellten dagegen eine höhere Anfälligkeit junger Tiere gegenüber einer Schadstoffexposition fest als bei Erwachsenen. Sie machten hierfür simultan verlaufende Reparations- und Entwicklungsphasen nach Verletzung der heranwachsenden Lunge verantwortlich, die möglicherweise in einer veränderten Lungenentwicklung resultiere. Escolar und Mitarbeiter (1996) beobachteten in einer

Studie mit erwachsenen Ratten unterschiedlichen Alters (zwölf Monate [drei Monate Exposition] und neunzehn Monate [sieben Monate Exposition]) ein vermehrtes Ansprechen der jüngeren Tiere gegenüber Tabakrauch-Exposition. Die Jungtiere zeigten ein höheres relatives Risiko einer Emphysementwicklung als die älteren Ratten.

Versuchsanordnungen, in denen Tiere Zigarettenrauch, Ozon oder Stickstoffdioxid (NO₂) ausgesetzt sind, werden benutzt, um der Ursachenforschung von COPD Erkrankungen zu dienen.

An Schweinen vorgenommene chronische (sechs-zwölf Monate) Expositionen mit Zigarettenrauch (zehn Zigaretten/Tag, fünf Tage/Woche) riefen ein progredientes Emphysem und pulmonale Dysfunktionen hervor, die vergleichbar sind zu den bei COPD-Patienten beobachteten Veränderungen (Mahadeva R und Shapiro SD 2002).

Mäuse verschiedener Stämme wurden in einer Versuchsreihe von Lungarella (2001) und Mitarbeitern über sieben Monate hinweg Zigarettenrauch (aus fünf Zigaretten für zwanzig Minuten/Tag) ausgesetzt. In den Lungen der C57BL/6 und DBA/2 Mäuse waren prominente Emphysemabschnitte neben fibrotischen Stadien zu beobachten. Begleitet wurden diese Prozesse von intraalveolärer, peribronchialer und perivaskulärer zellulärer Infiltration (Lungarella G et al 2001).

Escolar und Mitarbeiter (1995) untersuchten die Strukturveränderungen an Zigarettenrauch exponierten Rattenlungen mit Hilfe stereologischer Parameter wie *Mean Chord Length*², *Mean Linear Intercept*, Alveolaroberfläche und Wanddicke. Auch in dieser Studie deuteten die Ergebnisse auf eine emphysematöse Entwicklung der Lungen hin.

Zigarettenrauch-Exposition als Intervention für ein Versuchsmodell der COPD an Tieren kommt der Imitation der durch Rauchen ausgelösten COPD beim Menschen sicherlich am nächsten. Allerdings sind die Versuchszeiträume sehr lang und ermöglichen dementsprechend keine kurzfristig verfügbaren Ergebnisse. Die NO₂-Exposition bietet die Aussicht kürzerer Versuchsreihen und ist darüber hinaus insbesondere an Ratten vielfach und erfolgreich getestet (Barth PJ et al 1995). Eine NO₂-Exposition von Mäusen verschafft außerdem den Vorteil einer möglichen Kombination von traditionellen Tierversuchen (hier chronischer Exposition) mit gentechnischen Ansätzen. Da man auch beim Menschen von einer genetischen Prädisposition ausgeht, die unter entsprechender Schadstoff-Exposition zu einer manifesten COPD-Erkrankung führt, ist eine Kombination beider Techniken für dieses Krankheitsbild von besonderer Relevanz.

Sie dient der Größenannahme des Luftraumes und erfasst den mittleren Abstand zwischen benachbarten Alveolarsepten, ohne die Alveolarwand mit ein zu beziehen.²

1.3 Stickstoffdioxid (NO₂), Vorkommen und Pathophysiologie

NO₂ entsteht als Nebenprodukt von Verbrennungsvorgängen und ist durch seine toxische Wirkung auf den Menschen, ebenso wie auf die Umwelt und Atmosphäre von großer lufthygienischer Bedeutung (Hess. Landesamt f. Umwelt und Geologie 2003). Für seine Emission zeichnet zu über 50% der Kfz-Verkehr verantwortlich. Weitere wichtige Quellen stellen Gebäudeheizung, Industrie und biogene Ursachen dar, wobei man letztere als mikrobiologische Prozesse in den Böden begreift (Hess. Landesamt f. Umwelt und Geologie 2003). Darüber hinaus ist NO₂ Bestandteil des Zigarettenrauches (Senatsverwaltung für Gesundheit, Umwelt und Verbraucherschutz; Wüthrich B 2001; Repine JE et al 1997).

Die EU-weite Rahmenrichtlinie zur Luftqualität enthält eine Liste von Luftschadstoffen, für die wegen der Vielzahl an Emissionsquellen, ihrer weiträumigen Verbreitung und der damit verbundenen Unweltschädigung, eine Überwachung und Minderung notwendig ist (Senatsverwaltung für Gesundheit, Umwelt und Verbraucherschutz). Hierzu wurden Grenzwerte für das maximal zulässige Konzentrationsniveau der Schadstoffe, unter anderem von NO₂, in der Luft festgesetzt. Die mittlere jährliche Konzentrationsschwelle von Stickstoffdioxid liegt bei 40 µg/m³ ($40/2,05 \cdot 10^{-3} = 0,02\text{ppm}$), ein für den Zeitraum von einer Stunde zulässiger Grenzwert (zum Gesundheitsschutz) darf 200 µg/m³ nicht überschreiten (Hess. Landesamt f. Umwelt und Geologie 2003).

Eine 1999 von der deutschen Forschungsgemeinschaft herausgegebene Studie beschäftigte sich mit den durchschnittlichen Konzentrationen, die aus dem Tabakrauch stammende Schadstoffe in verschiedenen Innenräumen typischerweise erreichen. Hierbei wurde eine NO₂-Konzentration von 68-410 µg/m³ am Arbeitsplatz von Rauchern festgestellt und damit eine deutliche Überschreitung der EU weiten Richtlinien. Die in Restaurants ermittelten Durchschnittswerte von 40-190 µg/m³ NO₂ unterschreiten die EU-Grenzwerte nur knapp.

Die SCARPOL-Studie (1992-97) ermittelte einen ursächlichen Zusammenhang von chronischen Atembeschwerden bei Kindern an Orten mit erhöhter NO₂-Belastung (Wüthrich B 2001). Nach lang anhaltender Exposition höherer Konzentrationen wurden ein vermehrtes Auftreten von chronischer Bronchitis, Lungenemphysem und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Atemwegsinfekten beobachtet.

Aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften, erreicht NO₂ den unteren Respirationstrakt (Samoli E et al 2006). Bei Tieren ruft die Inhalation von NO₂ histomorphologische Veränderungen in Abhängigkeit von Dosis und Expositionsdauer hervor. Hohe Dosen von 150 ppm NO₂ über zwei Stunden bzw. 416-833 ppm NO₂ über fünf Minuten hinweg führen durch ein akut bedingtes Lungenödem zum Tod (Roe FJ 1985).

Nach kurzer Gabe subletaler Konzentrationen beginnt eine intensive zelluläre Proliferation und Entzündungsreaktion. Histologisch zeigt sich das Bild einer Bronchiolitis obliterans (Kleinerman J 1977). Die Langzeit-Exposition mit NO₂ führt zu funktionalen Veränderungen wie Atemwegsobstruktion und erhöhter Ansprechbarkeit gegenüber bronchokonstriktorischer Stimuli bis hin zum irreversiblen Umbau der Lungenstruktur im Sinne eines Emphysems. NO₂ verändert außerdem die immunologische Antwort und reduziert die Abwehrfähigkeit gegenüber Infektionen (Chitano P et al 1995).

Eine Lang-Zeit-Exposition mit NO₂ (fünf, zehn, zwanzig ppm/drei, fünfundzwanzig Tage) an Ratten, von Barth und Mitarbeitern (1995) durchgeführt, resultierte in einem Lungenemphysem sowie geringer Fibrose der zentroazinären alveolären Septen und respiratorischen Bronchioli.

Auch Blank und seine Mitarbeiter konnten durch die Exposition mit 30 ppm Stickstoffdioxid (für eine bis acht Wochen) an Ratten die Entwicklung eines zentroazinären Lungenemphysems erreichen. Die Beobachtungen stützten sich auf histologische Evaluationen und Änderungen in Lungenvolumen- und *Mean Linear Intercept* Werten (Blank J et al 1988).

Ranga und Kleinerman (1981) untersuchten den Regenerationsprozess bei Lungen von *blotchy*-Mäusen nach Inhalation mit 20 ppm NO₂. Nach 28 Tagen Exposition beobachteten sie eine Zunahme des bei dieser Mausmutante vor Versuchsbeginn bereits bestehenden Lungenemphysems, assoziiert mit einem signifikanten Abfall der Alveolaroberfläche und einer Zunahme der *Mean Linear Intercept*.

In einer weiteren Studie wurden C57BL/6-Mäuse über 25 Tage 20 ppm NO₂ ausgesetzt. In der Folge entwickelten sich eine Atemwegs- und Parenchymenzündung, die durch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie eine Vergrößerung der distalen Lufträume in Verbindung mit der Entwicklung einer progredienten Atemflußobstruktion gekennzeichnet war (Wegmann M et al 2003).

1.4 Stereologie

Stereologie ist ein Zweig der stochastischen Geometrie, der sich mit der Entwicklung und Anwendung von Verfahren zur Quantifizierung drei-dimensionaler Strukturen mit Hilfe zwei-dimensionaler geometrischer Sonden (Testsysteme) beschäftigt. In der Histologie werden stereologische Ansätze verwendet, um Gewebe, Zellen und Zellorganellen, die alle eine drei-dimensionale Natur haben, an zwei-dimensionalen Schnitten mit Hilfe geeigneter Sonden quantitativ zu erfassen (Cruz-Orive LM und Weibel ER 1990; Weibel ER 2007; Ochs M 2006). Auf diese Weise können Parameter,

die deren drei-dimensionale Struktur definieren, wie Volumen, Oberfläche und Länge, erhoben werden (Howard CV and Reed MG 1998). Da die Verfahren so konzipiert sind, dass keine Annahmen über Größe, Form, Ausrichtung und Verteilung der zu quantifizierenden Struktur im Raum gemacht werden müssen, spricht man von „*design-based*“ Stereologie.

In Verbindung mit der Entnahme einer repräsentativen Stichprobe aus einem großen und dreidimensionalen Organ können durch die lichtmikroskopische Messung an relativ kleinen zweidimensionalen Gewebeschnitten, quantitativ-histopathologische Informationen erhalten werden, die dennoch repräsentativ für das Gesamtorgan sind.

Geht man von verschiedenen großen Objekten in einem Raum aus, fallen regelmäßig in diesem Raum verteilte Punkte häufiger auf große als auf kleine Objekte. Basierend auf dieser Feststellung, kann man mittels der Anzahl der Testpunkte die Volumendichte $V_v(Y)$ und damit den relativen (prozentualen) Anteil der untersuchten Organstrukturen am Gesamtorganvolumen (Referenzraum) ermitteln.

Die Summe der Punkte, die das zu untersuchende Objekt in zufälliger Anordnung treffen, dividiert durch die Summe der Punkte, die den Referenzraum treffen, gibt das Verhältnis der Volumina von Objekt zu Referenzraum an (Howard CV und Reed MG 1998):

$$V_v(Y) = \frac{\sum P_Y}{\sum P_{ref}} \cdot 100[\%] \quad (\text{Formel 1})$$

wobei P_Y die Punkte sind, die auf die Struktur Y fallen, und P_{ref} die Punkte, die auf den Referenzraum fallen. Zu beachten ist, dass laut Definition die Punkte, welche zu Y gezählt werden, ebenfalls zum Referenzraum gehören.

Um unabhängige Aussagen über die zu untersuchenden Strukturen machen zu können, ist die Ermittlung absoluter Volumina nötig, da relative Volumen immer im Verhältnis zum Referenzraum zu sehen sind (Mayhew TM 1991). Um absolute Volumen zu erhalten, wird das relative Volumen der Substruktur (z.B. Parenchym) mit dem Gesamtvolumen der Lunge multipliziert (nach Howard CV und Reed MG 1998).

Für $V(\text{Par})$ gilt dann:

$$V(\text{Par}) = V(\text{Lung}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lung}) \quad (\text{Formel 2})$$

wobei $V(\text{Lung}) = V^* - V(\text{NLung})$

und V^* das durch Flüssigkeitsverdrängung nach Scherle (s. Kapitel 2.1.4) gewonnene Lungenvolumen ist.

Der Begriff „Stereologie“ wurde erstmals 1961 von einer Forschergruppe unter der Leitung Hans Elias geprägt. Sie wollten hiermit betonen, dass zweidimensional gewonnene Daten mit der von ihnen angewandten Methode verlässlich in eine dritte Dimension übertragen werden können. Die „*International Society of Stereologie*“ wurde

1963 gegründet. Mehrere Grundzüge, auf denen die Methode basiert, wurden allerdings schon viele Jahre vorher erstellt. Hier sind insbesondere die Namen Cavalieri (1635) und Delesse (1847) zu nennen.

Wichtige neue Beiträge zur Entwicklung dieses Feldes schließen solche von Weibel (1979), der umfassende Beispiele histologischer Anwendungen erforschte und Gundersen und Mitarbeiter (Gundersen HJ, Jensen EB 1987) mit ein, die das Konzept der design-based Stereologie und das *systematic uniform random sampling* ausgearbeiteten. *Systematic uniform random sampling* bedeutet hierbei, dass die Auswahl von Proben aus einem bestimmten Kollektiv nach einem zuvor gewählten System vollzogen wird. Die Wahl der ersten Probe erfolgt zufällig (Cruz-Orive LM und Weibel ER 1981; Fehrenbach H und Ochs M 1998; Mayhew TM 1991), d.h. *random* und die Distanz zwischen den jeweils gewählten Proben ist immer gleich, d.h. *systematic*. Für jede Probe besteht damit die gleiche Wahrscheinlichkeit (*uniform*), gewählt zu werden. Auf diese Weise lässt sich durch die Entnahme von Gewebeproben für die quantitativ-histopathologische Analyse, eine für das gesamte Organ repräsentative Stichprobe gewinnen.

Weitere Übersichtsarbeiten liefern Informationen über die Anfänge der Stereologie, Grundbegriffe, Definitionen, sowie detaillierte Erläuterungen und Fallbeispiele der angewandten Stereologie (Cruz-Orive LM und Weibel ER 1990, Howard CV und Reed MG 1998).

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war zu klären, inwieweit die Entwicklung eines Lungenemphysems beim Mausmodell der NO₂-Exposition durch die Faktoren „Alter“ und „Dauer der Exposition“ beeinflusst wird. Hierzu wurden zwei Altersgruppen (1,5-2 Monate bzw. 12 Monate) von C57BL/6-Mäusen zwei unterschiedlich langen Expositionszeiten (25 bzw. 55 Tage) ausgesetzt und mit entsprechenden altersgleichen Tieren, die in Raumluft gehalten wurden, verglichen. Das Auftreten eines Lungenemphysems wurde mit Hilfe quantitativ-stereologischer Methoden beurteilt.

2. Material und Methoden

2.1 Experimentelles Vorgehen

2.1.1 Versuchstiere und Präparation der Lungen

Für die Versuche wurden 35 weibliche C57BL/6 Mäuse (Harlaan & Winkelmann, Borchon, Deutschland) verwendet, deren mittleres Körpergewicht bei den Jungtieren 18g (+/- Stdabw. 0,73) und bei den 12 Monate alten Tieren 24,7g (+/- Stdabw. 0,73) betrug. Die Tiere wurden durch Zervikaldislokation getötet und auf dem Rücken liegend fixiert. Nach Freilegung und Eröffnung der Trachea wurde ein Trachealkatheter eingeführt und mit einer Ligatur in der Trachea fixiert. Im Anschluss erfolgte die Laparotomie, Thorakotomie und die Entnahme des Lungenblocks zur Instillationsfixierung *ex situ* (siehe 2.1.3).

2.1.2 Versuchsgruppen und NO₂-Expositionsprotokoll

Aus den 35 Mäusen unterschiedlichen Alters (27 Tiere im Alter zwischen 6 und 8 Wochen, 8 Tiere im Alter von 12 Monaten) wurden sieben Gruppen gebildet, vier Versuchs- und drei Kontrollgruppen. Unter den Versuchstieren wurden 6 junge Mäuse nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und über 25 Tage hinweg NO₂ ausgesetzt. Ihnen wurde eine Gruppe von 6 jungen Mäusen gegenübergestellt, denen 25 Tage Raumlufte gegeben wurde. Des Weiteren wurden jeweils 5 junge Mäuse ausgewählt, die für 55 Tage NO₂ bzw. 55 Tage NO₂ mit anschließender vierwöchiger Erholungszeit bzw. 55 Tage Raumlufte ausgesetzt waren. Ein weiteres Kollektiv bildeten jeweils 4 alte Mäuse unter 25tägiger NO₂- Exposition und deren Kontrollgruppe gleichen Alters mit Raumluftegabe. Damit ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

Gruppe 1: 25 Tage NO₂, junge Tiere

Gruppe 2: 25 Tage Raumlufte, junge Tiere

Gruppe 3: 55 Tage NO₂, junge Tiere

Gruppe 4: 55 Tage Raumlufte, junge Tiere

Gruppe 5: 55 Tage NO₂ mit anschließender vierwöchiger Erholungszeit, junge Tiere

Gruppe 6: 25 Tage NO₂, alte Tiere

Gruppe 7: 25 Tage Raumlufte, alte Tiere

Die Versuchstiere wurden 14 Stunden täglich einer 20 ppm NO₂ enthaltenden Atmosphäre ausgesetzt. Diese Dosis war aus Dosis-Wirkungs-Experimenten

(Wegmann M et al 2003) als die niedrigste bekannt, die Zeichen der pulmonalen Entzündung und Destruktion hervorruft³.

Zur NO₂-Exposition wurden Käfige mit maximal 12 Tieren in luftdichten Kammern aus Plexiglas, die mit einer Vorrichtung zur Zufuhr von NO₂ sowie einem Ventilator zur gleichmäßigen Verteilung des Gasgemisches ausgestattet waren, platziert. Das Volumen der Kammer betrug 60l. Der kontinuierliche Gasfluss wurde auf 12 l/min eingestellt. Die NO₂-Konzentration (Messer-Griesheim, Duisburg, Deutschland) wurde mehrmals täglich über ein fine-flow-meter (ECS 102-1; MPSensor-Systems, 80335 Munich, FRG) ermittelt.

2.1.3 Fixation

Nach der Organentnahme wurde die Fixierung der Lungen vorgenommen, wobei als Fixationslösung ein gepuffertes Aldehyd-Gemisch aus 1,5% Glutardialdehyd und 1,5% Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer (Osmolalität: 300 mOsm/kg; pH-Wert: 7.4) verwendet wurde. Das Fixationsgemisch wurde unter konstantem hydrostatischen Druck von 20 cm H₂O über dem Lungenhilus intratracheal bis zur vollständigen Entfaltung der Lunge instilliert und die Trachea im Anschluss an eine 30minütige Wartezeit ligiert. Die Lungen lagerten über Nacht in der Fixationslösung bei 4° C. Nachfolgend wurden linke und rechte Lunge getrennt, von extrapulmonalem Gewebe befreit und das Volumen der fixierten Lungen durch Flüssigkeitsverdrängung bestimmt (siehe 2.1.4).

Die Tierversuche wurden in Kooperation mit der Abteilung Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Philipps-Universität in Marburg durchgeführt, der für die Durchführung eine Genehmigung durch das Regierungspräsidium Giessen erteilt worden war.

2.1.4 Bestimmung des Lungenvolumens

Die Bestimmung des Organvolumens, welche der Probennahme („sampling“) vorausgeht und für die Ermittlung absoluter stereologischer Parameter benötigt wird, kann bei kleinen Lungen, wie denen von Mäusen, durch Flüssigkeitsverdrängung (nach Scherle W 1970) durchgeführt werden. Sie basiert auf dem Archimedisches Prinzip.

Hierbei wurden die Lungen in einem Messzylinder mit 10%iger Dextranlösung schwebend auf einer Analysenwaage gewogen. Aus der Gewichtszunahme W, die durch die Analysewaage gemessen wurde, und dem spezifischen Gewicht G der

³ Zur Dosisfindung wurden Tiere für 15 Tage jeweils 10 ppm oder 20 ppm NO₂ ausgesetzt. Im Anschluss wurde der signifikante Anstieg von Leukozyten in der BAL der Versuchstiere ausgewertet.

verwendeten Flüssigkeit (1,045 g/ml bei 10% Dextran) ließ sich das Lungenvolumen (V_{Lunge}) nach der Formel berechnen:

$$V_{\text{Lunge}} = W/G \quad (\text{Formel 3})$$

Eine Übersicht über alle verwendeten Formeln enthält Tabelle 6.2

2.1.5 Probennahme nach den Prinzipien des „systematic uniform random sampling“

Das Ziel der Entnahme von Gewebeproben für die quantitativ-histopathologische Analyse ist es, eine für das gesamte Organ repräsentative Stichprobe zu gewinnen. Das *systematic uniform random sampling* (SURS) sieht eine systematische Probenauswahl vor, entsprechend den Stufen des Selektionsprozesses beginnend bei der Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe, des weiteren bei der Gewinnung von Transversalschnitten des zu untersuchenden Organs von Individuen der Versuchsgruppe und der Analyse der durch das Mikrotom erhaltenen Einzelschnitte aus den Transversalschnitten der Organe.

Zu Beginn wurden die Lungen in 2%ige Agar-Agar-Lösung eingebettet und anschließend mit Hilfe eines Gewebeschniders von apikal nach kaudal in 3mm dicke Scheiben geschnitten (3-5 pro Lunge). Die Schnittposition des ersten Schnittes wurde zufällig zwischen 0 bis 3 mm gewählt.

2.1.6 Aufbereitung der Proben für die Lichtmikroskopie

Zur Aufbereitung wurden die Gewebsscheiben mehrmalig mit Puffer gespült, mit 1%igem Osmiumtetroxid in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer nachfixiert und mit halbgesättigtem Uranylacetat zur Stabilisierung der Phospholipide blockkontrastiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe von Ethanol entwässert und in Glykolmethakrylat (Technovit 7100; Kulzer, Heraeus) eingebettet, was gegenüber der Paraffineinbettung den Vorteil hat, dass Schrumpfungsartefakte minimiert werden können, die zu systematischen Fehlern führen. Mit einem Mikrotom 2050 (Reichert, Wien, Österreich) wurden 1 μm dicke Schnitte angefertigt und mit einer Mischung aus Methyleneblau und Azur II (1:2) nach Richardson angefärbt. Zur Bestimmung der Alveolarweiten und Differenzierung des Luftraumes in Alveolen und Ductus wurde für die Schnitte Orceinfärbung verwendet.

Die Aufbereitung der Proben ist im Detail in Tabelle 6.1 beschrieben.

2.2 Mikroskopische Auswertung

2.2.1 Lichtmikroskopie

Die Untersuchung der histologischen Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop (Mikroskop BH-2, Olympus, J), wobei das lichtmikroskopische Bild mittels einer Videokamera auf einen Monitor projiziert und mit Hilfe der für stereologische Analysen konzipierten Software (C.A.S.T.-Grid Version 2.0, Olympus, Albertslund, Dänemark) ausgewertet wurde.

2.2.2 Strukturparameter

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Parenchyms der Lunge, der Alveolen, im Hinblick auf eine Entstehung emphysematöser Veränderungen unter Stickstoffdioxid-Exposition.

Zu Anfang der Auswertung wurden die Testfelder an jedem zu untersuchenden Schnitt mit Hilfe des *systematic uniform random sampling* Verfahrens ausgewählt. Hierbei wurde der Startpunkt jedes Mal links oben außerhalb der zu untersuchenden Strukturen gewählt. Anschließend wurden die Schnitte durch einen Mäanderscan in konstanten Abständen systematisch abgerastert. Der Abstand der Sichtfelder zueinander ließ sich computer-gesteuert individuell einstellen, wobei darauf geachtet wurde, dass für die jeweils seltenere der zu untersuchenden Strukturen pro Lunge mindestens 100 Zählereignisse erfasst wurden.

Im Einzelnen wurden Alveolaroberfläche (S_{alv}), Alveolarweiten (V_{alvw}), *Mean Chord Length* des gesamten Luftraumes (CM) und die Einzelvolumina von Ductus alveolares (V_{duct}) und Alveoli (V_{alv}) sowie Kapillarlumen (V_{kap}) und alveolärem Septengewebe (V_{sept}) als aussagekräftige Parameter anhand verschiedener Methoden der Stereologie bestimmt. Des Weiteren wurde der Anteil an Parenchym (V_{par}), Nichtparenchym (V_{npar}) und Nichtlunge (V_{nlung}) der Schnitte nachvollzogen.

Eine Volumenreduktion des Septengewebes, sowie die Größe der Alveolaroberfläche geben Aufschluss über Existenz und Umfang der Zerstörung von Alveolarwänden, während die Schätzung des volumengewichteten mittleren Alveolarvolumens sowie der *Mean Chord Length* Aussagen über die Vergrößerung des Luftraumes erlauben.

Volumenanteile von Parenchym, Nichtparenchym und Nichtlunge

Am Anfang der Untersuchung stand die Bestimmung der Volumenanteile (Volumendichten V_v). Hierbei wurde ein Testpunkte-System auf den Schnitt projiziert. Die Anzahl der Testpunkte wurde auf 36 pro Sichtfeld festgelegt. Davon waren 4 mittels eines Kreises als Hauptpunkte gekennzeichnet, zu denen jeweils 9 einfache

Punkte gezählt wurden ($9 \times 4 = 36$). Je nachdem, auf welche Struktur ein Punkt fiel, wurde er als Parenchym (Luftraum distal der terminalen Bronchioli, Septum und Kapillaren), Nichtparenchym (Anschnitt terminaler Bronchioli, proximaler Atemwege, Gefäße, Pleura) oder Nichtlunge (Herzanteile, Fettgewebe) gewertet. Um die Analyse möglichst effizient zu gestalten wurden für das Parenchym, das etwa 90% des Lungenvolumens ausmacht, nur die darauf fallenden Hauptpunkte gezählt, die am Ende mit 9 multipliziert wurden. Für Nichtparenchym und Nichtlunge wurden die Hauptpunkte wie alle Punkte einfach gezählt. Auf diese Weise konnte dem großen Anteil an Parenchym Rechnung getragen und die Durchführung der Zählung wesentlich verkürzt werden. Es wurde bei einer Endvergrößerung von 169fach gearbeitet.

Volumenanteil von Luftraum, Kapillarlumen und Septengewebe

Zur Differenzierung des Gewebes wurden die Volumendichten und Gesamtvolumina von parenchymalem Luftraum, Kapillarlumen und Septengewebe bestimmt. Bei einer Endvergrößerung von 852fach wurde die Analyse gleichermaßen wie oben beschrieben mit einem Testpunkte-System vorgenommen. Der Luftraum wurde als Kompartiment mit dem größten Volumenanteil (etwa 90% des Parenchyms) über Hauptpunkte gezählt, Kapillarlumen und Septengewebe mittels der einfachen Punkte. Um zu berücksichtigen, dass die eben erwähnten Komponenten Teile des Lungenparenchyms sind, musste Gleichung 2 zur Berechnung der absoluten Volumina folgendermaßen erweitert werden (Beispiel $V(\text{Sept.Par})$):

$$V(\text{Sept}) = V_v(\text{Sept,Par}) \times V_v(\text{Par,Lung}) \times V(\text{Lung}) \quad (\text{Formel 4})$$

wobei $V_v(\text{Sept,Par})$ die ermittelte Volumendichte des Septengewebes ist.

Volumenanteile der Ductūs alveolares und Alveoli

Um einen genaueren Eindruck vom Verhältnis zwischen Ductūs und Alveolen anteilig am gesamten Luftraum distal der terminalen Broncholi zu bekommen, wurde wie zuvor mit einem einfachen Testpunkte-System bei 425facher Endvergrößerung die jeweilige Volumendichte bestimmt und gemäß Gleichung 4 in absolute Volumina umgerechnet.

Alveolaroberfläche

Die Größe der Oberfläche kann aus der Multiplikation von Oberflächendichte und Referenzvolumen (hier Luftraum) gewonnen werden, wobei die Oberflächendichte die Fläche einer Struktur innerhalb eines Referenzvolumens darstellt (Howard CV und Reed MG 1998).

Zur Ermittlung der Oberflächendichte wird ein kombiniertes Punkte-Linienraster auf den zu untersuchenden Schnitt angewandt und folgende zwei Zählereignisse erhoben:

- Schnittpunkte zwischen Linienraster und Alveolarwand
- Testpunkte, die den Luftraum (Referenzraum) treffen

Die Oberflächendichte ($S_v[y;ref]$) errechnet sich dann aus:

$$S_v(Y, ref) = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^n I_i}{l(p) \cdot \sum_{i=1}^n P_i} \quad (\text{Formel 5})$$

l/p ist die Länge der Testlinie pro Rasterpunkt (Howard CV und Reed MG 1998) und damit abhängig von der zur Analyse verwendeten Endvergrößerung.

Die Auswertung wurde bei 853facher Endvergrößerung vorgenommen.

Mean Chord Length (CM)

Die CM ist ein wichtiger Parameter für die Beurteilung der mittleren freien Weglänge der terminalen Lufträume. Sie erfasst den mittleren Abstand zwischen benachbarten Alveolarsepten, ohne die Alveolarwand mit ein zu beziehen. Dementsprechend ist sie unabhängig von der Dicke der Alveolarwand.

Zur Auswertung wurde ein kombiniertes Testsystem aus Punkten und Testlinien verwendet. Die Anzahl der Testpunkte wurde auf 36 pro Sichtfeld festgelegt, die der Linien ebenso, da sich diese an die Punkte anschlossen; l/p erreichte einen Wert von 45 μm . Jeder Testpunkt, der auf eine Gasaustauschregion fiel, wurde gezählt. Für die Bestimmung der CM wurden die Wände der Gasaustauschregion zu beiden Seiten markiert. Die CM beinhaltet sowohl Alveolen als auch Luftwege distal der terminalen Broncholi.

Sie errechnet sich aus:

$$CM = \frac{l/p \cdot \sum_{i=1}^n P_i}{\frac{\sum_{i=1}^n I_i}{2}} \quad (\text{Formel 6})$$

Die Messung wurde bei einer Endvergrößerung von 853fach vorgenommen.

Alveolarweiten

Als Maß zur Bestimmung und Beurteilung der Alveolarweiten wird das mittlere volumengewichtete Volumen (\bar{V}_v) herangezogen. Hierbei wird die mittlere Größe einer Population von Objekten – hier Alveolen – nicht anhand ihrer numerischen Verteilung ermittelt, sondern gewichtet nach deren Volumen.

Zur Anwendung kommt die point-sampled-intercept-Methode (PSI) (Gundersen HJG und Jensen HB 1985), die folgende zwei Schritte umfasst (siehe Howard CV und Reed MG 1998).

1. Es werden Partikel im direkten Verhältnis (direkt proportional) zu ihrem Volumen ausgewählt. Dabei wird ein Partikel für die Auswertung herangezogen, wenn ein Testpunkt auf das Profil eines Partikels fällt.
2. Das Volumen eines jeden gewählten Partikels wird abgeschätzt nach der Formel:

$$\bar{V}_v = \frac{\pi}{3} \cdot l_0^3 \quad (\text{Formel 7})$$

wobei l_0 die Länge des Abschnittes einer isotropen Testlinie zwischen den Grenzen des jeweiligen Partikelquerschnittes ist, die durch den Testpunkt geht.

In Erweiterung der obigen Formel ergibt sich das mittlere volumengewichtete Partikelvolumen der Alveolen nach einer Reihe von l_0 Messungen aus:

$$\bar{V}_v = \frac{\pi}{3} \cdot l_0^3 = \frac{\pi}{3 \cdot n} \cdot \sum_{i=1}^n l_{0,i}^3 \quad (\text{Formel 8})$$

wobei n die Gesamtzahl der „point sampled“ linearen Abschnitte (intercepts) und l_0^3 die 3. Potenz von l_0 ist.

Wird l_{0i} in einer „isotropic uniform random direction“ gemessen, ergibt sich hieraus eine von systematischen Fehlern freie („unbiased“) Schätzung des Partikelvolumens.

Die Analyse wurde wie folgt vorgenommen. Entlang der durch Punkte (Punkteabstand = 1 cm) regelmäßig unterbrochenen Linien des Testsystems wurden die Querschnitte der Alveolen durch entsprechende Markierungen gemessen. War die Alveolenöffnung angeschnitten, wurde eine imaginäre gerade Linie zwischen den beiden Enden der Öffnung, die durch die Orceinfärbung besonders hervorgehoben wurden, gezogen (nach Massaro GD & Massaro D 1992) und eine Markierung am Scheitelpunkt der Linie vorgenommen.

Mit Hilfe der Software des an das Lichtmikroskop angeschlossenen Computers wurde

$\bar{V}_v(\text{alw})$ nach erfolgter Analyse des gesamten Objektes entsprechend Formel 8 berechnet.

Die Messung wurde bei einer Endvergrößerung von 853fach vorgenommen.

2.3 Datenauswertung und Statistik

Alle Daten sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Bei der graphischen Darstellung in Form von box plots wurden außerdem Median und 5/95ste Perzentile abgebildet.

Die explorative Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Software SigmaStat 3.0 (Jandel Scientific, Erkrath). Eine statistische Analyse zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen wurde mit Hilfe der Varianzanalyse „Two way ANOVA“

vorgenommen, sofern eine Normalverteilung der Daten und Varianzgleichheit vorlag ($p > 0,1$). Diese Bedingungen waren für alle getesteten Parameter gegeben.

Bei Ablehnung der Nullhypothese wurde zur Beurteilung des Einflusses der einzelnen Faktoren (Alter, Exposition, Alter innerhalb der NO₂-Gruppen, Alter innerhalb der Raumlufgruppen, Exposition innerhalb der Jungtiere, Exposition innerhalb der Alttiere) auf die jeweiligen Untersuchungsparameter Mehrfachvergleiche posthoc nach der Holm-Sidak-Methode durchgeführt. Für α -Fehler wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ akzeptiert.

3. Ergebnisse

Ziel der Untersuchung war es, die Einflüsse von Alter und Expositionsdauer auf eine mögliche Emphysementwicklung nach NO₂-Exposition zu quantifizieren. Daneben wurde überprüft, ob an den Lungen der Kontrolltiere eine Entwicklung im Sinne eines physiologischen Altersemphysems zu beobachten war.

Einer Gruppe von Mäusen, die über 25 bzw. 55 Tage NO₂ ausgesetzt war, wurde jeweils eine Kontrollgruppe mit Mäusen gegenübergestellt, die über 25 bzw. 55 Tage Raumlufte ausgesetzt war. Darüber hinaus wurde eine Gruppe mit 55 Tagen Expositionszeit über weitere vier Wochen Raumlufte ausgesetzt, um eine mögliche Erholung der Lungen nach stattgehabter Exposition zu überprüfen. Des Weiteren wurden alle Raumluftegruppen untereinander verglichen, um eine altersbedingte Modifikation der Emphysementwicklung beurteilen zu können.

Zeichen einer Emphysementwicklung sind zum einen die Erweiterung der Gasaustauschräume, das so genannte „*airspace enlargement*“ zum anderen der Septenverlust. Zum Nachweis eines „*airspace enlargement*“ dienen die Bestimmung des volumen-gewichteten mittleren Volumens der parenchymalen Lufträume (Alveolarweiten) und die *Mean Chord Length*. Ein Septenverlust wird über den Verlust an Alveolaroberfläche und Septenvolumen nachgewiesen.

Die Differenzierung der Anteile von Alveole und Ductus erfolgte über die Bestimmung der jeweiligen Volumina.

Zur Errechnung absoluter Werte und der Differenzierung zwischen Lungengewebe, das direkt am Gasaustausch beteiligt ist und solchem, das vorwiegend dem Gastransport dient, wurden zu Beginn Organvolumen, Körpergewicht, Lungenparenchym und Nichtparenchym erfasst.

Die Ergebnisse der Auswertungen sind in den folgenden Tabellen 6.3-6.6 und Abbildungen 1-11 aufgezeichnet.

3.1 Körpergewicht und Organvolumen

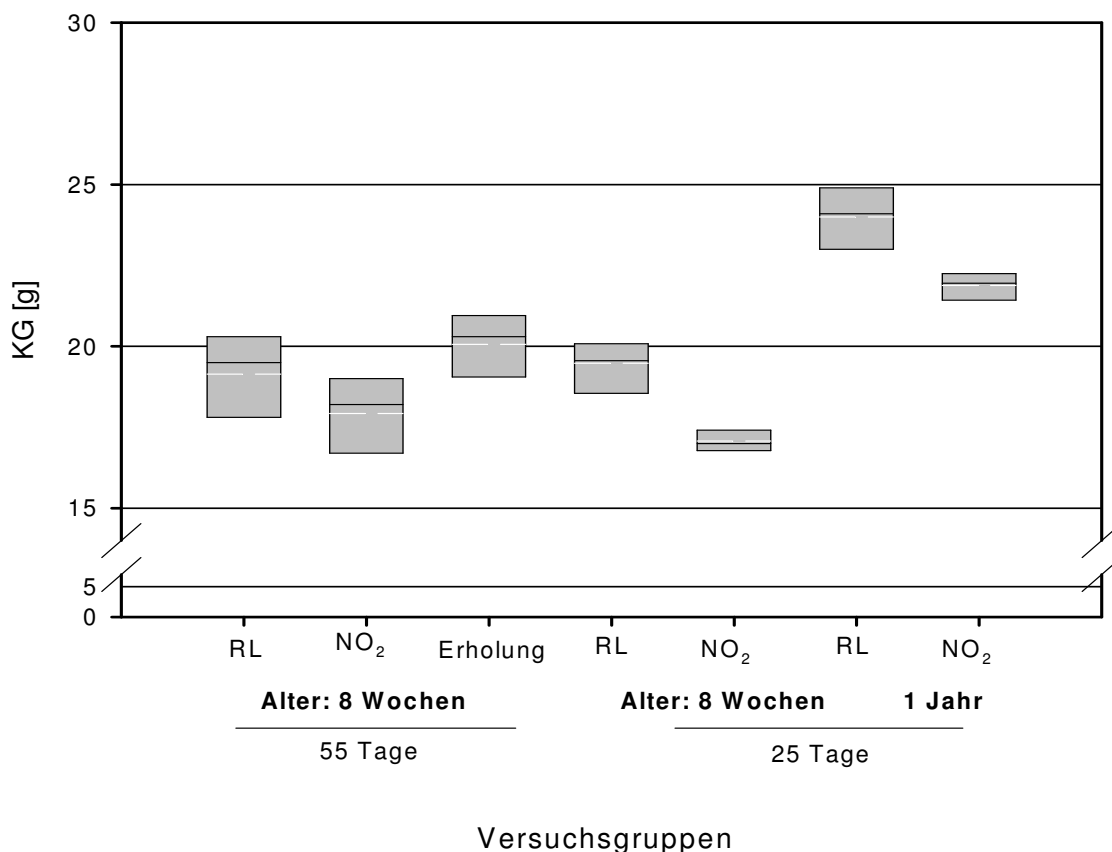
Die NO₂-Gruppen wiesen nach der Exposition ein niedrigeres Körpergewicht auf als die jeweiligen Kontrollgruppen (Abb. 1). Das Körpergewicht der Expositions-Gruppe mit 55-tägiger Expositionszeit lag durchschnittlich 6,4% (mit anschließender Erholungszeit 4,8%), dasjenige der Jungtiere mit 25-tägiger Expositionszeit im Durchschnitt 12,4% signifikant unter den Werten der jeweiligen Kontrollgruppe. Die Gruppen mit den älteren Tieren wiesen das signifikant höchste durchschnittliche Körpergewicht auf, wobei auch hier die Versuchstiere leichter (8,9%) waren als die Kontrolltiere.

Die durch Flüssigkeitsverdrängung erhaltenen Lungenvolumina der NO₂-Gruppen zeigten eine signifikante ($P < 0,01$) Größenzunahme im Vergleich zum Volumen der Kontrolllungen; nach 55-tägiger Exposition lagen sie 30,2% über dem Durchschnittsvolumen der Kontrollgruppe; nach anschließender Erholungszeit war noch ein Unterschied von 16,5% zu verzeichnen. Unter 25-tägiger Exposition lagen die Volumina der Jungtiere 25,0%, die der älteren Tiere 10,9% über den Werten der Kontrolltiere.

Die Unterschiede der Lungenvolumina waren zwischen den Altersgruppen signifikant ($P < 0,0001$). Die Gruppen der älteren Tiere erzielten gegenüber allen anderen Gruppen die höchsten Werte (siehe Abb. 2).

Abbildung 1:

Körpergewicht



Körpergewicht der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach einer vierwöchigen Erholungsphase.
 schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

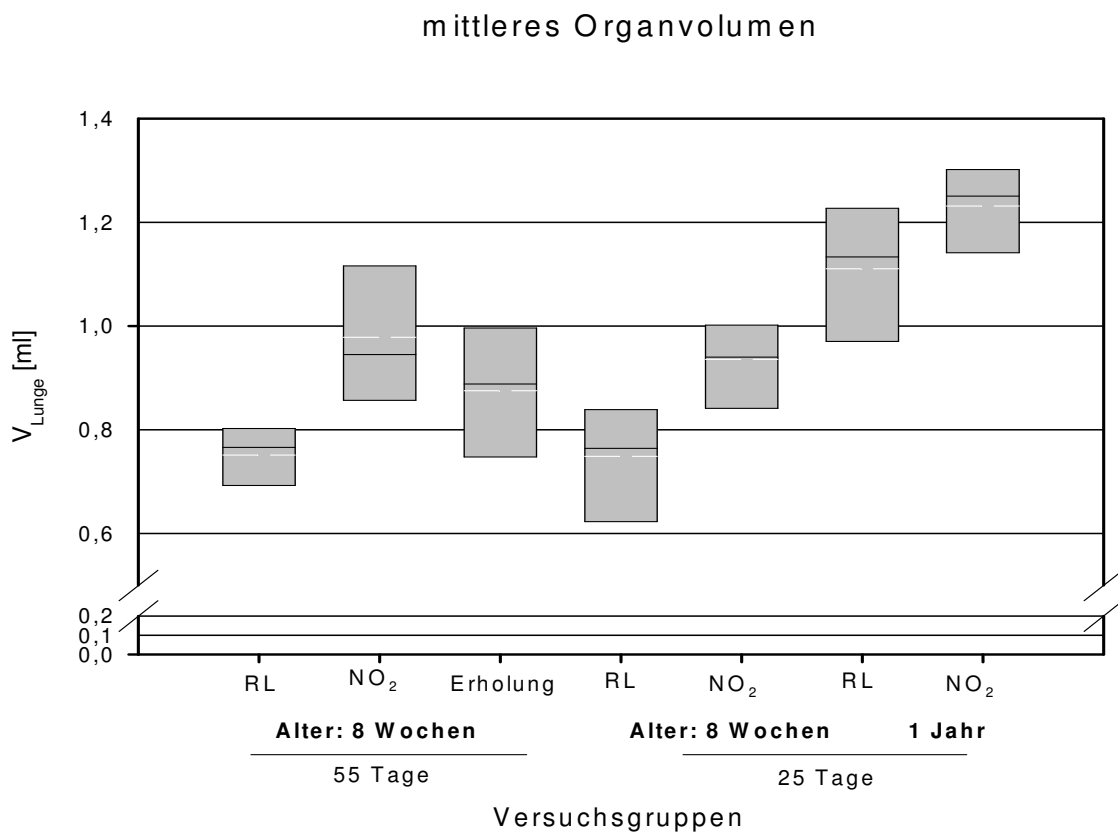
Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumlufgruppen, $P \leq 0,05$

Signifikanz für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte sind signifikant für die Auswirkung der Exposition in Abhängigkeit vom Faktor Alter, $P \leq 0,003$

Abbildung 2:



mittleres Organvolumen der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach

Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase.

schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

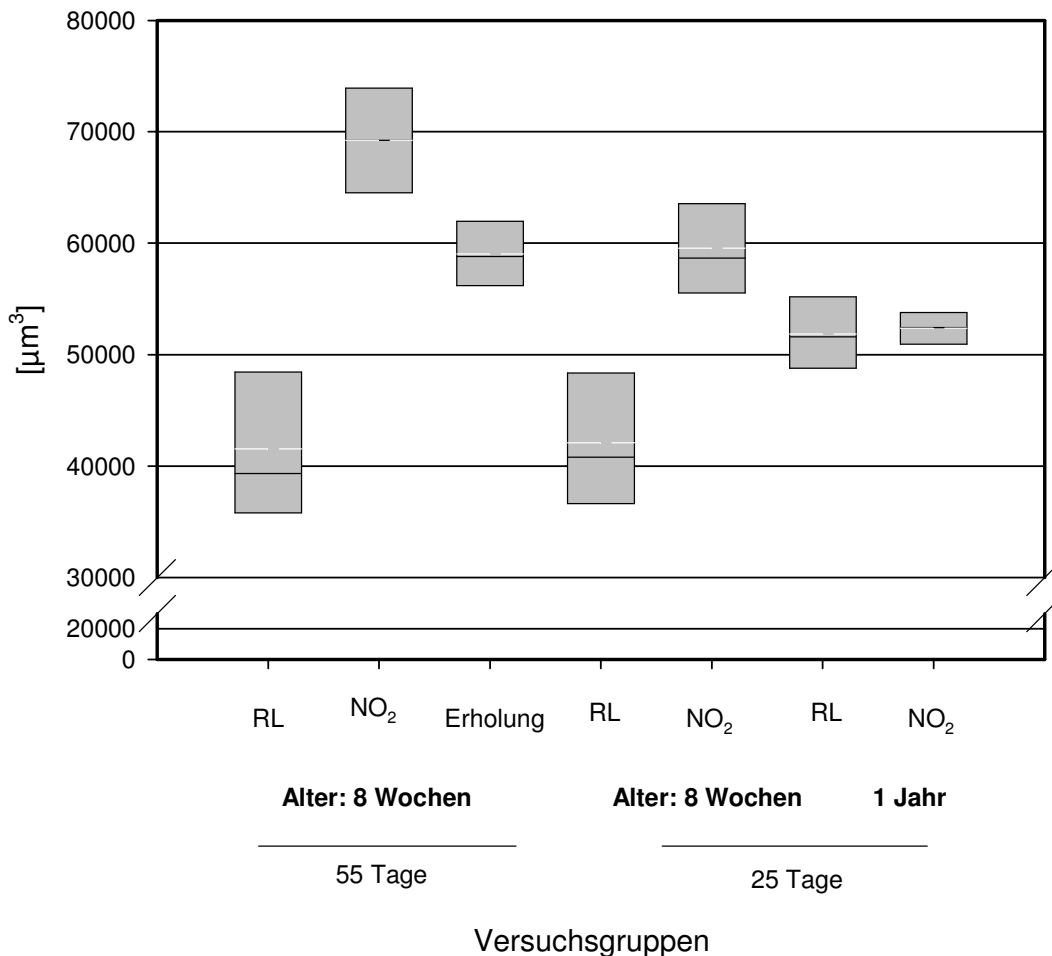
3.2 Volumen-gewichtetes mittleres Volumen der parenchymalen Lufträume

Die Alveolarweiten waren in den Versuchsgruppen der Jungtiere signifikant erhöht ($P < 0,0001$). Entsprechend der Expositionsdauer waren die höchsten Werte mit 66,6% über den Werten der Kontrolltiere in der NO_2 -Gruppe nach 55 Tagen Exposition zu finden, gefolgt von der NO_2 -Gruppe der jungen Mäuse mit 25tägiger Exposition (um 41,5% erhöht) und den Expositionstieren mit anschließender Erholung (um 42,1% erhöht). Eine Verlängerung der Expositionszeit erhöhte demnach die Wirkung des NO_2 , während die beobachteten Veränderungen durch eine anschließende Phase, in der keine Exposition stattfand, teilweise reversibel waren (Abb. 3).

Innerhalb der alten Tiere gab es keinen signifikanten Expositionsbedingten Unterschied. Das volumen-gewichtete mittlere Volumen der parenchymalen Lufträume der Versuchstiere war gegenüber dem der Raumlufftiere mit einer nur 1%igen Erhöhung nahezu unverändert. Die Kontrollgruppe der älteren Tiere zeichnete sich gleichzeitig durch den höchsten Wert innerhalb aller Raumluffgruppen aus.

Abbildung 3:

Volumen-gewichtete mittlere Volumen der parenchymalen Lufträume



Volumengewichtete mittlere Volumen der parenchymalen Lufträume der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach einer vierwöchigen Erholungsphase.

schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

Bei den Jungtieren Signifikanz für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte der $V_v(alw)$ sind signifikant für die Auswirkung der Exposition in Abhängigkeit vom Faktor Alter, $P \leq 0,001$

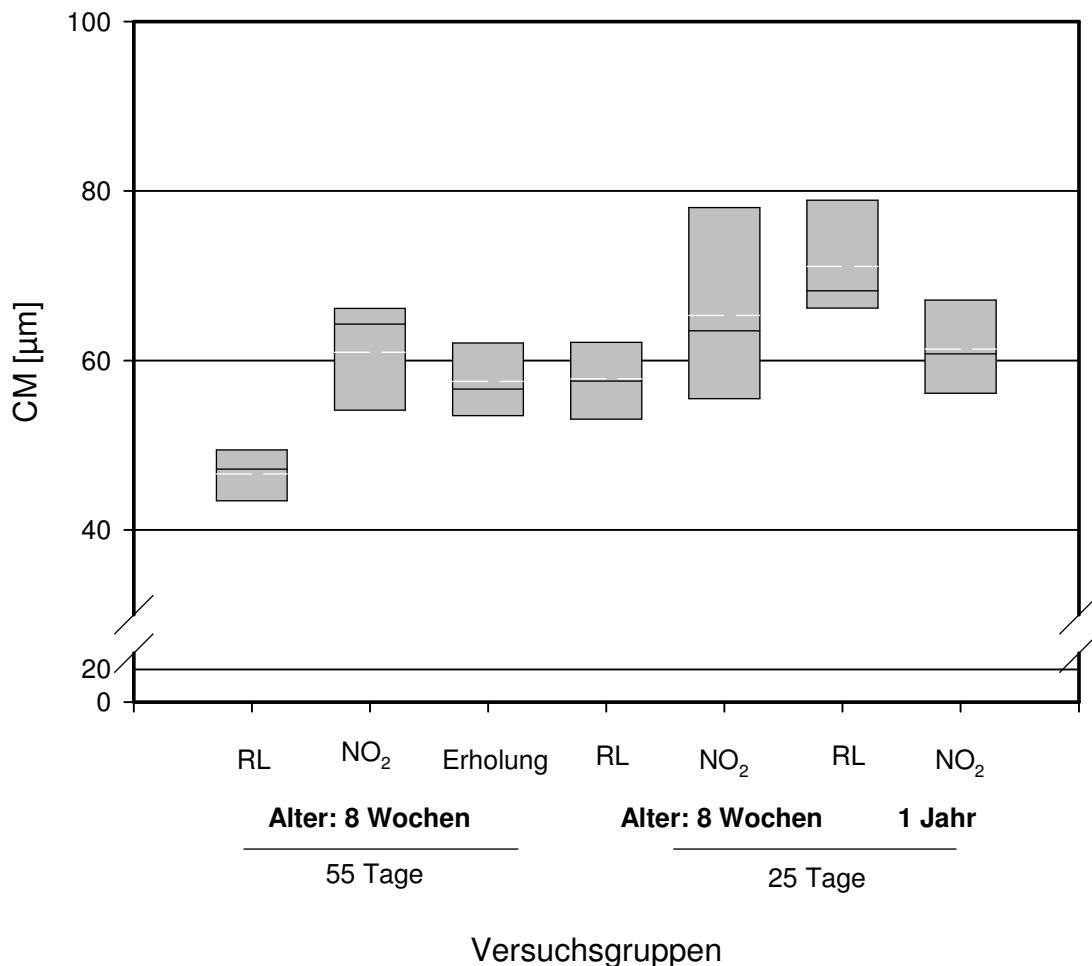
3.3 Mean Chord Length

Ähnliche, wenn auch nicht signifikante Tendenzen bot die Beurteilung der *Mean Chord Length (CM)*. Bei den jungen Versuchstieren wurde eine Erhöhung der *Mean Chord Length* gemessen. Nach 55 Tagen Exposition lagen die Werte der Versuchstiere 30,9% über dem Kontrollwert, nach 25 Tagen Exposition 12,9% höher als ihre Vergleichsgruppe mit Raumluft (Abb. 4).

In den Gruppen der alten Tiere hingegen manifestierte sich die insgesamt größte *CM* bei den Raumlufttieren, nicht bei den NO_2 -Tieren (-13,7% unter dem Kontrollwert).

Abbildung 4:

Mean Chord Length (CM)



Mean Chord Length (CM) der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO_2 bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase. schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit

Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Raumlufgruppen, P≤0,05

Tabellenwerte der CM sind signifikant für Faktor Alter im Vergleich aller Gruppen, P≤0,05

3.4 Alveolar- und Ductalvolumen

Die Differenzierung des Luftraumes in Alveolar- und Ductalvolumen dient der Erkennung einer möglichen Umverteilung der Volumenanteile bzw. einer Volumenzunahme des gesamten Luftraumes nach NO₂-Applikation.

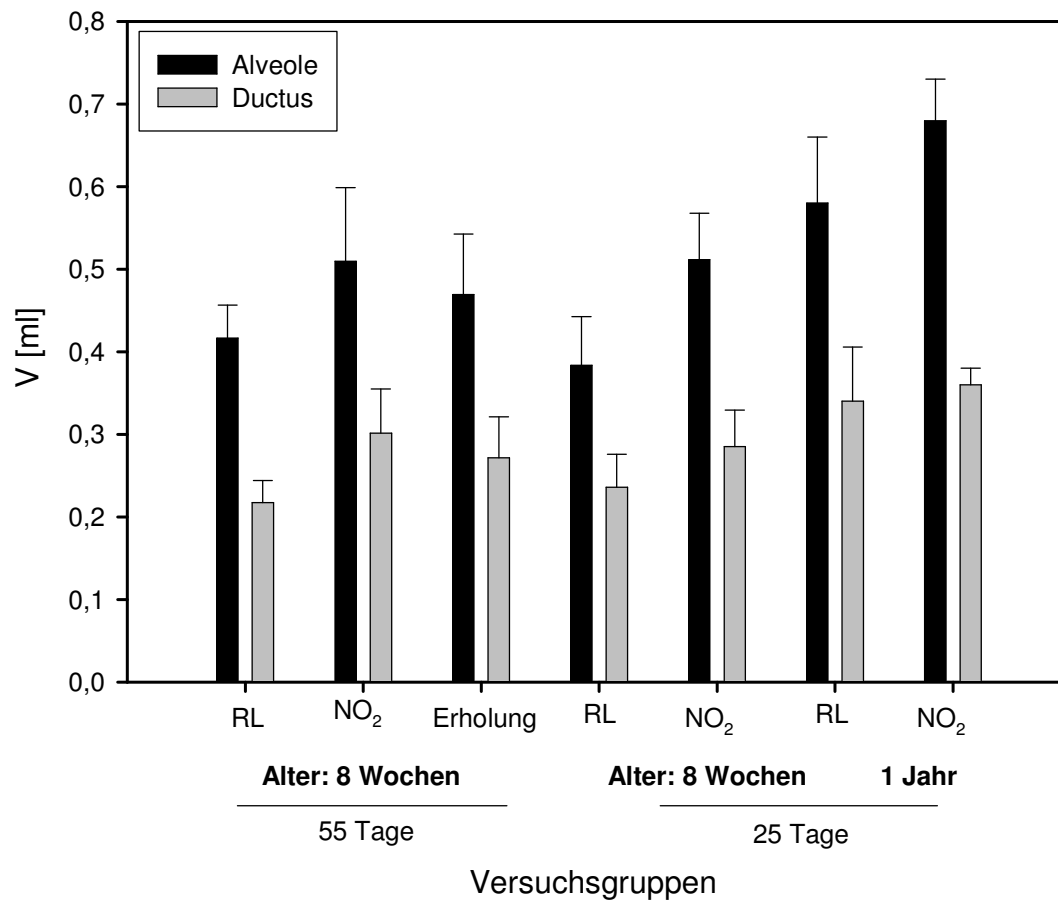
Es gab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Volumendichten von Ductus und Alveole im Vergleich der Versuchstiere mit ihren entsprechenden Kontrollgruppen. Ebenso wenig gab es altersbezogene signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen (Abb. 5).

Im Rahmen der Auswertung der Septenvolumina wurde das Gesamtvolumen des Luftraumes bestimmt. Es kam zu einer signifikanten Erhöhung des Luftraumes (P<0,002) bei den jungen Versuchsgruppen. Innerhalb der Gruppen der 1,5 Jahre alten Tiere erwies sich die Differenz zwar als nicht signifikant, dennoch fiel das Lungenvolumen der Versuchstiere größer aus als das der Kontrolltiere.

Die Gesamtvolumina der alveolären Lufträume und der Lufträume der Alveolargänge zusammen stiegen auch hier in allen Gruppen signifikant nach Exposition von NO₂ (P<0,001). Nach 55-tägiger Exposition lagen die Werte durchschnittlich 22,4%, nach 25-tägiger Exposition 33,3% über den Kontrollwerten. Anders als bei der *Mean Chord Length* und dem volumen-gewichteten mittleren Volumen der parenchymalen Lufträume zeigte sich demnach ein stärkerer Effekt nach 25 Tagen Exposition gegenüber 55 Tagen Exposition. Die Raumlufgruppen der Jungtiere (Gruppen 2 und 4) zeichneten sich durch die niedrigsten Werte aus, gefolgt von der Gruppe mit anschließender Erholungszeit (Gruppe 5). Eine Erholungsphase wirkte sich auch auf diesen Parameter positiv, im Sinne einer Annäherung der Volumina an die Kontrollwerte, aus (12,8% höher).

Die älteren Tiere zeigten die signifikant (P<0,001) größte Zunahme an Alveolar- und Ductalvolumen (siehe Tabelle 6.4), wobei die Expositionsgruppe durchschnittlich 18,9% größere Alveolarvolumina erreichte als die Kontrollgruppe.

Eine Verschiebung der Volumenanteile zu Gunsten der Ductus in den Expositionsgruppen konnte nicht gefunden werden.

Abbildung 5:**Alveolar - und Ductalvolumina**

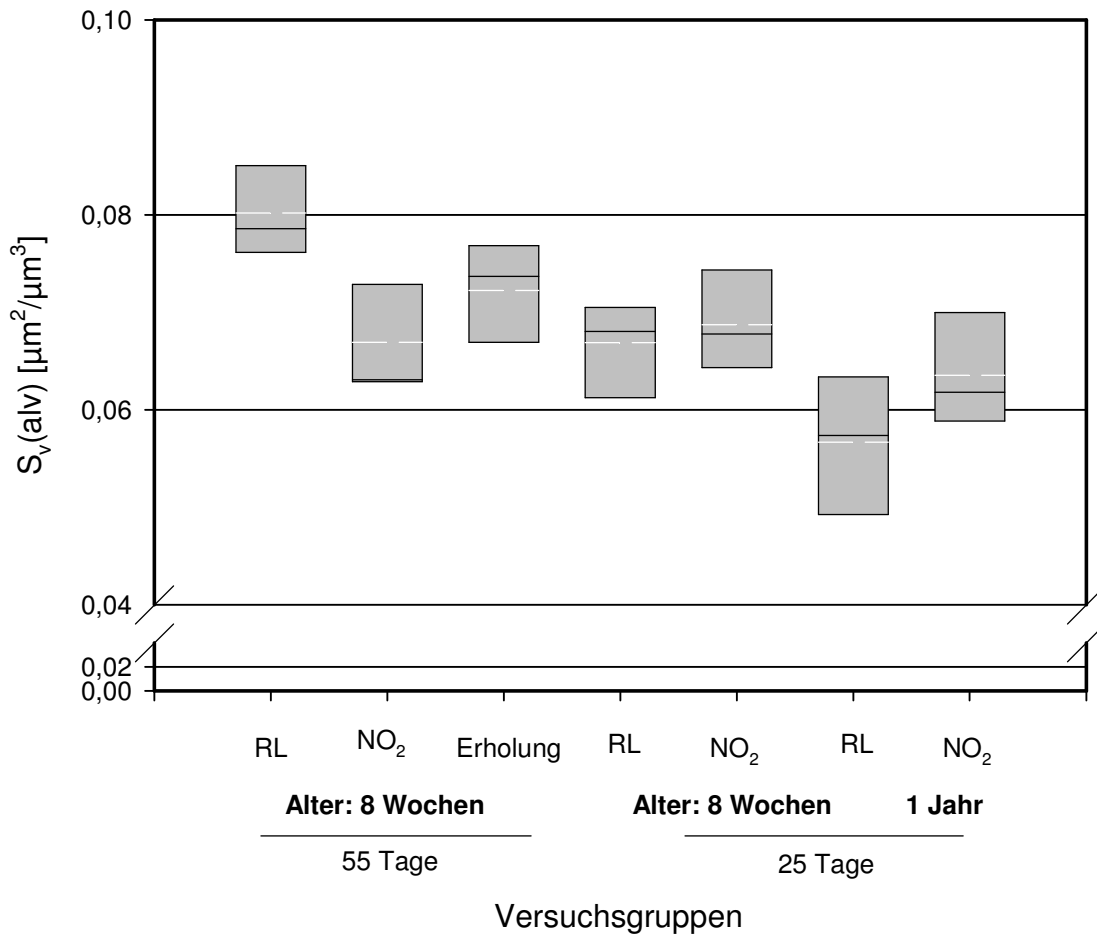
Alveolar- und Ductalvolumina der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase. schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

3.5 Oberflächendichte

Die Entwicklung der Oberflächendichte war nicht einheitlich (Abb. 6). In der Versuchsgruppe mit den jungen Tieren, die über 55 Tage NO₂ exponiert waren, verringerte sie sich gegenüber den Kontrolltieren nicht signifikant (-16,5%). Dagegen war die Oberflächendichte bei den Jungtieren mit 25tägiger Exposition gegenüber ihrer Referenzgruppe sehr gering erhöht (2,8%, signifikant), ebenso in der Versuchsgruppe der älteren Tiere (12,1%) gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Exposition.

Mit Bezug auf den Altersunterschied war die Oberflächendichte der älteren Mäuse gegenüber den Jungtieren signifikant erniedrigt ($P < 0,002$).

Abbildung 6:**Oberflächendichte**

Oberflächendichte der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase.
 schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit

Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

Bei den Jungtieren Signifikanz für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Die Oberflächendichte gibt an wie viel Gasaustauschoberfläche pro Volumeneinheit zur Verfügung steht und wird somit auch durch Veränderungen im Lungenvolumen beeinflusst. Um die tatsächlich zur Verfügung stehende Austauschoberfläche beurteilen zu können, wird aus der Oberflächendichte und dem jeweiligen Lungenvolumen der Tiere die Gesamt-Alveolaroberfläche als absoluter Parameter errechnet.

3.6 Alveolaroberfläche

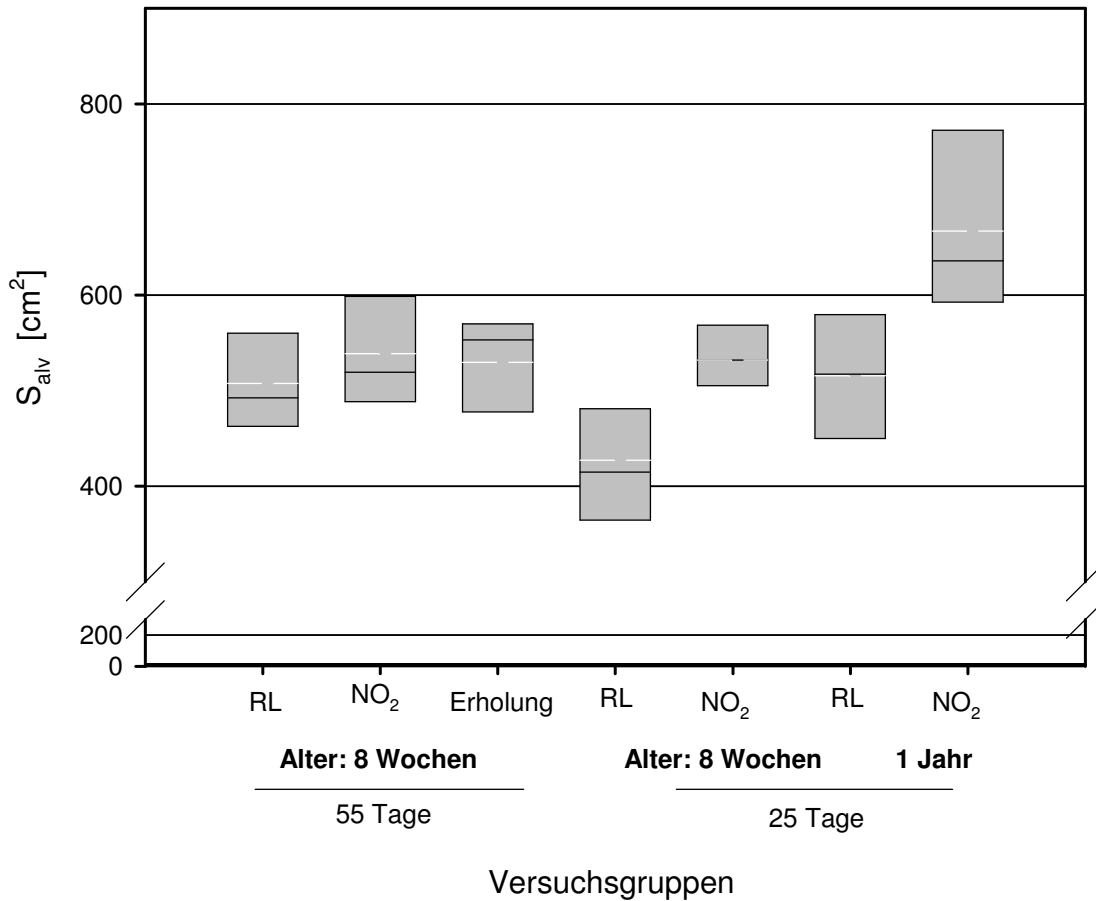
Die Alveolaroberfläche der Expositionstiere war in allen Gruppen größer als die der Raumlufttiere, nach 55-tägiger Exposition 6,1%, nach 25-tägiger Exposition 24,6% über den Werten der Kontrolltiere (siehe Abb. 7, Tabelle 6.3).

Die Alveolaroberflächen der älteren Expositionsgruppe erreichten im Vergleich die höchsten Werte (29,4% über den Werten der Kontrolltiere). Dieser Unterschied innerhalb der Altersgruppen ließ sich als signifikant ($P < 0,007$) einstufen. Auch im Vergleich der Kontrollgruppen untereinander war die Alveolaroberfläche der älteren Raumlufttiere größer als die der Jungtiere.

Die gewichtsspezifische Betrachtung brachte ähnliche Verteilungsverhältnisse (Abb. 8).

Abbildung 7:

Alveolaroberfläche



Alveolaroberfläche der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase. schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

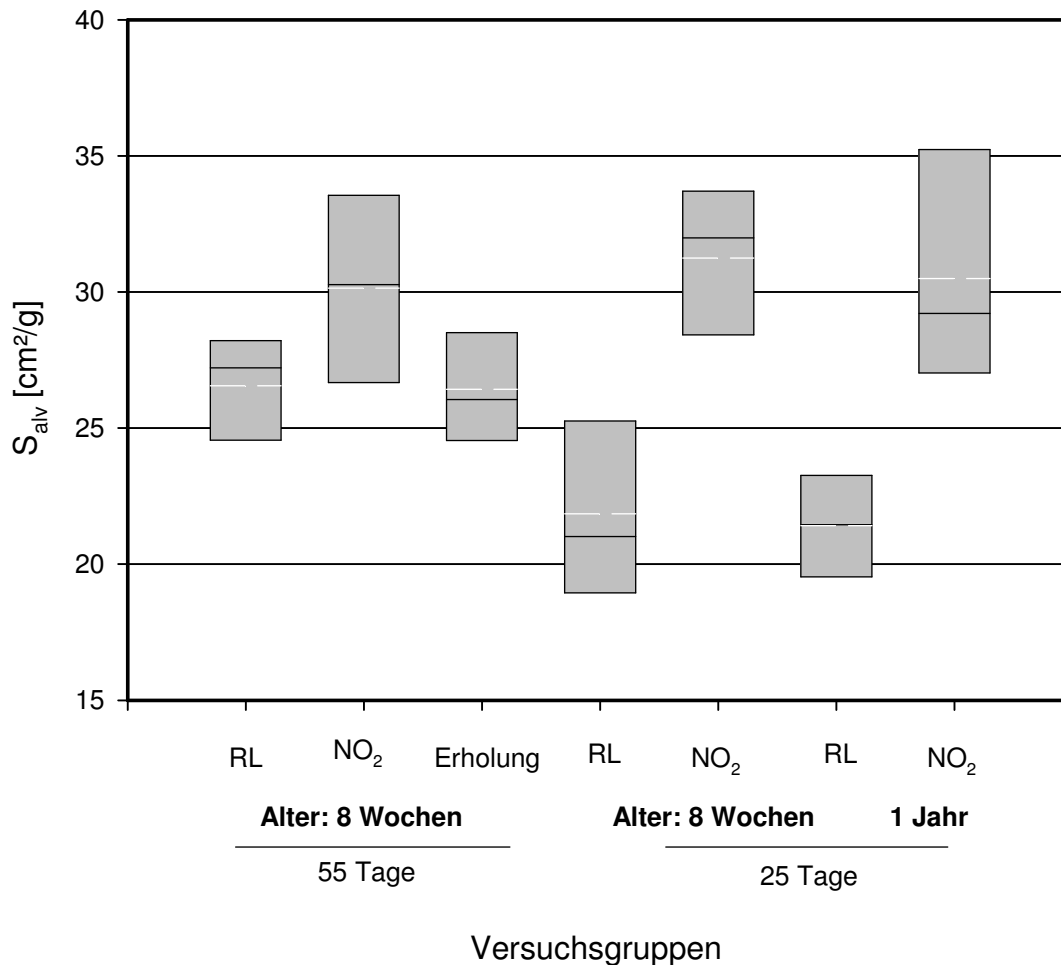
25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen,

$P \leq 0,05$

Bei 1 Jahr alten Tieren Signifikanz für Faktor Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Abbildung 8:**Gewichtsspezifische Alveolaroberfläche**

gewichtsspezifische Alveolaroberfläche der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase.

schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

Bei den 1 Jahr alten Tieren Signifikanz für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte sind signifikant für die Auswirkung der Exposition in Abhängigkeit vom Faktor Alter, $P \leq 0,003$

3.7 Septenvolumen

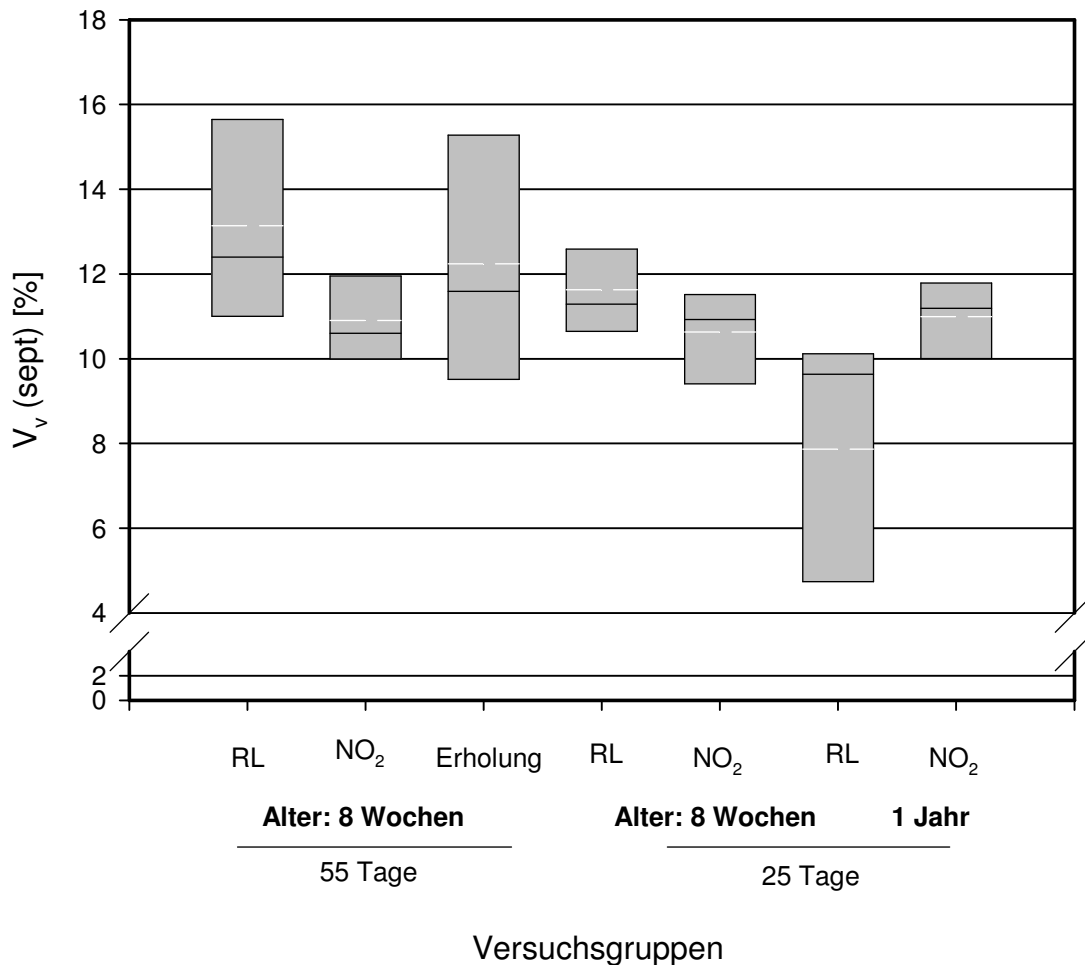
Um die Gasaustauschbarriere umfassender beurteilen zu können, wurden die prozentualen Volumenanteile sowie die Gesamtvolumina des Septengewebes und der Kapillarlumina bestimmt (siehe Tabelle 6.5). Für die Fragestellung der Arbeit ist das Kapillarlumen aber von untergeordneter Bedeutung und wird dementsprechend nicht näher betrachtet.

Die ermittelten Volumendichten des Septengewebes ließen bei den Jungtieren eine Verringerung der Alveolarsepten der NO₂-Gruppen gegenüber den Kontrollen vermuten (Abb. 9).

Dies bestätigte sich bei der Betrachtung der absoluten Volumina nicht (Abb. 10). Hier zeigte sich im Gegenteil, dass das Septengewebe aller NO₂-Gruppen gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen signifikant ($P < 0,001$) erhöht war, (6,7% nach 55-tägiger, 18,4% nach 25-tägiger Exposition der Jungtiere, 27,7% bei den älteren Versuchstieren) eine Tendenz, die sich bei der Beobachtung gewichtsspezifischer Daten verstärkte (14,2% nach 55-tägiger, 35,4% nach 25-tägiger Exposition der Jungtiere, 40,2% bei den älteren Versuchstieren) (Abb. 11).

Die Gruppen der alten Mäuse zeigten sowohl bei den Raumluf- ($P < 0,034$) als auch den Versuchstieren ($P < 0,00001$) ein signifikant erhöhtes Septenvolumen gegenüber den Jungtieren.

Ebenso war eine signifikante ($P < 0,002$) altersbedingte Differenz in der Reaktion auf die Exposition zu verzeichnen. Die älteren Expositionstiere reagierten sensibler, d.h. mit einer signifikant höheren Zunahme des Septengewebes als die jungen Expositionstiere.

Abbildung 9:**Volumendichte des Septengewebes**

Volumendichte des Septengewebes der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach einer vierwöchigen Erholungsphase.

schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

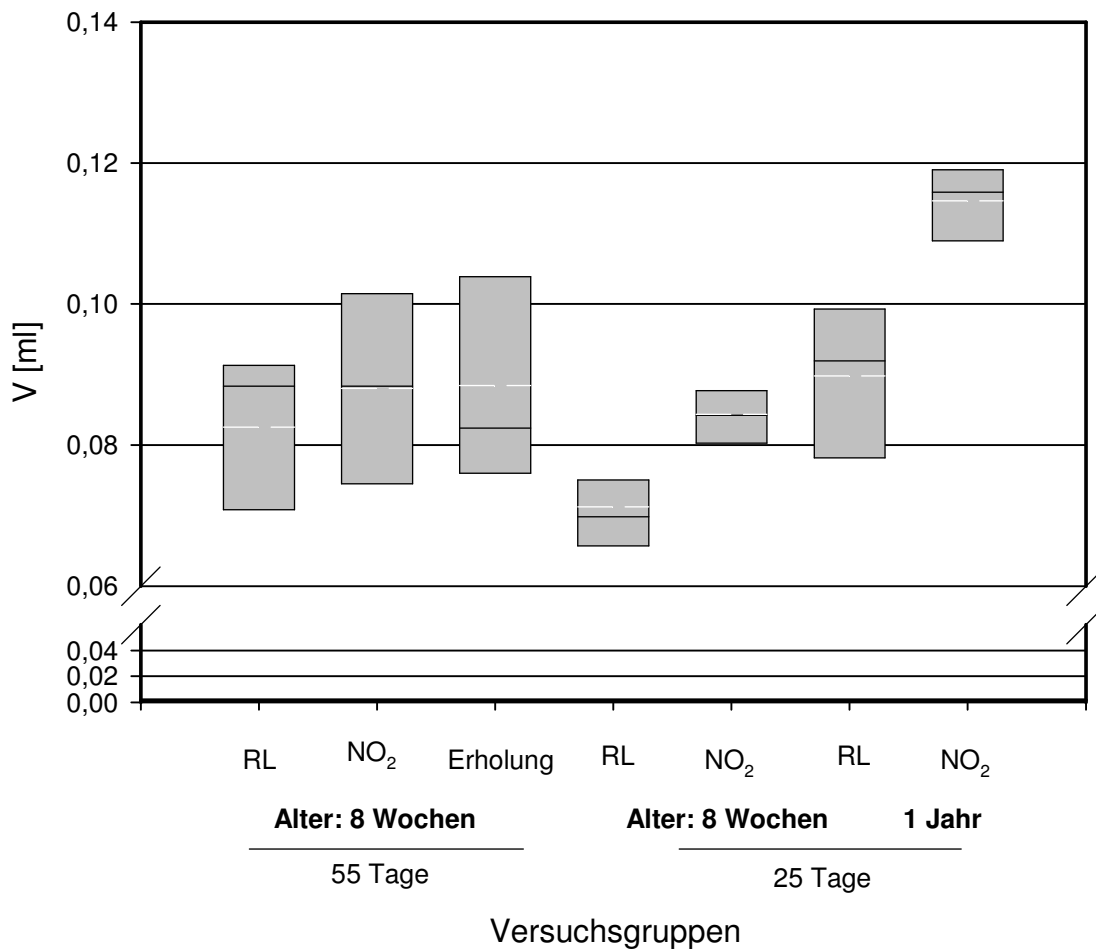
Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte von $V_v(\text{sept}/\text{par})$ sind signifikant für Faktor Alter im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,035$

Abbildung 10

Gesamtvolumen des Septengewebes



Gesamtvolumen des Septengewebes der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase.

schwarze durchgehende Linie = Median weiße unterbrochene Linie = Mittelwert

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

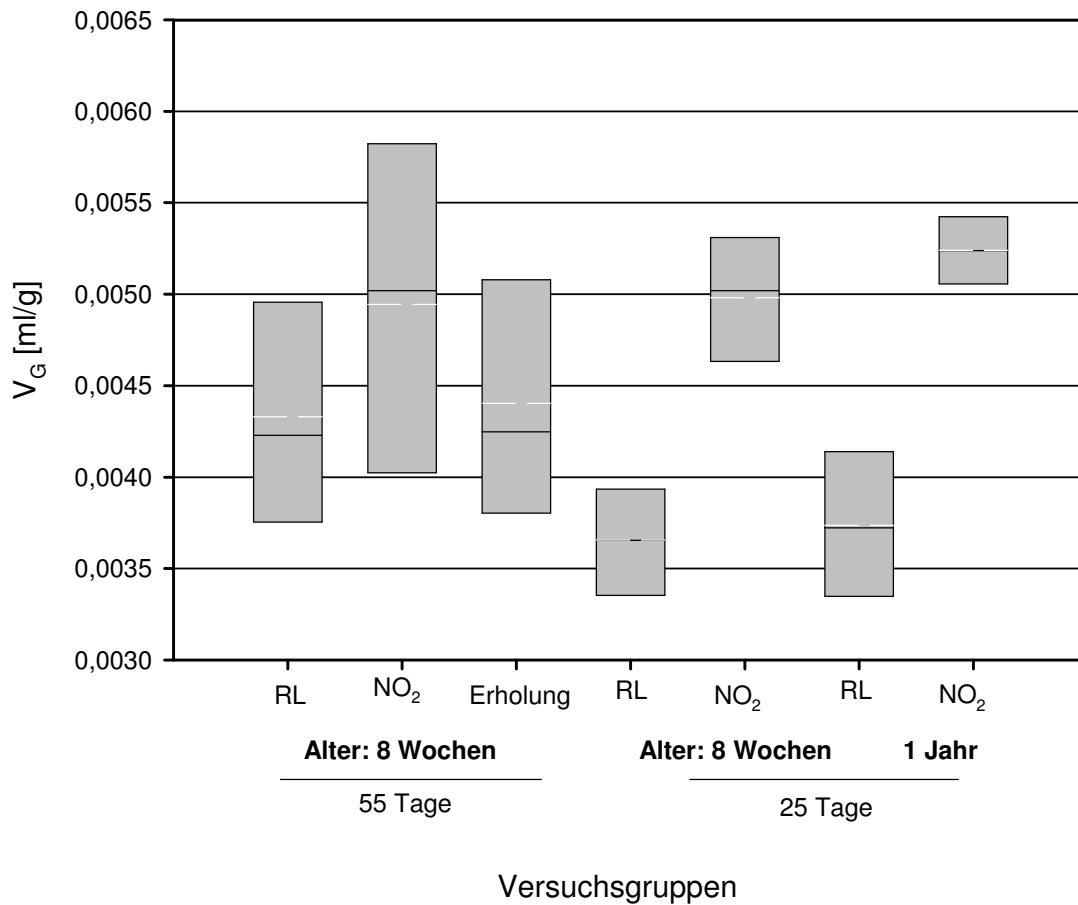
Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

Signifikanz für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte sind signifikant für Faktor Alter im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,024$

Tabellenwerte sind signifikant für Faktor Exposition im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,037$

Abbildung 11:**Gewichtsspezifisches Septenvolumen**

gewichtsspezifisches Septenvolumen der Versuchsgruppen bei Ende der Expositionszeit nach Exposition mit Raumluft (RL), NO₂ bzw. nach eine vierwöchigen Erholungsphase.

schwarze durchgehende Linie = Median
Mittelwert

weiße unterbrochene Linie =

25./75. Perzentile = obere/untere Begrenzung

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Signifikanz für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

Bei den 1 Jahr alten Tieren Signifikanz für Faktor Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte sind signifikant für die Auswirkung der Exposition in Abhängigkeit vom Faktor Alter, $P \leq 0,003$

3.8 Parenchym/Nichtparenchym

Um absolute Werte aus den stereologisch ermittelten Prozentwerten zu erhalten, ist eine Verrechnung mit dem absoluten Lungenvolumen notwendig. Das durch Flüssigkeitsverdrängung ermittelte Organvolumen muss sowohl von den Gewebeanteilen, die nicht zur Lunge zählen (bspw. Herz, Thymus) bereinigt werden, als auch den Lungenabschnitten, die nicht zur Gasaustauschfläche zählen wie z.B. die Hauptbronchien und großen Gefäße. Hierfür wurden im ersten Schritt der Auswertung die Volumenanteile von Parenchym, Nichtparenchym und Nichtlunge bestimmt. Die absoluten Werte von Parenchym wiesen sowohl Expositionsbedingte als auch auf den Altersunterschied bezogene signifikante Differenzen auf. Unter NO₂-Exposition wurden erhöhte Parenchymwerte ermittelt ($P < 0,001$) (nach 55-tägiger Exposition 28,0%, nach 25-tägiger Exposition der Jungtiere 29,2%, bei den älteren Tieren 13,9% über den Werten der Kontrolltiere), wobei die älteren Tiere (Expositions- und Kontrollgruppe) die höchsten Werte erzielten ($P < 0,00001$).

4. Diskussion

4.1 Gewebefixierung

Generelles Ziel einer Fixierung ist die bestmögliche Erhaltung von Gewebsstrukturen bei minimaler Alteration vom lebendigen Zustand (Fehrenbach H und Ochs M 1998, Hunter WJ et al 1993). Weiterhin sollte die Fixation das Objekt vor möglichen Veränderungen durch anschließende Behandlung (z.B. Dehydratation, Einbettung, Schneiden) schützen (Fehrenbach H und Ochs M 1998).

In Hinblick auf die Anwendbarkeit stereologischer Methoden muss zudem die Gefahr einer Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes durch die Fixierungsmethode bzw. -lösung bedacht und möglichst minimiert werden (Hunter WJ et al 1993). Denn für eine quantitative Analyse ist die Beibehaltung eines standardisierten Organvolumens als Referenzraum von großer Bedeutung.

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren stellen die Gewebefixierung durch Perfusion über das Gefäßbett oder die Instillation über die Luftwege eine anwendbare Möglichkeit dar. Die intratracheale Instillation von Fixativ ist wesentlich leichter umzusetzen und daher Methode der ersten Wahl, sofern die Erhaltung von Strukturen im Bereich des Gasraumes wie z.B. Surfactant oder Alveolarmakrophagen nicht notwendig ist (Fehrenbach H und Ochs M 1998). Bei Fragestellungen mit Relevanz für oben genannte Strukturen sollte die Perfusionsfixierung ihre Anwendung finden.

Für die vorliegende Untersuchung bot die Fixierung über die Luftwege zudem den Vorteil, dass intrakapillär gelegene Strukturen wie Blutbestandteile gut erhalten und damit beurteilbar bleiben, was in Hinblick auf die Differenzierung des Gewebes in Septum und Kapillaren von Bedeutung war.

Bei einer extrathorakalen Fixierung per instillationem, wie in diesem Fall vorgenommen, muss bedacht werden, dass die exzidierten Lungen alter Mäuse aufgrund ihrer gesteigerten Compliance außerhalb der Enge des Brustkorbes eine größere Dehnung erlauben, als innerhalb des Brustkorbes möglich wäre. Da man sich standardisierter Druckverhältnisse (20 cmH₂O) bedient, um ein für quantitative Studien repräsentatives Organvolumen zu erhalten, lässt sich eine durch oben genannte Verhältnisse auftretende Ungenauigkeit nicht ausschließen.

4.2 Quantitativ-histologischer Untersuchungsansatz

Zur Beurteilung pathologischer Veränderungen der Lunge, beispielsweise der Entwicklung eines Lungenemphysems, ist das Verständnis der realen (also) dreidimensionalen Lungenstruktur essentiell. Um dies zu erreichen, ist es notwendig

Parameter (z.B. Alveolarvolumen, Septenvolumen) zu ermitteln, die zugleich für die pathologischen Veränderungen in der Lunge repräsentativ und, in Hinsicht auf die zu erwartende Pathologie, auch aussagekräftig sind. Deshalb sind Verfahren notwendig, die die dreidimensionale Gestalt des Organs berücksichtigen. Darüber hinaus muss die vermutlich inhomogene Verteilung pathologischer Veränderungen innerhalb eines Organs bedacht werden. Eine genaue Analyse aller möglichen Schnitte durch ein Organ ist sowohl in Hinsicht auf den Zeitaufwand als auch die Praktikabilität unmöglich. Die Quantifizierung von Strukturen mit Hilfe eines stereologischen Ansatzes ist geeignet diese Probleme bei vergleichenden Studien zu lösen.

Die Stereologie benötigt im Gegensatz zu anderen methodischen Ansätzen keine Annahmen über Form, Größe oder Orientierung der zu untersuchenden Objekte (Strukturen). Die Auswahl der zu analysierenden Strukturen bzw. der hierfür notwendigen Sichtfelder erfolgt systematisch und nach dem Zufallsprinzip (Fehrenbach H und Ochs M 1998). Mit Hilfe einer auf den Prinzipien des *Systematic Uniform Random Sampling* (Cruz-Orive LM und Weibel ER 1981) basierenden Stichprobennahme wird eine auf die gesamte Lunge bezogene repräsentative Untersuchung gewährleistet, da auf allen Ebenen der Auswahl eine für alle Strukturen gleich hohe statistische Wahrscheinlichkeit besteht, in die Auswertung mit einzugehen. Durch den Einsatz stereologischer Testsysteme (wie z.B. Punkt- und Linienraster, die einem Objekt überlagert werden) lassen sich anhand zweidimensionaler, für die mikroskopische Analyse geeignete Schnitte, Daten gewinnen, die von systematischen Fehlern (bias) freie Aussagen über die reale dreidimensionale Struktur erlauben (Howard CV und Reed MG 1998).

Insgesamt ergibt sich durch die Einführung stereologischer Methoden eine differenzierte Betrachtungsweise von Strukturen, die eine Gegenüberstellung von quantifizierten strukturellen und funktionellen Parametern gestattet und infolgedessen ein besseres Verständnis der Organ-, Gewebe- oder Zellfunktion erlaubt (Lucocq J 1993).

Zur Beurteilung einer Emphysementwicklung haben sich die Bestimmung von Alveolar-/Airspacevolumen, *Mean Linear Intercept* (MLI) oder *Mean Chord Length* (CM), Septenvolumen und Gesamt-Alveolaroberfläche (Oberflächendichte) etabliert.

Die Zunahme des Alveolarvolumens (z.B. nach NO₂-Exposition) gilt als Zeichen eines „*airspace enlargement*“ der Lunge. Eine Volumenänderung lässt sich u.a. über die Methode des point sampled intercept (PSI) bestimmen. Hierbei wird die mittlere Größe einer Population von Objekten nicht anhand ihrer numerischen Verteilung bestimmt, sondern das hierdurch ermittelte volumen-gewichtete mittlere Volumen setzt sich aus dem arithmetischen mittleren Volumen und dessen Variabilität zusammen. Hierdurch

erhält man im Gegensatz zur Volumendichte zusätzliche Informationen über die Größenverteilung (Variabilität der Größen) von Objekten. Gegenüber 3D-Rekonstruktionstechniken erlaubt die PSI-Methode das Studium von vielen Partikeln (Alveoli, Acini) innerhalb kürzerer Zeit, was insbesondere für den Vergleich mehrerer Versuchsgruppen hilfreich ist, um eine effiziente (Aufwand pro Zeiteinheit) Analyse zu ermöglichen (Fehrenbach A 1998). Probleme bereitete in der vorliegenden Arbeit die Unterscheidung von atelektatischen Alveolen und Kapillaren. Ferner erwies sich bei der Durchführung die Festlegung auf die beiden Öffnungen des Alveolarmundes, anhand derer eine gerade Linie als Zeichen der Alveolarbegrenzung gezogen wurde, in Einzelfällen als schwierig. Denn die Darstellung war nicht in allen Fällen eindeutig und ließ sich in diesen einzelnen Fällen auch durch zusätzliche Orcein-Anfärbung nicht vollständig verifizieren. Diese Problematik spielte in Hinsicht auf die Gesamtheit der Auswertung jedoch eine untergeordnete Rolle.

Die Bestimmung der *Mean Chord Length* (CM), die von „Wand zu Wand“ gemessen wurde, stellte sich hierbei als die einfachere und schnellere Variante heraus. Hingegen berücksichtigt die CM nicht die Trennung von Alveole und Ductus, weshalb die zusätzliche Schätzung des Alveolarvolumens zur Differenzierung, ob ein beobachteter Effekt auf Alveolar- oder Ductalebene Präsenz zeigt, essenziell war. Zudem konnte durch die PSI-Methode eine schärfere Trennung der Gruppen erreicht werden.

Die CM hat gegenüber der häufig benutzten *Mean Linear Intercept Length* den Vorteil, dass sie von der Alveolarwanddicke unabhängig ist. Beide Parameter zeigen eine kontinuierliche Vergrößerung des Luftraumes an, nicht die Vergrößerung einzelner Luftabschnitte. Sie sind daher weniger störanfällig für Zähleffekte, die auftreten, wenn beispielsweise eine Lunge Abschnitte stark vergrößerter Alveolen neben kleinen oder normal großen Alveolen zeigt.

Um zu differenzieren, ob eine bloße Vergrößerung/Überblähung des Luftraumes stattgefunden hat, oder tatsächlich, wie beim Emphysem zu fordern, als Folge einer Zerstörung von Alveolen zu interpretieren ist, ist eine Bestimmung des Gesamt-Septenvolumens und der Gesamt-Alveolaroberfläche unbedingt notwendig (Fehrenbach H 2006).

Eine tatsächliche Aussage über den potentiellen Verlust von Alveoli und Alveolarwänden kann jedoch nur gemacht werden, wenn die gewonnenen Daten in Relation zum Referenzraum betrachtet werden (Fehrenbach H 2002). Hierfür wird im Allgemeinen das Volumen durch Flüssigkeitsverdrängung bestimmt (Scherle W 1970).

4.3 Pathomechanismen der Emphysementwicklung

Ein Emphysem ist klassischerweise durch pathologische Kriterien definiert als eine Erweiterung der Lufträume distal der terminalen Bronchiolen infolge Destruktion ihrer Wand (Herold G 2003).

Die Hauptmechanismen, welche (im Allgemeinen) für eine Emphysementwicklung verantwortlich gemacht werden, basieren auf der Protease/Antiproteasehypothese, und umfassen Entzündung, oxidativen Stress sowie Matrix-Remodeling (Suki B et al 2003). Diese einzelnen Elemente müssen als interagierende Komponenten innerhalb eines komplexen Krankheitsgeschehens gesehen werden.

Die Emphyseminduktion durch Zigarettenrauch oder NO₂-Exposition verläuft hierbei nach vergleichbaren Mechanismen.

Eine Imbalance des Protease-/Antiproteasesystems führt zur Freisetzung von Elastase, die durch die Zerstörung von Bindegewebe (Elastinkomponente) zur Entwicklung von Läsionen beiträgt, insbesondere wenn die Elastase-Inhibitions-Aktivität (häufig durch α_1 -Proteinase-Inhibitoren) reduziert ist (Suki B et al 2003; Snider GL 1986; Fabbri LM et al 1995). Dennoch wurde auch bei Rauchern mit normaler α_1 -Antitrypsin-Aktivität eine Imbalance des Protease-/Antiproteasesystems beobachtet, die durch die Entzündung der Atemwege bedingt ist. Hierbei kommt es zu einem Einstrom von Neutrophilen in das Respirationssystem, der über Entzündungsmediatoren (bspw. Tumor-Nekrose-Faktor α) vermittelt wird. Die vermehrte Präsenz von Neutrophilen ist mit einer erhöhten Belastung der Lunge durch Neutrophilen-Elastase verbunden (Glasgow JE et al 1987). Denn zur Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor α wird die Makrophagen-Metalloelastase (MMP12) benötigt, die nach Schadstoffexposition erhöht exprimiert wird (Suki B et al 2003; Mahadeva R und Shapiro SD 2002).

Die inflammatorisch bedingte vermehrte Aktivität von Alveolarmakrophagen erhöht deren Produktion von Matrix Metalloproteinasen, die sowohl zum Elastin- (Kleinerman J et al 1982) als auch Kollagenabbau (MMP1) beitragen.

„Knock-out“ Mäuse für das Surfactant Protein D (SP-D) Gen und Mäuse ohne den Gewebsinhibitor der Metalloproteinase-3 (TIMP-3) zeigten ein pulmonales Emphysem in der 3. bzw. 2. Lebenswoche gemeinsam mit Zeichen von Entzündung, Makrophagenaktivierung und erhöhter Expression von MMP. In beiden Fällen waren Metalloproteinasen als Mediatoren der Gewebszerstörung involviert (Mahadeva R und Shapiro SD 2002).

Durch die Degradation des Gewebes kommt es schließlich zum Verlust der Alveolarwände und zur Ausweitung der Alveolarfenestrierungen (Green FHY und

Pinkerton KE 2004). Möglicherweise erfolgt ein Wiederaufbau der (kollagenen) Fasern, die dennoch mechanische Defekte aufweisen. Morphometrische und biochemische Studien haben ergeben, dass Kollagen in emphysematösen Lungen abnormal erscheint und nicht seiner herkömmlichen Struktur entspricht (Snider GL 1998; Riley DJ et al 1987; Cardoso W et al 1993; Wright JI and Churg A 1995). Die Fasern und ihre Verbindung in den Alveolarwänden sind hernach nicht so widerstandsfähig wie solche mit regelrecht vorhandenem Kollagen. Bei einer normalen Atmungsphase entsteht durch mechanische Kräfte eine Dehnung des Gewebes. Unter Annahme oben genannter Bedingungen kann es folglich zu einem mechanischen Versagen der Alveolarwände kommen (Suki B et al 2003).

4.4 NO₂-Exposition an Mäuselungen als Modell für die COPD beim Menschen

Zigarettenrauch gilt weltweit als Hauptursache für die Entwicklung einer COPD (GOLD 2003; Mannino DM 2002; Sin DD et al 2003). Er beinhaltet eine komplexe Mischung aus Partikeln und Gasen. Welche der Komponenten im Zigarettenrauch die Entwicklung einer COPD hervorrufen, ist bislang unbekannt. Dennoch werden Gase wie Stickstoffdioxid, Kohlenmonoxid und Blausäure als besonders schädlich eingestuft. Die Gasphase eines Zuges an einer Zigarette kann NO₂-Konzentrationen von 500 µg/m³ erreichen, der von der EU festgelegte Stundengrenzwert zum Gesundheitsschutz liegt (für NO₂) bei einer Konzentration von 200 µg/m³.

Stickstoffdioxid ist heute neben Ozon außerdem einer der bedeutendsten Luftschadstoffe. Seine nachteilige Wirkung insbesondere auf das untere Respirationssystem ist allgemein anerkannt und durch vielfältige Studien (z.B. SCARPOL-Studie [Wüthrich B 2001], Deutsche Forschungsgemeinschaft 1999 [Mahadeva R, Shapiro SD 2002], APHEA-Studie) nachgewiesen. In der APHEA-Studie (Samoli E et al 2006), einer Untersuchung, die in 30 europäischen Städten durchgeführt wurde, war die Erhöhung der NO₂-Konzentration im Freien um 10 µg/m³ mit einer durchschnittlichen allgemeinen Mortalitätssteigerung von 0,30% assoziiert (für kardiovaskuläre Mortalität 0,40% und respiratorisch bedingte Mortalität 0,38%). Auch eine longitudinale Studie an Schulkindern aus Österreich von Moshhammer und Mitarbeitern (2006) zeigte die Assoziation von NO₂-Konzentration, unter anderem hervorgerufen durch den Kraftstoffausstoß von PKW und LKW, mit der Neigung zu Asthma bronchiale, respiratorischen Infekten und einer auf Langzeiteffekten beruhenden erhöhten respirationsbedingten Mortalität. Hierbei lagen die tatsächlich gemessenen NO₂-Konzentrationen im Freien noch unter den von der EU bestimmten Grenzwerten. Es wird vermutet, dass NO₂ auch bei der Emphysementwicklung,

definitionsgemäß ein Kennzeichen des Krankheitsbildes der COPD, eine wichtige Rolle spielt.

Die Exposition des Respirationssystems mit NO_2 führt zu Oedem, epithelialer Verletzung (Schädigung), perifokaler Fibrosierung, Emphyseminduktion und Entzündung (Croxtan TL et al 2002; Suki B et al 2003; Wegmann M et al 2003). Zu den biochemischen Veränderungen, die nach NO_2 -Exposition im Respirationssystem stattfinden, gehören Veränderungen von Lungenlipiden, antioxidativer Metabolismus und Enzymaktivitäten (siehe Kapitel 4.3).

Neutrophile Granulozyten reagieren auf Oxidationsprodukte mit der Freisetzung von Proteinasen (z.B. Elastase). Die Freisetzung von Proteinaseinhibitoren wird durch Luftschadstoffe herabgesetzt. Gleichzeitig kommt es durch die Oxidationsprodukte zu einer akuten Entzündungsreaktion, hierdurch werden Makrophagen aktiviert. Diese Vorgänge führen zu einem zusätzlichen Schaden an Bindegewebe, endothelialen und epithelialen Zellen. Die Aktivität der CD-8^+ T-Lymphozyten steigt ebenso, wenn auch geringfügig (Suki B et al 2003, Croxtan TL et al 2002).

Die nach NO_2 -Exposition auftretende Peroxidation von Fettsäuren ist Zeichen einer Zellschädigung durch die Anwesenheit des Stickstoffdioxids. In der Folge kommt es zur Induktion des antioxidativen Protektionssystems, was als ausgleichender Mechanismus der Zelle gegen die Lipid-Peroxidation zu sehen ist (Sagai M et al 1982). Beispielsweise ist die Stimulation der Glutathion Peroxidase und anderer protektiver Enzyme wie der Superoxid Dismutase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase eine Antwort auf Kurzzeit-Exposition von oxidativen Gasen. Nach Langzeit-Exposition mit NO_2 ist das antioxidative Protektionssystem dagegen inhibiert (Sagai M et al 1984). In der Folge kommt es weiterhin zu einer Ansammlung von Oxidationsprodukten, zum einen durch den direkten toxischen Effekt von NO_2 , zum anderen durch die Entzündungsantwort. Sie rufen Läsionen hervor, die für die Entwicklung eines centroacinären Emphysems und pulmonaler Fibrose mitverantwortlich zu machen sind (Fabri LM et al 1995). Die Folge hoher kurzfristig verabreichter NO_2 Dosen ist ein toxisches Lungenödem mit letalem Ausgang (Chitano P et al 1995).

Tierversuche, die durch Exposition von NO_2 entzündliche, immun- und histopathologische Veränderungen hervorrufen, die dem Krankheitsbild der COPD ähneln, können als geeignetes Modell dienen, um Hypothesen über mögliche Mechanismen der Erkrankung auf ihre Relevanz hin zu prüfen.

Dennoch muss beachtet werden, dass die COPD ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsbild zeigt, dessen Komplexität in einer Versuchsanordnung nicht vollständig berücksichtigt wird. Ziel des Tierversuches ist das Krankheitsbild auf seine Kernpunkte zu reduzieren, um das Geschehen leichter analysieren zu können. Einen weiteren

Unterschied beinhaltet die in der Praxis übliche klinische, auf Symptomen basierende Diagnosestellung (aufgrund des Defizits an relevanten Markern, bspw. Serummarkern oder bildgebender Verfahren) gegenüber einer auf histopathologischen Befunden gestützten Diagnose der Tiermodelle (Fehrenbach H 2002).

Dessen ungeachtet bedarf es dringender Aufklärung über die zu Grunde liegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung. Diese Studie befasst sich mit der Frage, ob die Exposition von NO₂ als geeignetes Modell für die COPD gelten kann und setzt ihren Fokus auf die Möglichkeit der Emphyseinduktion durch NO₂. Gleichzeitig wird auf angängige Änderungen durch unterschiedliche Expositionsdauer eingegangen.

Neben NO₂-Modellen haben sich weitere Modelle zur experimentellen Induktion eines Emphysems etabliert, wie die intratracheale Instillation von Elastase oder die Exposition von Ozon, in deren Folge eine Fibrose zu beobachten ist (Pinkerton KE et al 1998; Crapo JD et al 1984).

Zigarettenrauch-Exposition gilt zweifellos als das am meisten relevante und realitätsnahe Emphysemmodell. Weil entsprechende Resultate aber erst nach Expositionszeiträumen von 6-12 Monaten (Wright JI und Churg A 1995; Lungarella G et al 2001) realisierbar sind, ist seine Praktikabilität dennoch begrenzt.

Ein anderer Aspekt dieser Arbeit bezieht sich auf die physiologische Emphysementwicklung im Alter. Sie ist zwar weithin bekannt, aber selten Objekt wissenschaftlicher Forschung (Mahadeva R und Shapiro SD 2002). Weder der pathophysiologische Mechanismus ist geklärt, noch mögliche Zusammenhänge mit einer krankhaften Emphysementwicklung oder eine erhöhte Anfälligkeit älterer Lungen gegenüber oxidativen/schädlichen Agens.

Die Studie wurde an C57BL/6 Mäusen vorgenommen. Dieser Mausstamm zeigt mehrere Vorteile für die Testung einer oxidativ induzierten Emphysementwicklung. Ein angeborener relativer Mangel an α_1 -Antitrypsin behindert die regelrechte Abwehr von oxidativen Schadstoffen. Durch Radikale aus dem Zigarettenrauch wird der α_1 -Proteinase Inhibitor zusätzlich inaktiviert (siehe Kapitel 4.3). Folge ist eine erhöhte Emphysemanfälligkeit (Snider GL 1986; Luft FC 1999).

Die C57BL/6 Maus ist Basis für andere natürlich vorkommende Mausmutanten, die eine spontane Emphysementwicklung im Alter zeigen, wie die *tight skin*, *beige*, *blotchy* und *pallid* Maus. Ursache ist ein Mutationsbedingter angeborener Mangel verschiedener Proteine (Ranga V und Kleinerman J 1981; Fisk DE und Kuhn C 1976; Lungarella G et al 2001; Green MC et al 1976).

Auch werden genetisch veränderte Mäuse, die aufgrund von Gendefekten wie beispielsweise einem Mangel an Elastin, Thrombozytenwachstumsfaktor A (PDGF-A), Fibroblastenwachstumsfaktor 3 und 4 (FGF-3/4), Fibulin 5 Retinoid-Rezeptor γ ,

Surfactant Protein B und weiterer eine abnormale Lungenentwicklung und Alveogenese zeigen, häufig auf dem C57BL/6 Hintergrund etabliert (Mahadeva R und Shapiro SD 2002). Hierbei ist zu bedenken, dass anders als beim Menschen (hier spielen insbesondere Umweltfaktoren wie das Rauchen eine große Rolle) jede dieser Mausmutanten von Geburt an ein höheres Erkrankungsrisiko gegenüber der Normalpopulation hat, weil sie die eben erwähnten genetischen Schwächen zeigt. Die Krankheitsentstehung kann folglich gegenüber der des Menschen divergieren. Des Weiteren manifestiert sich die COPD des Menschen erst lange nach Beendigung der Lungenentwicklung. Die Relevanz dieser auf einer pathologischen Lungenentwicklung beruhenden Emphysementwicklung bei genetisch veränderten Mäusen für eine pathophysiologische Erklärung der Emphysementwicklung beim Menschen muss dementsprechend relativiert werden.

Experimente mit NO₂-Exposition wurden vielfach an Ratten durchgeführt (Barth PJ et al 1994; Chang LY et al 1986; Kubota K et al 1987; Crapo JD et al 1995). Mäuse bieten insbesondere den Vorteil des Einsatzes der Gentechnik. Sie eröffnet Möglichkeiten der kombinierten Anwendung von Exposition und genetischer Manipulation. Auf diese Weise können sowohl beteiligte Proteine und ihre physiologische Funktion überprüft werden, als auch histopathologische Mechanismen. Kleeberger (2004) erwähnt mehrere bereits bekannte Genloki, die in Kombination mit verschiedenen Umweltfaktoren eine Prädisposition für COPD-Erkrankungen hervorrufen. Eine frühe Intervention gegenüber Risikopatienten wäre möglich, wenn ein allgemein durchführbares (beispielsweise laborchemisches) Screening bezüglich einer genetischen Disposition existierte, insbesondere in Hinblick auf die noch fehlende wirkungsvolle medikamentöse Therapie ein bedeutender klinischer Ansatzpunkt.

Kenntnisse über die Pathophysiologie der Alveogenese bzw. über die Faktoren, die eine normale Lungenentwicklung dirigieren, eröffneten neue Wege der Behandlung eines bereits bestehenden Lungenemphysems. Hierzu muss die Kapazität reifer Lungen bezüglich alveolarem Neuwachstum durch Tierversuche bestimmt werden, sowie die Bedingungen, unter welchen Alveolarregeneration auftreten kann. Therapeutisch wäre die Stimulation von Lungen COPD-Kranker zu bedenken, in der Absicht ein alveolares Neuwachstum zu erreichen (Croxtton TL et al 2002).

Die Relevanz von Tierversuchen für die Forschung über Krankheiten des Menschen ist dennoch ein ungelöstes Problem. Keine Tierart vermag den Menschen vollständig zu imitieren. Die anatomischen Besonderheiten der Mauslunge umfassen eine geringere Verzweigung des Bronchialbaumes sowie eine kleinere Anzahl an Respirationsbronchiolen. Submuköse Drüsen kommen lediglich in der Trachea vor. Daneben haben Mäuse eine obligate Nasenatmung und besitzen weniger Clara-Zellen

sowie Zilien, weshalb sie Tabakrauch nur ineffizient zu filtern vermögen (Pinkerton KE und Green FHY 2004).

Anders verläuft auch der Alterungsprozess. Jede Tierart (und der Mensch) hat eine unterschiedliche Lebenserwartung, weshalb die Entwicklung der Lunge und auch der Prozess des Alterns nicht nur zeitlich unterschiedlich verlaufen, anzunehmen sind auch zum Teil verschiedene Mechanismen (der Entwicklung, des Alterns). Dennoch existieren Spezies übergreifende Gemeinsamkeiten (Mauderly JL 1979, Pinkerton KE und Green FHY 2004), sodass sich ein Vergleich lohnt.

In Hinsicht auf den Fokus dieser Arbeit, der Entwicklung eines Emphysems, beschrieb Mauderly JL (1979) bei Nagern eine Erweiterung von Alveolarvolumen, die während des Alterungsprozesses von einem Verlust an Elastizität und Oberfläche begleitet wurde. Dagegen stieg die Gasaustausch-Region (Alveolaroberfläche) von Nagern mit dem Alter unvermindert. Pinkerton und Green (2004) beobachteten ebenso wie Escolar und Mitarbeiter (1994 und 1997) bei Nagern einen relativen Verlust an Gewebe und Oberflächendichte. Nach Auswertung der absoluten Parameter konnte jedoch kein Verlust an Gewebe und Alveolaroberfläche nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5). Bei Hunden konnten Pinkerton und Green (2004) dagegen den Verlust von Alveolaroberfläche und Septenvolumina nachweisen.

4.5 Veränderungen Emphysem-relevanter Parameter auf NO₂-Exposition

Als relevante Parameter für die Beurteilung einer emphysematösen Lunge werden solche herangezogen, die Auskunft über Alveolen, deren Größe (Volumen) und Oberfläche geben. Hierzu zählen Alveolar-/Acinusvolumen, *Mean Chord Length*, *Mean Linear Intercept Length*, Alveolaroberfläche und Septenvolumen u.a. (siehe Kapitel 2.2.2).

Eine Luftraumerweiterung kennzeichnet sich durch eine Zunahme des Alveolarvolumens und der *Mean Chord Length* bzw. der *Mean Linear Intercept Length* aus. Der Prozess der Emphysementwicklung ist gemäß Definition mit einer Destruktion von Septengewebe und Alveolaroberfläche verbunden. Eine Emphysementwicklung wird deshalb durch eine Abnahme der Alveolaroberfläche und des Septenvolumens belegt.

In der vorgelegten Studie konnte eine Erweiterung des Luftraumes durch NO₂-Exposition nachgewiesen werden, zu einer emphysematösen Destruktion der Alveolarsepten kam es aber nicht. Gleichzeitig deutete sich an, dass die Jungtiere

sensibler auf eine NO₂-Exposition reagierten als die erwachsenen Tiere (siehe Kapitel 4.7).

Das **volumen-gewichtete mittlere Volumen der parenchymalen Lufträume**, als Indikator für die Weite der Gasaustauschräume, war in den Versuchsgruppen der Jungtiere gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht ($P < 0,0001$). Sowohl die jungen Versuchstiere mit 55-tägiger als auch 25-tägiger Exposition zeigten gegenüber ihren jeweiligen Kontrollgruppen eine Zunahme des volumen-gewichteten mittleren Volumens um 66,6% bzw. 41,5%, wobei bei der länger exponierten Gruppe ein höherer Anstieg zu verzeichnen war, während die Expositionsgruppe mit anschließender vierwöchiger Erholungsphase mit 42,1% zwischen den Werten der Versuchs- und Kontrolltiere lag. Diese Daten belegen eine Vergrößerung der Gasaustauschräume bei den Versuchstieren. Eine Verlängerung der Expositionszeit erhöht auch die Wirkung des NO₂, während die beobachteten Veränderungen durch eine anschließende Phase, in der keine Exposition stattfindet, teilreversibel oder bei entsprechender Verlängerung der Erholungsphase möglicherweise vollreversibel sind. Kleinerman (1977) erhielt ähnliche Ergebnisse nach mehrwöchiger NO₂-Exposition und dreimonatiger Regeneration. Hingegen befand er, dass sich nach zwölfmonatiger Exposition mit NO₂ der Verlust der *Internal surface area (ISA)* auch nach einer Erholungsphase mit normaler Atemluft fortsetzte. Er schloss daraus auf eine autonome Progression der Gewebszerstörung nach langer Exposition. Dementsprechend lässt sich auf ein Zeitfenster schließen, in dem Expositionsbedingte strukturelle Schäden noch reversibel sind.

Innerhalb der Gruppen der alten Tiere kam es nicht zu einem signifikanten expositionsbedingten Unterschied der Weite der Gasaustauschräume. Sie waren bei exponierten Tieren im Durchschnitt etwas größer als bei den Kontrolltieren. Die Weite der Gasaustauschräume der alten Kontrolltiere (Gruppe 7) war zudem größer als die aller anderen Kontrolltiere (Gruppe 2 und 4). Als wahrscheinliche Ursache gilt eine altersbedingte Atemraumerweiterung der älteren Tiere (siehe Kapitel 4.6). Auch gemäß den statistischen Tests waren die verschiedenen Effekte der Exposition vom Alter der Mäuse zum Expositionsdatum abhängig ($P < 0,001$).

Die Ergebnisse bezüglich der **Mean Chord Length (CM)**, ein dem MLI vergleichbarer Parameter, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Nach 55-tägiger Exposition der Jungtiere war die CM um 30,9%, nach 25-tägiger Exposition um 12,9% gegenüber dem jeweiligen Kontrollwert erhöht.

Bei den alten Tieren zeigten die Raumluffttiere eine Vergrößerung der *Mean Chord Length*. Die CM war um 13,7% größer als die der Expositionsgruppe. Hierbei bleibt

unklar, warum bei den Raumlufftieren eine größere Zunahme zu beobachten ist als bei den Versuchstieren.

Blank und Mitarbeiter (1988) beobachteten hingegen bei einer an Ratten durchgeführten drei- bis sechswöchigen Exposition von 30ppm NO₂ eine signifikante Vergrößerung von Mean Linear Intercepts (MLI) und Organvolumen, sodass emphysematöse Veränderungen Stickstoffdioxid zugeschrieben wurden.

Barth und Mitarbeiter (1995) prüften durch NO₂-Exposition verursachte Schädigungen der Rattenlunge. Zur Beurteilung struktureller Veränderungen wurde die **Oberflächendichte** herangezogen. Sie verringerte sich sowohl nach 10ppm als auch nach 20ppm NO₂-Exposition signifikant. In der Reduktion der Sv(alv) sahen Barth und Mitarbeiter einen Zusammenhang zur Emphysementwicklung.

Da die Oberflächendichte Veränderungen pro Volumeneinheit des Organs angibt, ist sie jedoch ein relativer Parameter und damit nicht ohne weiteres auf das Gesamtorgan übertragbar. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte S_V(alv) deutete einen tendenziellen Rückgang von Alveolaroberfläche der Jungtiere unter 55-tägiger Exposition an (-16,5%), nicht aber der Jungtiere nach 25-tägiger Exposition (+2,8%) und der älteren Expositionstiere (+12,1%) gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Die Oberflächendichte der Alttiergruppen war gegenüber der der Jungtiere signifikant erniedrigt (P<0,002).

Der bei den Jungtieren unter 55-tägiger Exposition beobachtete Rückgang der Oberflächendichte bestätigte sich bei der Auswertung der Alveolaroberfläche nicht. Die **Alveolaroberfläche** ergab expositionsbedingt keine signifikante Abnahme. Sie war bei den jungen Tieren im Mittel um 6,1% nach 55-tägiger und 24,6% nach 25-tägiger Exposition gegenüber den Raumluffkontrollen erhöht. Eine Erklärung für diese Ergebnisse bieten die durchschnittlich höheren Organvolumen der Expositionsgruppen.

Eine signifikante Zunahme der Alveolaroberfläche (P<0,007) ließ sich in der Expositionsgruppe der Alttiere beobachten. Diese Ergebnisse deuten auf einen altersbedingten Prozess hin. Auch der Vergleich aller Kontrollgruppen zeigte bei den Raumlufftieren einen Alveolaroberflächenzuwachs mit dem Alter.

Der bei Emphyseembildung zu erwartende Effekt einer Verminderung der Alveolaroberfläche innerhalb der NO₂-exponierten Gruppen blieb dagegen aus.

Die **Septenvolumina** waren in den Gruppen der alten Mäuse gegenüber den Jungtieren, sowohl bei den Raumluff- (P<0,034) als auch den Versuchstieren (P<0,00001) signifikant erhöht. Ebenso war ein signifikanter (P<0,002) altersbedingter Expositionsunterschied zu verzeichnen.

Ein Vergleich innerhalb der Jungtiere resultierte in einem signifikanten Zuwachs der Septenvolumina in den Versuchsgruppen (6,7% nach 55-tägiger, 18,4% nach 25-tägiger Exposition) ($P < 0,001$), eine Tendenz, die sich bei der Betrachtung gewichtsspezifischer Daten verstärkte (siehe Abbildung 9-11), obgleich eine Reduktion erwartet worden war.

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Emphysementwicklung erarbeiteten Wegmann und Mitarbeiter (2003). C57BL/6 Mäuse wurden über 25 Tage 20ppm NO_2 ausgesetzt. Stereologische Auswertungen enthüllten eine signifikante Steigerung des massenspezifischen Lungenvolumens auf über 20,0% und des volumen-gewichteten Alveolarvolumens auf über 30,0%, eine Atemwegserweiterung indizierend. Veränderungen der Alveolaroberfläche waren jedoch nicht signifikant (Wegmann M et al. 2003).

Ranga und Kleinerman (1981) studierten den Reparationsprozess in Lungen von männlichen und weiblichen *blotchy* Mäusen nach Inhalation von 20ppm NO_2 . Das *blotchy* Allel ist eine von mehreren Mutationen (ATP7A-Gen, Xq 12-13) auf dem Mäuse X-Chromosom. Betroffene Männchen und heterozygote Weibchen zeigen unterschiedliche Grade von Bindegewebsabnormalitäten. Die Tiere weisen ein vergrößertes totales Lungenvolumen, deutlich erhöhte *Mean Linear Intercepts* und eine verringerte interne Alveolaroberfläche gegenüber Kontrolllungen von Wildtyp-Mäusen auf (Fisk DE und Kuhn C 1976). Nach 28 Tagen Exposition kam es zu einer ausgeprägten Progression der Emphysemausdehnung bei den männlichen Tieren, assoziiert mit einem signifikanten Abfall der internen Alveolaroberfläche ($P < 0,05$) und einer Zunahme der *Mean Linear Intercepts* ($P < 0,005$). Auf Grund der Daten kann eine Emphysementstehung angenommen werden.

Mercer und Mitarbeiter (1995) prüften die Effekte verlängerter Applikation von NO und NO_2 auf die Alveolarsepten der erwachsenen Ratte. Als strukturelle Parameter wurden Anzahl und Größe von Fenestrationsen in Alveolarsepten bestimmt. Nach der Exposition trat eine erhöhte Anzahl von Alveolarfenestrierung auf. Die Formation dieser Fensterungen durch Atrophie interstitieller Räume wurde mit den ersten Schritten emphysematöser Destruktion von Alveolarsepten gleichgesetzt. Auch hier ist laut den Autoren durch die NO_2 -Exposition eine beginnende Emphysementwicklung hervorgerufen worden.

Lungarella und Mitarbeiter (2001) setzten Mäuse verschiedener Rassen, DBA/2, ICR und C57BL/6J Mäuse, über sieben Monate hinweg Zigarettenrauch (drei Zigaretten/Tag, fünf Tage/Woche) aus. Sie nahmen an, dass C57BL/6J Mäuse und DBA/2 Mäuse aufgrund ihrer genetischen Voraussetzung (Alpha_1 -Antitrypsin Mangel bzw. erhöhte Anfälligkeit gegenüber Radikalen) empfindlicher gegenüber

Zigarettenrauch sind als ICR Mäuse. Eine chronische Exposition resultierte in einer signifikanten Steigerung von *Mean Linear Intercept* und Senkung von *Internal Surface Area* bei C57BL/6J und DBA/2 Mäusen, nicht dagegen bei ICR Mäusen. Gleichmaßen kam es zu einer Erhöhung des Destructive Index (DI; Parameter zur Schätzung der Alveolarwandzerstörung) bei den beiden sensitiven Mäuserassen, während sich die DI der ICR Mäuse nicht signifikant änderte. Auf der Basis dieser Parameter schließen die Autoren bei C57BL/6J und DBA/2 Mäusen, nicht aber bei ICR Mäusen, auf die Entstehung emphysematöser Veränderungen, (Lungarella G et al 2001).

Die in der hier vorgelegten Studie nicht erreichte Verringerung von Alveolaroberfläche und Septenvolumina durch NO₂-Exposition ist unter anderen Versuchsbedingungen und der Wahl anderer Mäuserassen mit entsprechender Disposition durchaus gelungen. Voraussetzung hierfür ist ein im Vergleich zu dieser Studie deutlich längerer Versuchszeitraum von mehreren Monaten (siehe vorgenanntes Beispiel mit 7 Monaten) oder die Auswahl einer deutlich sensitiveren Mäuserasse wie z.B. der blotchy Maus, bei der bis zur Veränderung emphysemrelevanter Parameter keine Monatelange Exposition notwendig ist. Wichtig für die Überprüfung einer erfolgreichen Versuchsanordnung ist die Auswertung nicht nur relativer sondern auch absoluter Werte, wobei solche Ergebnisse von Studien, die sich auf relative Parameter wie beispielsweise Oberflächendichte beziehen, unter Vorbehalt zu betrachten sind. In der vorliegenden Arbeit lässt sich gut nachvollziehen, wie sich die Tendenz relativer Parameter nach ihrer Umrechnung in absolute Werte umkehren kann. Beweisend sind, wie bereits aufgeführt der Verlust von Alveolaroberfläche und Septenvolumen bei Zunahme des Organvolumens.

Als ursächlicher Faktor für die in der vorgelegten Arbeit nicht erreichte Emphysementwicklung muss deshalb vor allem die zu kurze Expositionsdauer gesehen werden. Auch ist Stickstoffdioxid nur ein Radikal aus verschiedensten Schadstoffen des Zigarettenrauches und als auslösendes Agens möglicherweise nicht so effizient wie Zigarettenrauch selbst.

4.6 Altersemphysem

Während mittlerweile vielerlei Studien auf dem Gebiet der Krankheits- bzw. expositionsbedingten Emphysementwicklung existieren, ist die Datenlage über Veränderungen in der Alterslunge vergleichsweise gering. Angaben über altersbezogene Veränderungen im Respirationssystem von Säugetieren belaufen sich auf kurze beschreibende Informationen von Kontrolltierlungen aus Toxizitätsstudien.

Sie haben vorwiegend die Gasaustauschregionen der Lungen betrachtet (Pinkerton KE und Green FHY 2004).

Die Lebenserwartung ist für jede Tierart (wie auch den Menschen) unterschiedlich und hat damit einen signifikanten Einfluss auf den Alterungsprozess des Respirationssystems. Die Entwicklungsstufen vollziehen sich zwischen den Spezies in zeitlich unterschiedlicher Ausprägung, anzunehmen sind auch zum Teil verschiedene Mechanismen der Entwicklung und des Alterns. Trotzdem existiert eine Vielfalt gemeinsamer artenüberschreitender morphologischer Eigenschaften. Hierzu zählen postnatale Alveolarisierung der Lunge, der Verlust von Alveolarsepten-Gewebsmasse und die Fenestrierung bzw. Ausbildung von Poren in den Alveolarwänden.

Alveolarisierung findet bei Mäusen zu etwa 80% nach der Geburt statt und ist innerhalb der ersten vier bis sechs Lebenswochen abgeschlossen, beim Menschen beginnt sie während der späten Schwangerschaft und ist innerhalb der ersten vier bis acht Lebensjahre weitgehend vollzogen (Pinkerton KE und Green FHY 2004). Sie beinhaltet in gegebener Reihenfolge die Formation neuer Alveolarsepten aus den bei Geburt bereits ausgebildeten Terminalsacculi und die Streckung der sekundären Septen, vorwiegend aus dem Verlust von interstitiellen Mesenchymzellen und extensivem Kapillarwachstum entstehend. Das Resultat dieses Prozesses ist eine Vergrößerung der Alveolaroberfläche und des Luftraumes (McGowan SE und Snyder JM 2004). Trotz Unterschieden in der Kinetik und Zeitdauer dieser Phase bei Ratte/Maus und Mensch, ist die verhältnismäßige Vergrößerung der Alveolaroberfläche nach der Geburt sehr ähnlich. Hierbei ist zwar der Vorgang selbst, nicht aber die Regulation der Alveolarisierung verstanden.

Man weiß, dass auch die Organisation von essentiellen Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Elastin bei Entstehung neuer Septen eine wichtige Rolle spielt. Wird beispielsweise die Bildung von Elastin während der Lungenentwicklung inhibiert, ändert sich die Alveolarstruktur und die Gasaustauschfläche der Lunge wird verringert (McGowan SE und Snyder JM 2004). Bei der *tight skin* Maus führt ein Defekt im Fibrillin-1-Gen durch spontane Mutation zu vermehrter Kollagenablagerung in der Lunge, während weniger Elastin gebildet wird (McGowan SE und Snyder JM 2004). Nach vier Wochen zeigt sich bereits eine Luftraumerweiterung. Die *pallid* Maus entwickelt sich zunächst normal, zeigt aber aufgrund einer Mutation desselben Gens nach acht Monaten einen Anstieg von extrazellulärer Elastase im Lungeninterstitium, bei gleichzeitiger Reduktion des Elastins (McGowan SE und Snyder JM 2004). Diese Maus hat möglicherweise auch eine verminderte Menge von im Gewebe zirkulierender Alpha₁-Antiprotease, die zusammen mit dem Anstieg der extrazellulären Elastase zu einem vermehrten Abbau von Elastin

führen. Die konsekutive Luftraumerweiterung resultiert deshalb möglicherweise aus einer Septendestruktion und weniger aus einem Defekt in der Alveolarwandformation (McGowan SE und Snyder JM 2004).

Die Erweiterung der Luftwege ist auch ein Charakteristikum des Alterns über die Grenzen aller Spezies hinweg. Möglich ist, dass die gleichen Veränderungen, die zu einer pathologischen Entwicklung der Lunge führen, auch für die Erweiterung der Luftwege im Alter eine Rolle spielen; beispielsweise die Veränderung von Alveolarporen in Größe und Anzahl und die Zusammensetzung und Anzahl elastischer und kollagener Fasern. Eine Vergrößerung der Kohn,schen Poren führt letztlich zur Destruktion der Septen und damit auch zu der beim Emphysem (COPD) beobachteten Destruktion von Alveolarwänden.

Für Säugetierlungen existiert eine strenge allometrische Verbindung zwischen Körpergewicht und Parametern wie Lungenvolumen, Alveolaroberfläche und pulmonaler Diffusionskapazität (Pinkerton KE und Green FHY 2004).

Postnatale Entwicklung ist mit einem signifikanten Anstieg von **Körpergewicht** und Lungenvolumen assoziiert. Die Maus nimmt vor allem innerhalb des ersten Monats an Gewicht zu. Nach zwei Monaten besteht das Wachstum weiter, verlangsamt sich aber und endet mit 19 Monaten (vgl. Tabelle 6.6 + Abbildung 1). Ab dem 28. Lebensmonat verringert sich das Gewicht wieder, bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 29-30 Monaten (bei Labormäusen wie der C57BL/6 Maus) (Pinkerton KE und Green FHY 2004).

In der vorliegenden Studie ist eine signifikante Erhöhung des **Lungenvolumens** (Abbildung 2) der älteren Kontrolltiere gegenüber den jungen Tieren zu beobachten, die zum einem durch das erhöhte Gewebsvolumen der älteren Lungen zu erklären ist, zum anderen Vermutungen über eine altersbedingte Luftraumerweiterung nahe legt. Während die Jungtiere der Kontrollgruppen Volumina von durchschnittlich 0,75ml (Stdabw.±0,14) aufwiesen, erreichte die Raumluftgruppe der zwölf Monate alten Mäuse einen durchschnittlichen Wert von 1,12ml (Stdabw.±0,09).

Vergleichende Werte aus der Literatur von BALB/cNNia Mäusen zeigten bei 2 Monate alten Tieren Lungenvolumina von 0,80ml und 19 Monate alten Tieren von 1,36ml auf und damit gleiche Tendenzen.

Die Volumenaufteilung zwischen **Alveole** und **Ductus** (Abbildung 5) ergab, dass Alveolen mit einem Volumen von 0,42ml (Stdabw.±0,04) bzw. 0,38ml (Stdabw.±0,06) dominierten. Das duktales Volumen erreichte Werte von 0,22ml (Stdabw.±0,03) bzw. 0,24ml (Stdabw.±0,04). Der Abgleich mit Werten aus der Literatur zeigte, dass der Unterschied zwischen den Volumina von Alveole und Ductus in diesem Fall geringer ausfiel. Eine Studie mit 9 Monate alten BALB/cNNia Mäusen ergab 0,30ml

(Stdabw. \pm 0,02) für ductales und 0,79ml (Stdabw. \pm 0,04) für alveoläres Volumen (Pinkerton KE, Green FHY 2004). Die Unterschiede können sich jedoch auch aufgrund anderer Fixierung und Aufarbeitung der Lungen ergeben haben, ebenso aufgrund der zu erwartenden Stammunterschiede.

Das Alveolarvolumen der älteren Kontrolltiere stieg signifikant auf 0,58ml (Stdabw. \pm 0,08), das Volumen der Ductus auf 0,34ml (Stdabw. \pm 0,07).

Escolar und Mitarbeiter (1997) untersuchten morphometrische Unterschiede der Lunge verschieden alter Ratten. Sie beobachteten eine signifikante Erhöhung der **Mean Chord Length** 18 Monate alter Tiere gegenüber der von 5 Monate alten Tieren. Auch die alten Mäuse der Raumlufgruppe dieser Studie zeigten eine signifikante ($P < 0,014$) Steigerung der CM gegenüber den entsprechenden Jungtieren, was auf eine Erweiterung der distalen Lufträume hindeutet (Abbildung 4).

Neben der CM prüfte Escolar *Tissue Density* (T_D) und *Internal Alveolar Perimeter* (IAP). Beide waren in den Lungen der alten Tiere gegenüber denen der fünf Monate jungen Erwachsenen signifikant erniedrigt. In der vorliegenden Studie wurden **relatives Septenvolumen** ($V_V[\text{sept}]$) und **Oberflächendichte** ($S_V[\text{alv}]$), den oben genannten ähnliche Parameter, bestimmt. Das relative Septenvolumen der alten Kontrolltiere war ebenfalls signifikant ($P < 0,014$) erniedrigt. Für $S_V[\text{alv}]$ zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied ($P < 0,001$), die Oberflächendichte der älteren Tiere war herabgesetzt. Escolar und Mitarbeiter (1997) schlossen aus den Ergebnissen auf einen relativen Verlust von Lungengewebe. 1994 untersuchten Escolar und Mitarbeiter die Lungen 16 Wochen und 56 Wochen alter Tiere, wobei die Auswertung auf der Analyse selbiger Parameter basierte. Hierbei ließen sich Tendenzen relativer Parameter, die eine emphysematöse Entwicklung in den Lungen der 56 Wochen alten Tiere andeuteten, nach Überprüfung an absoluten Parametern nicht bestätigen. Es kam zu keiner gesicherten emphysematösen Veränderung, wohl aber zu einer Luftraumerweiterung mit dem Alter (Escolar JD et al 1994).

In der vorgelegten Studie wiesen die relativen Parameter ebenfalls auf eine emphysematöse Entwicklung der Lungen hin. Nach Auswertung der absoluten Parameter bewahrheitete sich die Vermutung nicht.

Ein signifikanter Zuwachs an **absolutem Septenvolumen** (Abbildung 10) war in der Gruppe der zwölf Monate alten Raumlufttiere ($P < 0,034$) gegenüber den Jungtieren zu verzeichnen. Auch die **Alveolaroberfläche** (Abbildung 7) der zwölf Monate alten Tiere war gegenüber den jungen Kontrolltieren (leicht) erhöht. Pinkerton und Green (2004) beobachteten ebenfalls an BALB/cN^{1a} Mäusen einen kontinuierlichen Anstieg der Alveolaroberfläche bis zum 30sten Lebensmonat. Darüber hinaus stellten sie fest, dass das absolute Volumen der Alveolarwände bei den von Ihnen untersuchten Mäusen

innerhalb der ersten neun Lebensmonate keine nennenswerten Unterschiede zeigte, jedoch kam es bei 19 Monate alten Tieren zu einem signifikanten Anstieg des Alveolarwandvolumens.

Der Anstieg von Alveolaroberfläche in Kombination mit einem kontinuierlichen Wachstum absoluter Volumina von Alveole und Ductus deutet auf eine Hyperinflation mit signifikanter Luftraumerweiterung im Rahmen des Alterungsprozess hin (Pinkerton KE und Green FHY 2004).

Neben den oben genannten Veränderungen im Laufe des Alterungsprozesses fiel mehreren Autoren eine Ausdehnung von interalveolaren Poren mit zunehmendem Alter auf. Innerhalb einer Zeitspanne vom 1. bis zum 28. Lebensmonat vervierfachte sich die Gesamtoberfläche der Alveolarporen bei BALB/cNnia Mäusen, die Anzahl an Poren pro Alveole verdoppelte sich (Pinkerton KE, Green FHY 2004; Kawakami M et al 1984). Die Zunahme sowohl der Gesamtoberfläche der Poren als auch der Poren pro Alveole korrespondierte hierbei mit dem altersbedingten Anstieg der Alveolaroberfläche. Hingegen änderte sich in einer Versuchsreihe von Ranga und Kleinerman (1980) die Anzahl der Poren in Mäuselungen innerhalb eines Zeitintervalls von 26 Monaten nicht.

Pump führte 1976 Tests an Patientenlungen ohne bekannte respiratorische Erkrankungen durch. Er untersuchte hierbei 24 Lungen von Patienten im Alter zwischen 17 und 86 Jahren. Die Porenoberfläche wurde durch die Messung der Alveolarmembranfenestrierungen bestimmt und in Verhältnis zum Alter des Patienten gesetzt. Er kam zu gleichen Ergebnissen wie Pinkerton und Green, das heißt der signifikanten Vergrößerung der Porenoberfläche mit dem Alter. Diesen Effekt führte er auf eine Ruptur von Gewebe zurück (Pump KK 1976). Ein Zusammenhang mit den im Alter herabgesetzten elastischen Rückstellkräften der Lunge liegt nahe (Turner JM et al 1968). Escolar und Mitarbeiter beobachteten ebenso wie Shapiro und Kollegen einen progredienten Anstieg an Elastinfasern im Alter (Escolar JD et al 1994; Shapiro SD et al 1991). Auch die Elastinfaserdicke stieg mit zunehmendem Alter, möglicherweise die Folge einer ursächlichen Zerstörung der Fasern (Escolar JD et al 1994). Elastin besteht aus zwei Komponenten, einer Desmosinhaltigen amorphen und einer fibrillären Komponente. Erstere ist stabiler und verbleibt länger im Gewebe (Shapiro SD et al 1991). Aufgrund des Zerstörungsprozesses während des Alterns verliert elastisches Gewebe möglicherweise an Spannkraft und Dehnungsfähigkeit, was einen Zusammenhang zwischen verminderter Rückstellkraft und vermehrtem Elastinfasergewebe erklären könnte (Fukuda Y et al 1989). Darüber hinaus zeigen sich offenbar Veränderungen des Kollagenaufbaus, die durch eine progressive Verlagerung zugunsten des unlöslichen Kollagens mit geringeren Verzweigungen charakterisiert ist.

Einen weiteren altersbedingten Prozess stellt die fortschreitende Verminderung der Immunfunktion der Lunge dar. Higashimoto (1991) beobachtete, dass die phagozytischen Zellzahlen in der bronchoalveolären Lavage in 26 Monate alten C57BL/6 Mäusen gegenüber 1.5 Monate alten Tieren des gleichen Stammes zwar erhöht waren, sie aber eine geringere Fähigkeit aufwiesen, Fremdstoffe zu eliminieren (Higashimoto Y et al 1991).

Auch eine Abnahme des antioxidativen Abwehrsystems wurde in Lungen alter Mäuse beobachtet. Senile C57BL/6 Mäuse zeigten eine 30%ige Abnahme des Glutathion Systems (GSH), ein Abwehrmechanismus, auf den insbesondere auch NO₂ Einfluss nimmt (siehe Kapitel 4.3) (Chen TS et al 1990).

4.7 Interaktionen zwischen Alter und NO₂-Exposition

Eine Trennung von Veränderungen in der Lunge, die ihre Ursache im physiologischen Alterungsprozess haben, von solchen, die aus additiven Effekten von Umweltfaktoren und genetischer Veranlagung entstehen, fällt schwer. Unser Wissen über normales Altern basiert auf Daten von Populationen, die unterschiedliche genetische Prädispositionen für Lungenerkrankungen haben, sowie verschieden häufig und stark der Exposition von Luftschadstoffen ausgesetzt waren. Hingegen sind Schadstoffexpositionen an Labortieren üblicherweise kontrolliert. Beschriebene Veränderungen an Raumluft exponierten Tieren reflektieren vorwiegend den Alterungsprozess und weniger umweltbezogene Veränderungen (Green FHY und Pinkerton KE 2004). Selbstverständlich lassen sich auch hier keine Bedingungen schaffen, die eine absolute Schadstoffabstinenz garantieren.

Das senile Emphysem beim Menschen zeichnet sich durch den Verlust von ca. 30-50% der Lungengewebsmasse während einer durchschnittlichen Lebenszeit von 72-78 Jahren aus. Gleichzeitig kommt es zur Reduktion von elastischem Bindegewebe und Kapillaren in den Alveolarwänden. Morphometrische Studien zeigen einen Anstieg in Ductalvolumen, *Mean Linear Intercept*, sowie Größe und Volumen von interalveolären Poren (Green FHY und Pinkerton KE 2004, siehe auch Kapitel 4.6 Altersemphysem). Diese Veränderungen weisen deutliche Ähnlichkeiten mit dem pathologischen Emphysem auf. Während aber das pathologische Emphysem makroskopisch sichtbar ist und insbesondere das zentrilobuläre Emphysem auch ein irreguläres Verteilungsmuster auf verschiedene anatomische Kompartimente zeigt, stellt sich das senile Emphysem dem bloßen Auge bei einer Autopsie nicht dar und involviert die Lunge diffus. Das pathologische panlobuläre Emphysem ist histologisch nicht eindeutig vom Altersemphysem zu unterscheiden, da es recht homogen verteilt ist und die Lunge ebenso diffus betrifft.

Angaben über eine vermehrte Anfälligkeit jüngerer oder älterer Lungen gegenüber Luftschadstoffen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei der Entwicklungsstand der Lunge zum Zeitpunkt der Exposition. Fanucchi und Plopper (2004) kamen anhand ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass wenige Wochen alte Jungtiere vor der Entwöhnung von der Muttermilch weniger anfällig gegenüber Schadstoffexposition der Lunge seien und auch weniger Veränderungen in der Zusammensetzung der pulmonalen Enzyme (u.a. Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) im Vergleich mit erwachsenen Tieren zeigten. Sie beobachteten eine frühere und verstärkte Reaktion des antioxidativen Abwehrsystems auf ein schädliches Agens der Jungtierlungen als in Lungen von erwachsenen Tieren. Allerdings war die Lungenentwicklung verzögert. Auch Chang und Mitarbeiter (1986) stellten eine zumindest gleich hohe, wenn nicht höhere Sensitivität von in der späten Entwicklung befindlicher sechs Wochen alter Tiere gegenüber 24 Stunden alten Tieren fest, die gleichsam über sechs Wochen hinweg NO₂ ausgesetzt waren.

Smiley-Jewell und Van Winkle (2004) beobachteten dagegen eine höhere Anfälligkeit junger (bis zu zwei Wochen alter) Tiere gegenüber Erwachsenen (mindestens acht Wochen). Sie machten hierfür simultan verlaufende Reparations- und Entwicklungsphasen nach Verletzung der heranwachsenden Lunge verantwortlich. Infolgedessen sei ihr Reparationspotential im Vergleich mit der erwachsenen Lunge limitiert. Das Resultat ist möglicherweise eine Änderung der normalen Lungenentwicklung.

Escolar und Mitarbeiter (1996) untersuchten in einer Studie mit 19 Monate alten Ratten die Auswirkungen und Interaktionen zwischen Tabakrauch-Exposition und Alter zum Zeitpunkt der Exposition. Bestimmt wurden Parameter, die über eine Vergrößerung der Alveolaroberfläche, den Verlust von Septengewebe und elastische Fasern Aufschluss gaben. Ratten, die vom neunten bis zum zwölften Lebensmonat Zigarettenrauch ausgesetzt waren, hatten ein höheres relatives Risiko einer Emphysementwicklung als ältere Ratten, deren Exposition im Alter von zwölf Monaten begann und mit 19 Monaten endete.

Die vorliegende Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen. Junge Mäuse, die NO₂ ausgesetzt waren, reagierten auf die Exposition mit einer signifikanten Vergrößerung der Alveolarweiten (siehe Tabelle 6.3, Abbildung 3). Dagegen gab es keinen signifikanten expositionsbedingten Unterschied in den Alveolarweiten der Kontroll- und Versuchsgruppe innerhalb der älteren Tiere. Die Kontrollgruppe wies die höchsten Werte innerhalb der Raumluftgruppen auf, während umgekehrt die Expositionsgruppe (der alten Mäuse) gegenüber den anderen NO₂-Gruppen den niedrigsten Wert

erreichte. Aus den statistischen Tests ergab sich, dass die verschiedenen Effekte der Exposition davon abhängig waren, in welchem Alter die Tiere exponiert wurden ($P < 0,001$). Gleiches zeigte sich bei Lungenvolumen ($P < 0,0001$) und Oberflächendichte ($P < 0,001$). Während die Jungtiere signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren zeigten, waren zwischen den älteren Tiergruppen keine signifikanten Effekte auszumachen.

Diese Ergebnisse sprechen für eine höhere Sensitivität der Jungtiere gegenüber einer NO_2 -Exposition.

Auch Studien über Schulkinder, die entsprechendem Smog von Straße und Verkehr sowie Zigarettenrauch ausgesetzt waren, erbrachten ähnliche Ergebnisse. Nicht nur, dass eine höhere Prävalenz an Asthma-Erkrankungen und akuten respiratorischen Infekten zu verzeichnen war, sondern auch die Prävalenz an chronischen obstruktiven Erkrankungen stieg, welche u.a. durch eine dauerhafte Abnahme des FEV_1 verifiziert wurde (Moshhammer H et al 2006).

Die Zunahme des Volumens der distalen Lufträume ohne Verlust der Gewebekomponente ist ein Spezies übergreifendes Merkmal der Lungenalterung (Snider GL et al 1985; Verbeken EK et al 1992; Gillooly M und Lamb D 1993). Sie ist Ausdruck einer Dehnung der Alveolen, u.a. im Rahmen einer veränderten Zusammensetzung der elastischen und kollagenen Fasern. Beim Hund und auch bei der SAM-Maus (englisch: „senescence-accelerated“ mouse) bestehen Hinweise auf einen Verlust von Alveolaroberfläche. Als Ursache wird allerdings die Frequenz- und Größenzunahme von alveolaren Poren angenommen (Pinkerton KE, Green FHY 2004). Hingegen ist die pathologische Emphysementwicklung, der zwar eine Erweiterung des Luftraumes vorausgeht (Verbeken EK et al 1992), auf die Zerstörung von Septengewebe und Alveolaroberfläche mit Zunahme des Alveolarvolumens zurückzuführen.

Zusammenfassend lassen sich durchaus ähnliche pathophysiologische Wege von expositionsbedingtem Emphysem und physiologischer Alterung der Lunge vermuten. Sie umfassen die herabgesetzte phagozytotische und anti-inflammatorische Fähigkeit der Lunge, die Abnahme antioxidativer Tätigkeiten und die verminderte elastische Rückstellkraft. Möglicherweise haben auch die Zugkräfte, welche während einer Atemphase durch den intrapulmonal bestehenden Druck auf das Lungengewebe wirken und eine dauerhafte mechanische Beanspruchung des Lungengewebes hervorrufen, Einfluss auf die Verschlechterung des Zustandes sowohl älterer als auch pathologischer Lungen (Suki B et al 2003).

Dennoch ist die Bewertung einer gegenseitigen Beeinflussung der Faktoren Alter und Exposition schwierig, was sich auch in der kontroversen Diskussion über die

altersabhängige Sensibilität gegenüber Schadstoffexposition zeigt. Das Verständnis der Lungenentwicklung und des Lungenwachstums während der Adoleszenz und ihrer Regulationsmechanismen ist essentiell, ebenso wie die Berücksichtigung der Entwicklungsphase zum Zeitpunkt der Exposition, um die potentielle Toxizität von Schadstoffen auf den Entwicklungsprozess zu evaluieren (Plopper CG und Fanucchi MV 2004).

4.8 Ausblick

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Analyse emphysemrelevanter Parameter in Hinsicht auf eine mögliche Emphysementwicklung nach NO₂-Exposition bei Mäusen. Zwar wurde eine Luftraumerweiterung unter Exposition beobachtet, nicht aber Hinweise auf einen signifikanten Verlust von Alveolarsepten. Beim Vergleich dieser Untersuchung mit entsprechenden Arbeiten aus der Literatur, stellte sich heraus, dass die Ergebnisse der verschiedenen Studien uneinheitlich sind.

Einige Autoren (Lungarella G et al 2001; Mercer RR et al 1995; Blank J und Mitarbeiter 1988; Ranga V und Kleinerman J 1981; Fisk DE und Kuhn C 1976) erreichten eine Emphysementwicklung bei bestimmten Mäusestämmen (und Ratten) nach NO₂-Exposition, andere (z.B. Wegmann M et al 2003) erzielten lediglich eine Luftraumerweiterung ohne Nachweis einer Emphysementwicklung.

Die Exposition von C57BL/6-Mäusen mit NO₂, wie in dieser Arbeit vorgenommen, ist kein geeignetes Modell für die Emphysementwicklung als ein Kennzeichen des Krankheitsbildes der COPD. Andere Aspekte der COPD, wie die chronische Bronchitis, wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet. Auch durch die Wahl verschiedener Expositionszeiten sowie unterschiedlicher Lebensalter der Tiere zum Expositionszeitpunkt konnte eine Emphysementwicklung nicht induziert werden.

In Anbetracht der aus der Literatur bekannten erfolgreichen Versuchsanordnungen zur Emphyseminduktion ist somit sowohl die ausreichende Dauer der Exposition als auch die Wahl des Mäusestammes für eine erfolgreiche Versuchsanordnung essentiell. Bei Auswahl nur gering Emphysem anfälliger Mausstämmen wie z.B. C57BL/6, der häufig zur Generierung transgener Tiere verwendet wird, ist diesbezüglich ein längerer Versuchszeitraum von mehreren Monaten bis zu einem Jahr zu wählen, bei deutlich sensitiveren Mäusestämmen wie z.B. der *blotchy* Maus entsprechend kürzere Zeiten. Ohne die Signifikanz der aus der Literatur bekannten Veränderungen in Frage stellen zu wollen, muss dennoch davor gewarnt werden, die bei der stereologischen Auswertung gewonnenen relativen Daten als ausreichenden Hinweis für die Induktion einer Emphysementwicklung zu sehen. Häufig (wie auch in dieser Arbeit beschrieben)

bestätigen sich die bei relativen Parametern gesehenen Tendenzen nach Auswertung der absoluten Parameter nicht.

Andere Möglichkeiten der Emphyseminduktion sind die intratracheale Instillation von Elastase oder die Exposition von Ozon (Pinkerton KE et al 1998; Crapo JD et al 1984) sowie die Zuhilfenahme der Gentechnik.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Mäuselungen im Sinne einer physiologischen Altersentwicklung, wobei sich auch hier eine Luftraumerweiterung ohne Verlust von Alveolarsepten abzeichnete. Die Ermittlung altersrelevanter Veränderungen von Mäuselungen ist insbesondere vor dem Hintergrund der COPD-Forschung wichtig. Nur so lassen sich strukturelle Veränderungen durch Noxen einerseits und das Altern andererseits abgrenzen. Sind die Mechanismen ähnlich, gibt es eine gegenseitige Beeinflussung? Wo endet die physiologische altersbedingte Veränderung der Lunge, wann ist sie pathologisch? Eine entscheidende Bedeutung hat hier insbesondere auch die Regenerationsfähigkeit alter Lungen. Zugleich sollte versucht werden, die Regulation der Alveolarisierung aufzuklären, da Hinweise bestehen, dass gleiche Botenstoffe sowohl bei der Alveolarisierung als auch bei Reparationsvorgängen nach Schädigung involviert sind. Auf diese Weise könnte die Regenerationskraft ausgewachsener Lungen direkt beeinflusst werden.

Zur eingehenden Erforschung altersbedingter pulmonaler Entwicklung sollten, wie in der vorgelegten Studie, Versuchsanordnungen mit Mäusen mehrerer (wenn möglich drei [jung, erwachsen, im Senium befindlich] oder mehr) Altersstufen durchgeführt werden, insbesondere auch solchen mit abgeschlossener Lungenentwicklung. Gleichzeitig ließe sich auf diese Weise eine mögliche altersabhängige Prädisposition gegenüber Noxen ableiten und auf bestimmte Lebensabschnitte eingrenzen.

5. Zusammenfassung

Die NO₂ Exposition von Mäuselungen wird bisweilen als Tiermodell der Emphysementstehung im Rahmen der Forschung über das Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) angesehen und eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Faktoren „Alter“ und „Dauer der NO₂-Exposition“ untersucht. Hierzu wurden zwei Altersgruppen (1,5-2 Monate bzw. 12 Monate) von C57BL/6-Mäusen ausgewählt, über 25 Tage hinweg Stickstoffdioxid ausgesetzt und mit entsprechenden altersgleichen Tieren, die in Raumluft gehalten wurden, verglichen. Die Jungtiere wurden darüber hinaus zwei unterschiedlich langen Expositionszeiten (25 bzw. 55 Tage) ausgesetzt. Das Auftreten eines Lungenemphysems wurde mit Hilfe quantitativ-stereologischer Methoden beurteilt. Hierbei wurden Strukturparameter bestimmt, die Aussagen über „*airspace enlargement*“ und Septenverlust erlauben, beides Zeichen einer Emphysementwicklung. Zum Nachweis eines „*airspace enlargement*“ dienten die Bestimmung des volumen-gewichteten mittleren Volumens der parenchymalen Lufträume und der *Mean Chord Length*. Ein Septenverlust sollte über den Verlust an Alveolaroberfläche und Septenvolumen nachgewiesen werden.

Als Ergebnis zeigte sich eine Erweiterung des Luftraumes durch NO₂-Exposition. Das volumen-gewichtete mittlere Volumen der parenchymalen Lufträume war in den Versuchsgruppen der Jungtiere gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht, die *Mean Chord Length (CM)* erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Expositions- und Kontrollgruppen. Der bei Emphysementwicklung zu erwartende Effekt einer Verminderung der Alveolaroberfläche innerhalb der NO₂-exponierten Gruppen blieb dagegen aus. Die Alveolaroberfläche war bei den Expositionsgruppen im Durchschnitt größer als bei den Kontrolltieren, ebenso die Septenvolumina.

Für eine höhere Sensitivität der Jungtiere gegenüber der NO₂-Exposition als Erwachsene sprechen die folgenden Ergebnisse. Junge Mäuse, die NO₂ ausgesetzt waren, reagierten auf die Exposition mit einer signifikanten Vergrößerung der Alveolarweiten. Dagegen gab es keinen signifikanten expositionsbedingten Unterschied in den Alveolarweiten der Kontroll- und Versuchsgruppe innerhalb der älteren Tiere. Gleiches ergab die Bestimmung von Lungenvolumen und Oberflächendichte.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Kontroll-Mäuselungen in Hinsicht auf die Entwicklung eines physiologischen Altersemphysems, wobei sich auch hier eine Luftraumerweiterung ohne Verlust von Alveolarsepten abzeichnete. *Mean Chord Length (CM)*, Alveolaroberfläche, Septenvolumina und Lungenvolumina waren bei den Alttieren gegenüber den Jungtieren signifikant erhöht.

Die Exposition von C57BL/6-Mäusen mit NO₂, wie in dieser Arbeit vorgenommen, ist kein geeignetes Modell für die Entwicklung eines Emphysems als ein Kennzeichen des Krankheitsbildes der COPD. Auch verschiedene Expositionszeiten sowie ein unterschiedliches Alter der Tiere zum Expositionszeitpunkt hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Emphysementwicklung.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 6.1: Probenaufarbeitung für die Lichtmikroskopie

<p><u>Waschen:</u> 4 x 5 Min. in 0,1 M Na-Cacodylat, gepuffert</p> <p><u>Postfixierung:</u> 1 x 2 h 1% OsO₄ in 0,1 M Na-Cacodylat, gepuffert</p> <p><u>Waschen:</u> 4 x 5 Min. in 0,1 M Na-Cacodylat, gepuffert 2 x 5 Min. aqua bidest (ca. 1 h lagern)</p> <p><u>Blockkontrastierung: über Nacht</u> in halbgesättigten, wässrigen Uranylacetat</p> <p><u>Waschen:</u> 4 x 5 Min. aqua bidest</p>	<p><u>Entwässerung:</u> 2 x 1 h Aceton 70% 2 x 1 h Aceton 90% 1 x 1 h Aceton 100%</p> <p><u>Einbettung:</u> über Nacht Technovit + Härter 1/Aceton 1:1 über Nacht Technovit + Härter 1 (Infiltration) → + 1ml Härter 2/15ml Infiltrationslösung</p>
--	---

Tabelle 6.2 Verwendete Formel

Nr.	Parameter	Formel	Einheit
1	Volumendichte	$V_v(Y) = \frac{\sum P_Y}{\sum P_{ref}} \cdot 100[\%]$	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$
2	absolutes Volumen	$V(\text{Par}) = V(\text{Lung}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lung})$	ml
3	Lungenvolumen	$V_{\text{Lunge}} = W/G$	ml
4	Septenvolumen	$V(\text{Sept}) = V_v(\text{Sept}, \text{Par}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lung}) \times V(\text{Lung})$	ml
5	Oberflächendichte	$S_v(Y, ref) = \frac{2 \cdot \sum_{i=1}^n I_i}{l/p \cdot \sum_{i=1}^n P_i}$	$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$
6	Mean Chord Length	$CM = \frac{l/p \cdot \sum_{i=1}^n P_i}{\frac{\sum_{i=1}^n I_i}{2}}$	μm
7	Vol.-gew. mittl. Vol.	$\bar{V}_v = \frac{\pi}{3} \cdot l_0^3 = \frac{\pi}{3 \cdot n} \cdot \sum l_0^3, i$	μm^3

Tabelle 6.3 mittleres Organvolumen, volumengewichtetes mittleres Volumen der parenchymalen Lufträume, Mean Linear Chord Length, Oberflächendichte, Alveolaroberfläche

	mittleres Organvolumen	volumengewichtetes mittleres Volumen der parenchymalen Lufträume	Mean linear chord length
Parameter	V(lung) [ml]	V _v (alvw) [μm^3]	CM [μm]
55d NO ₂ (n=5)	0,98±0,06	69224±5935* °	61,0±6,8
55d Raumluft (RL) (n=5)	0,75±0,14	41546±7403*	46,6±3,5*
55d NO ₂ +Erholung (n=5)	0,88±0,13	59031±3254	57,5±5,4
25d NO ₂ , Alter: 8Wochen (n=6)	0,94±0,10	59558±5000*	65,3±11,0
25d RL, Alter: 8Wochen (n=6)	0,75±0,11	42084±5749* °	57,8±5,5*
25d NO ₂ , Alter: 1 Jahr (n=4)	1,23±0,09	52378±1512*	61,3±5,7
25d RL, Alter: 1 Jahr (n=4)	1,12±0,09	51852±3409*	71,1±7,44*

Mittelwerte \pm Stdabw.;

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

*signifikant für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

°signifikant für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte der V_v(alvw) sind signifikant für die Auswirkung der Exposition in Abhängigkeit vom Faktor Alter, $P \leq 0,001$

Tabellenwerte der CM sind signifikant für Faktor Alter im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,05$

	Oberflächendichte	Alveolaroberfläche
Parameter	$S_v(\text{alv})$ [mm^2/mm^3]	$S(\text{alv})$ [cm^2]
55d NO ₂ (n=5)	67±6°	538,6±66,6*
55d Raumluft (RL) (n=5)	80±6*	507,6±52,0
55d NO ₂ +Erholung (n=5)	72±6	529,7±49,1
25d NO ₂ , Alter: 8Wochen (n=6)	69±5°	532,0±35,8*
25d RL, Alter: 8Wochen (n=6)	67±6*	427,0±87,2
25d NO ₂ , Alter: 1 Jahr (n=4)	64±6	667±100,1*°
25d RL, Alter: 1 Jahr (n=4)	57±7*	515,4±67,8

Mittelwerte ± Stdabw.;

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

*signifikant für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftgruppen,

$P \leq 0,05$

°signifikant für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabelle 6.4 Volumen von Parenchym/Nichtparenchym, Alveole/Ductus, sowie ihre Volumendichten

Volumen von Parenchym/Nichtparenchym, Alveole/Ductus [mm³]

Parameter	V(par) [mm ³]	V(npar) [mm ³]	V(alv) [mm ³]	V(duct) [mm ³]
55d NO ₂ (n=5)	810±100*°	160±30	510±90*°	300±50*°
55d Raumluft (RL) (n=5)	630±140*	120±30*	420±40*	220±30*
55d NO ₂ +Erholung (n=5)	740±120	130±10	470±70	270±50
25d NO ₂ , Alter: 8Wochen (n=6)	800±100*°	130±10	510±60*°	290±40*°
25d RL, Alter: 8Wochen (n=6)	620±100*	120±30*	380±60*	240±40*
25d NO ₂ , Alter: 1 Jahr (n=4)	1050±70*	180±40	680±50*°	360±20*
25d RL, Alter: 1 Jahr (n=4)	920±140*	180±20*	580±80*	340±70*

Mittelwerte ± Stdabw.;

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

*signifikant für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

°signifikant für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte sind signifikant für Faktor Alter im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,029$

Tabellenwerte sind signifikant für Faktor Exposition im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,001$

Volumendichten von Parenchym/Nichtparenchym, Alveole/Ductus

Parameter	V _v (par,lung) [%]	V _v (npar,lung) [%]	V _v (alv,par) [%]	V _v (duct,par) [%]
55d NO₂ (n=5)	83±3	17±3	63±2	37±2
55d Raumluft (RL) (n=5)	84±4	15±4	66±2	34±2
55d NO₂+Erholung (n=5)	85±2	15±2	64±2	37±2
25d NO₂, Alter: 8Wochen (n=6)	85±2	14±2	64±2	36±2
25d RL, Alter: 8Wochen (n=6)	83±4	17±4	62±1	38±1
25d NO₂, Alter: 1 Jahr (n=4)	85±3	14±3	65±2	35±2
25d RL, Alter: 1 Jahr (n=4)	82±4	17±4	63±1	37±1

Mittelwerte ± Stdabw.;

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

Tabelle 6.5 Volumen von Luftraum gesamt/Septum/Kapillare, sowie ihre Volumendichten

Volumen von Luftraum gesamt/Septum/Kapillare [ml]

Parameter	V(luftraum) [ml]	V(sept) [ml]	V(kap) [ml]
55d NO ₂ (n=5)	0,70±0,11*°	0,09±0,02*°	0,03±0,01°
55d Raumlufte (RL) (n=5)	0,53±0,06*	0,08±0,01*	0,02±0,001
55d NO ₂ +Erholung (n=5)	0,64±0,12	0,09±0,02	0,02±0,002
25d NO ₂ , Alter: 8Wochen (n=6)	0,69±0,09*°	0,08±0,01*°	0,03±0,005°
25d RL, Alter: 8Wochen (n=6)	0,53±0,09*	0,07±0,01*	0,02±0,006
25d NO ₂ , Alter: 1 Jahr (n=4)	0,90±0,29*	0,11±0,04*°	0,03±0,01
25d RL, Alter: 1 Jahr (n=4)	0,80±0,13*	0,09±0,01*	0,03±0,01

Mittelwerte ± Stdabw.;

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

*signifikant für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftegruppen, $P \leq 0,05$

°signifikant für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte sind signifikant für Faktor Alter im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,024$

Tabellenwerte sind signifikant für Faktor Exposition im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,037$

Volumendichten von Luftraum gesamt/Septum/ Kapillare

Parameter	V _v (luftraum/par) [%]	V _v (sept/par) [%]	V _v (kap/par) [%]
55d NO₂ (n=5)	86±1°	11±1	3±1
55d Raumluf t (RL) (n=5)	84±3*	13±2*	3±0,4
55d NO₂+Erholung (n=5)	86±3	12±3	2±0,3
25d NO₂, Alter: 8Wochen (n=6)	86±1°	11±1	3±0,7
25d RL, Alter: 8Wochen (n=6)	85±2*	12±1*	3±0,9
25d NO₂, Alter: 1 Jahr (n=4)	86±2	11±1	3±1
25d RL, Alter: 1 Jahr (n=4)	87±0,3*	10±0,4*	3±0,4

Mittelwerte ± Stdabw.;

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

*signifikant für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumlufgruppen, $P \leq 0,05$

°signifikant für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte von V_v(sept/par) sind signifikant für Faktor Alter im Vergleich aller Gruppen, $P \leq 0,035$

Tabellenwerte von V_v(luftraum/par) sind signifikant für die Auswirkung der Exposition in Abhängigkeit vom Faktor Alter, $P \leq 0,027$

Tabelle 6.6 gewichtsspezifisches Volumen des Septengewebes, gewichtsspezifische Alveolaroberfläche, Körpergewicht

	gewichtsspezifisches Volumen des Septen- gewebes [mm ³ /kg]	gewichtsspezifische Alveolaroberfläche [cm ² /g]	Körpergewicht KG[g]
Parameter	V _G (sept) [mm ³ /mg]	S _G (alv) [cm ² /g]	KG[g]
55d NO₂ (n=5)	4,9±0,9*	30,1±3,5	17,9±1,5*°
55d Raumluft (RL) (n=5)	4,3±0,7*	26,6±2,3*	19,1±1,4*
55d NO₂+Erholung (n=5)	4,4±0,7	26,4±2,4	20,1±1
25d NO₂, Alter: 8Wochen (n=6)	5,0±0,4*	31,2±2,7	17,1±0,4*°
25d RL, Alter: 8Wochen (n=6)	3,7±0,3*	21,9±3,7*	19,5±1*
25d NO₂, Alter: 1 Jahr (n=4)	5,2±0,2*°	30,5±4,5°	21,9±0,4*°
25d RL, Alter: 1 Jahr (n=4)	3,7±0,4*	21,4±2,0*	24±1*

Mittelwerte ± Stdabw.;

Multi comparison test (Holm-Sidak-method), Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ für alle Gruppen mit Ausnahme von 55dNO₂+Erholung

*signifikant für Faktor Alter innerhalb der Expositionsgruppen bzw. innerhalb der Raumluftgruppen, $P \leq 0,05$

°signifikant für Faktor Exposition im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, $P \leq 0,05$

Tabellenwerte sind signifikant für die Auswirkung der Exposition in Abhängigkeit vom Faktor Alter, $P \leq 0,003$

7. Literaturverzeichnis

Barth PJ, Uhlarik S, Bittinger A, Wagner U, Ruschoff J (1994):

Diffuse alveolar damage in the rat lung after short and long term exposure to nitrogen dioxide.

Pathol Res Pract 190(1), 33-41

Barth PJ, Müller B, Wagner U, Bittinger A (1995):

Quantitative analysis of parenchymal and vascular alterations in NO₂-induced lung injury in rats.

Eur Respir J 8, 1115- 1121

Blank J, Glasgow JE, Pietra GG, Burdette L, Weinbaum G (1988):

Nitrogen-dioxide-induced emphysema in rats. Lack of worsening by beta-aminopropionitrile treatment.

Am Rev Respir Dis 137(2), 376-9

Cardoso W, Sekhon H, Hyde DM, Thurlbeck WM (1993):

Collagen and elastin in human pulmonary emphysema.

Am Rev Respir Dis 147, 975-981

Chang LY, Graham JA, Miller FJ, Ospital JJ, Crapo JD (1986):

Effects of subchronic inhalation of low concentrations of nitrogen dioxide. 1. The proximal alveolar region of juvenile and adult rats.

Toxicol Appl Pharmacol 30; 83(1), 45-61

Chen TS, Richie JP Jr, Lang CA (1990):

Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification.

Biol Fate Chem 18, 882-7

Chitano P, Hosselet JJ, Mapp CE, Fabbri LM (1995):

Effect of oxidant air pollutants on the respiratory system:

Insights from experimental research.

Eur Respir J 8, 1357-1371

Crapo JD, Barry BE, Chang LY, Mercer RR (1984):

Alterations in lung structure caused by inhalation of oxidants.

Toxicol Environ Health 13(2-3), 301-21

Crapo JD, Merver RR, Costa DL (1995):

Effects of prolonged exposure to low dose of nitric oxide or nitrogen dioxide on the alveolar septa of the adult rat lung.

Lab Invest 73(1), 20-8

Croxton TL, Weinmann GG, Senior RM and Hoidal JR (2002):

Future resarch directions in chronic obstructive pulmonary disease.

Am J Respir 165, 838-844

Croxton TL, Weinmann GG, Senior RM and Wise RA, Crapo JD, Buist AS (2003):

Clinical research in chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities.

Am J Respir 167, 1142-1149

Cruz Orive LM and Weibel ER (1981):

Sampling designs for stereologie.

J Microsc 122, 235-257

Cruz Orive LM and Weibel ER (1990):

Recent stereological methods for cell biology: a brief survey.

Am J Physiol 258, L148-L156

Ericsson S (1965):

Studies in α 1- antitrypsin deficiency.

Acta Med Scand 432, 1-85

Escolar JD, Gallego B, Tejero C, Escolar MA (1994):

Changes occurring with increasing age in the rat lung: morphometrical study.

Anat Rec 239(3), 287-96

Escolar JD, Gallego B, Escolar MA, Minana C, Roche M (1995):

Age and experimental obstructive emphysema. A morphometrical study on the rat.

Histol Histopathol 10(4), 875-87

Escolar JD, Martinez MN, Escolar MA, Arranz M, Gallego B, Roche PA (1996):

Tobacco smoke and age as risk factors in emphysema. Morphometrical study on the rat.

Histol Histopathol 11(1), 7-16

Escolar JD, Tejero C, Escolar MA, Montalvo F, Garisa R (1997):

Architecture, elastic fiber, and collagen in the distal air portion of the lung of the 18-month-old rat.

The Anatomical Record 248: 63-69

Fabbri LM, Chitano P, Hosselet JJ, Mapp CE (1995):

Effect of oxidant air pollutants on the respiratory system: insights from experimental animal research.

Eur Respir Journal 8, 1357-71

Fanucchi MV, Plopper CG (2004):

The Lung: Development, Aging and the Environment

Environmental toxicants and lung development in experimental models (Chapter 25).

Copyright © 2004 Elsevier

ISBN 0 12 324751 9

Fehrenbach A, Ochs M, Wittwer T, Cornelius J, Fehrenbach H, Wahlers T, Richter J (1998):

Stereological estimation of the volume weighted mean volumes of alveoli and acinar pathways in the rat lung to characterise alterations after ischaemia/reperfusion.

J Anat 194, 127-135

Fehrenbach H (2002):

Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks.

Pathobiology 70, 277-283

Fehrenbach H (2006):

Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective.

Eur Respir Rev 15, 136-147

Fehrenbach H und Ochs M (1998):

Methods in Pulmonary Research

Studying lung ultrastructure.

edited by Uhlig S and Taylor AE.

Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 429-454

Fisk DE und Kuhn C (1976):

Emphysema-like changes in the lungs of the blotchy mouse.

Rev Respir Dis 113, 787-797

Fukuda Y, Masuda Y, Ishizaki M, Masugi Y, Ferrans J (1989):

Morphogenesis of abnormal elastic fibers in lung of patients with panacinar and centriacinar emphysema.

Hum Pathol 20, 652-659

Gillooly M und Lamb D (1993):

Airspace size in lungs of lifelong non-smokers: effect of age and sex.

Thorax 48(1), 39-43

Glasgow JE, Pietra GG, Abrams WR, Blank J, Oppenheim DM, Weinbaum G (1987):
Neutrophil recruitment and degranulation during induction of emphysema in the rat by
nitrogen dioxide.

Am Rev Respir 135, 1129-1136

Global Initiative for chronic obstructive pulmonary disease (GOLD) 2003:

Global Strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD: 2003 update.

Eur Respir J 22, 1-2

Green FHY and Pinkerton KE (2004):

The Lung: Development, Aging and the Environment
Environmental Determinants of Lung Aging (Chapter 28).

Copyright © 2004 Elsevier

ISBN 0 12 324751 9

Green MC, Sweet HO und Bunkler LE (1976):

Tight skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue
and skeleton.

Am J Pathol 82, 493-512

Gross P, Pfitzer EA, Tolker E (1965):

Experimental emphysema. Its production with papain in normal and silicotic rats.

Arch Environ Health 11, 50-8

Gundersen HJG, Jensen HB (1985):

Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles
observed on random sections.

Journal of Microscopy 138, 127-142

Gundersen HJ, Jensen EB (1987):

The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction.

J Microsc Sep 147(Pt 3), 229-63

Herold G (2003):

Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung.

Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie (2003):

Lufthygienischer Jahresbericht 2002

Luftreinhaltung, Wiesbaden

Higashimoto Y, Fukuchi Y, Shimada Y (1991):

The effects of aging on the function of alveolar macrophages in mice.

Mech Aging Dev 69, 207-17

Howard CV and Reed MG (1998):

Unbiased Stereologie.

Three-dimensional measurement in microscopy.

Oxford: BIOS Scientific Publishers.

Hunter WJ, Edwards JD, Thorpe PE, Rowley J, Aqrawal DK, Cavallari N, Abebe W (1993):

Functional and morphological assessment of rat aorta stored in University of Wisconsin and Eurocollins solution.

Transplantation 56(4), 808-16

Kawakami M, Paul JL, Thurlbeck WM (1984):

The effect of age on lung structure in male BALB/cNNia inbred mice.

Am J Anat, 170-1

Kawakami M, Yasui S, Yamawaki I, Katayami M, Nagai A, Takizawa T (1989):

Structural changes in airways of rats exposed to nitrogen dioxide intermittently for seven days: comparison between major bronchi and terminal bronchioles.

Am Rev Respir 40, 1754-1762

Kleeberger SR (2004):

The Lung: Development, Aging and the Environment

Genetic factors involved in susceptibility to lung disease (Chapter 19)

ISBN 0 12 324751 9

Copyright © 2004 Elsevier

Kleinerman J (1977):

Some effects of nitrogen dioxide on the lung.

Fed Proc 36, 1714-8

Kleinerman J, Ip MPC, Sorensen J (1982):

Nitrogen dioxide exposure and alveolar macrophage elastase in hamsters.

Am Rev Respir Dis 125, 203-207

Kubota K, Murakami M, Takenaka S, Kawai K, Kyono H (1987):

Effects of long-term nitrogen dioxide exposure on rat lung: morphological observations.

Environ Health Perspect 73, 157-69

Lucocq J (1993):

Unbiased 3-D quantitation of ultrastructure in cell biology.

Trends Cell Biol 3(10), 354-8

Luft FC (1999):

Alpha-1-Antitrypsin and its relevance to human disease.

J Mol Med 77, 359-360

Lungarella G, Cavarra E, Bartalesi B, Lucattelli M, Fineschi S, Lunghi B, Gambelli F, Ortiti LA, Martorana PA (2001):

Effects of cigarette smoke in mice with different levels of α_1 -proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants.

Am J Respir Crit Care Med 164, 886-890

Mahadeva R, Shapiro SD (2002):

Chronic obstructive pulmonary disease. 3: Experimental animal models of pulmonary emphysema.

Thorax 57, 908-914

Mannino DM, FCCP (2002):

COPD, Epidemiology, Prevalence, Morbidity and Mortality, and Disease Heterogeneity.

CHEST 121, 121-126

Massaro GD, Massaro D (1992):

Formation of alveoli in rats: postnatal effect of prenatal dexamethasone.

American Journal of Physiology 263, L37-L41

Mauderly JL (1979):

Effect of age on pulmonary structure and function of immature and adult animals and man.

Fed Proc 38(2), 173-7

Mayhew TM (1991):

The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs.

Exp Physiol 76(5), 639-65

McGowan SE, Snyder JM (2004):

The Lung: Development, Aging and the Environment.

Development of Alveoli (Chapter 4).

Copyright © 2004 Elsevier

ISBN 0 12 324751 9

Mercer RR, Costa DL, Crapo JD (1995):

Effects of prolonged exposure to low doses of nitric oxide or nitrogen dioxide on the alveolar septa of the adult rat lung.

Lab Invest 73(1), 20-8

Moshhammer H, Hutter H-P, Hauck H and Neuberger M (2006):

Low levels of air pollution induce changes of lung function in a panel of schoolchildren.

Eur Respir J 27, 1138-1143

NHANES III, Plan and operation of the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994

Vital Health Stat 1(32), 1-407

Ochs M (2006):

A brief update on lung stereology.

J Microsc 222, 188-200

Pinkerton KE, Weller BL, Menache MG, Plopper CG (1998):

Consequences of prolonged inhalation of ozone on F344/N rats: collaborative studies. Part 13. A comparison of changes in the tracheobronchial epithelium and pulmonary acinus in male rats at 3 and 20 months.

Res Rep Health Eff Inst 65, 1-32

Pinkerton KE and Green FHY (2004):

The Lung: Development, Aging and the Environment.

Normal aging of the lung (Chapter 15).

Copyright © 2004 Elsevier

ISBN 0 12 324751 9

Plopper CG and Fanucchi (2004):

The Lung: Development of Airway Epithelium (Chapter 2)

Copyright © 2004 Elsevier

ISBN 0 12 324751 9

Pump KK (1976):

Emphysema and its relation to age.

Am Rev Respir Dis 114(1), 5-13

Ranga V, Kleinerman J (1980):

Intraalveolar pores in mouse lungs.

Am Rev Respir Dis 122, 477-81

Ranga V, Kleinerman J (1981):

Lung injury and repair in the blotchy mouse. Effects of nitrogen dioxide inhalation.

Rav Respir Dis 123(1), 90-7

Repine JE, Bast A and Lankhorst I (1997):

Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative stress study group.

Am J Respir Crit Care Med 156, 341-357

Riley DJ, Kramer MJ, Kerr JS, Chae CU, Yu SY, Berg RA (1987):

Damage and repair of lung connective tissue in rats exposed to toxic levels of oxygen.

Am Rev Respir Dis 135, 441-447

Roe FJ (1985):

Certain aspects of responses of laboratory rats to exposure to (a) nitrogen dioxide and (b) tobacco smoke.

Tokai J Exp Clin Med 10(4); 363-9

Sagai M, Ichinose T (1982):

Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. Changes of the protective systems in rat lungs and of lipid peroxidation by acute exposure.

Toxicol Appl Pharmacol 9, 153-164

Sagai M, Ichinose T, Kubota K (1984):

Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. Relation between the change of lipid peroxidation and the antioxidative protective system in rat lungs upon life span exposure to low levels of NO₂.

Toxicol Appl Pharmacol 73, 444-456

Samoli E, Aga E, Touloumi G, Nisiotis K, Forsberg B, Lefranc A, Pekanen J, Wojtyniak B, Schindler C, Niciu E, Brunstein R, Dodic Fikfak M, Schwartz J and Katsouyanni K (2006):

Short-term effects of nitrogen dioxide on mortality: analysis within the APHEA project.

Eur Respir J 27, 1129-1137

Scherle W (1970):

A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology.

Mikroskopie 26, 57

Senatsverwaltung für Gesundheit, Umwelt und Verbraucherschutz:

Gesetzlich festgelegte Grenz- und Zielwerte für die Beurteilung der Luftqualität.

<http://www.berlin.de/sen/umwelt/luftqualität/de/messnetz/grenzwerte.shtml>

Shapiro SD, Endicott SD, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ (1991):

Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and weapons-related radiocarbon.

J Clin Inves 87, 1828-1834

Sin DD, MD, MPH ; McAlister FA, MD, MSc ; Man SFP, MD ; Anthonisten NR, MD, PhD (2003):

Contemporary management of chronic obstructive pulmonary disease.

JAMA 290, 2301-2312

Smiley-Jewell S, Van Winkle LS (2004):

The Lung: Development, Aging and the Environment.

Repair of Environmental lung injury during development (Chapter 26).

Copyright © 2004 Elsevier

ISBN 0 12 324751 9

Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, Bengali ZH (1985):

The definition of emphysema: Report of a national heart, lung and blood institute, division of lung disease workshop.

Am Rev Respir Dis 132, 182-185

Snider GL (1986):

Experimental studies on emphysema and chronic bronchial injury.

Eur J Respir Dis Suppl 146, 17-35

Snider GL (1998):

Cadmium-chloride-induced-airspace-enlargement with interstitial pulmonary fibrosis is not associated with destruction of lung elastin – implications for the pathogenesis of human emphysema.

Am Rev Respir Dis 137, 918-923

Suki B, Lutchen KR, Ingenito EP (2003):

On the progressive nature of emphysema.
Am J Respir 168, 516-521

Turner JM, Mead J, Wohl ME (1968):

Elasticity of human lungs in relation to age.
J Appl Physiol 25, 664-671

Verbeken EK, Cauberghs M, Mertens I, Clement J, Lauweryns JM, Van de Woestijne KP (1992):

The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 2. Functional aspects.

Chest 101(3), 800-9

Wegmann M, Renz H, Herz U (2003):

Long-Term NO₂ Exposure Induces Pulmonary Inflammation and Progressive Development of Airflow Obstruction in C57BL/6 Mice: A Mouse Model for Chronic Obstructive Pulmonary Disease?

Pathobiology 70, 284-286

Weibel ER (1980):

Stereological methods. Vol. 2: Theoretical foundations.
Academic Press, London.

Weibel ER, Hsia CC, Ochs M (2007):

How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry.

J Appl Physiol 102, 459-67

Wright JI, Churg A (1995):

Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair.

Am J Physiol 268, L17-L20

Wüthrich B (2001):

Epidemiology of allergic disease in Switzerland.

Therapeut Umschau 58; 5

Lebenslauf

Zur Person

Barbara Landenberger

geboren am 03. Januar 1979 in Minden (Westf.)

ledig

Berufspraxis

Seit 08/ 2007

Tätigkeit als Assistenzärztin der Inneren Medizin im Allgemeinen Krankenhaus Winsen (Luhe)

Praktisches Jahr

12/ 2006 - 03/ 2007

Innere Medizin (Allgemeine Innere, Geriatrie)
Solothurnische Höhenklinik Allerheiligen

(Schweiz)

08/ 2006 - 12/ 2006

Chirurgie (Unfallchirurgie, Abdominalchirurgie)
Rotes Kreuz Krankenhaus Kassel

04/ 2006 - 08/ 2006

Neurologie (Wahlfach)
Städtisches Klinikum Kassel

Studium

03/ 2000 – 03 / 2007

Studium der Humanmedizin an den Universitäten Hamburg und Marburg

06/ 2007

Dritter Abschnitt Gesamtnote zwei

04/ 2006

Zweiter Abschnitt Gesamtnote: zwei (1,66)

09/ 2003

Erster Abschnitt Gesamtnote: drei

09/ 2002

Ärztliche Vorprüfung Gesamtnote: drei

04/ 1999 - 09/ 1999

Studium der Fächer Biologie und Spanisch an
der Universität Bielefeld

Schulische Ausbildung

1989 - 1998

Ratsgymnasium Minden

1986 - 1989

Grundschule Minden

Weiterbildung

10/ 1999 - 11/ 1999

Englische Sprachausbildung in Cambridge/
Großbritannien

08/ 1998 - 02/ 1999

Spanische Sprachausbildung in Barcelona/
Spanien

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
in Hamburg

Schumacher, Lorke, Thies, Mayr, Guse, Jücker, Windhorst, Beisiegel, Wagener, Jung,
Horst, Streichert, Nollau, Wegscheider, Berger, Aepfelbacher, Sobottka, Kaulfers,
Polywka, Meyer, Kral, Scharein, Moll, Ehmke, Bauer, Blank, Bullinger, Kaller, Kawski

in Marburg

Fehrenbach, Vogelmeier, Werner, Wagner, Kalder, Schmidt, Kühnert, Hellmeyer,
Gress, Ellenrieder, Neubauer, Maisch, Hoyer, Bals, Köhler, Schneider, Binkowski,
Kolb-Niemann, Wulf, Kroll, Moosdorf, Fuchs-Winkelmann, Rucholtz, Hofmann, Bartsch,
Hertl, Lohoff, Maier, Loff, Klingmüller, Mattejat, Martin, Hamer, Sommer, Krieg, Kill,
Funck, Klose.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Professor Dr. Fehrenbach bedanken, der mir viele Anregungen gegeben und sich mit großer Präzision um meine Arbeit bemüht hat.

Ebenso möchte ich Karl-Heinz Magnus danken, der mit mir in die „Erforschung“ der Stereologie eingetreten ist und dem Material und Methoden Abschnitt seine Logik gegeben hat.

Des Weiteren möchte ich meiner Mutter, wer könnte besser dafür geeignet sein, für die Durchsicht auf Rechtschreib- und Satzbaufehler danken. Ein weiteres Dankeschön geht an Stefan, der meine fehlenden Fertigkeiten bei der Formatierung ersetzt hat.

Last but not least möchte ich meiner Schwester danken, die mit mir das gleiche Schicksal teilt.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Quantitativ-histologische Untersuchung der Auswirkungen einer inhalativen Stickstoffdioxid-Exposition der Maus - Einfluss von Expositionsdauer und Lebensalter in der Klinik für Innere Medizin – SP Pneumologie unter Leitung von Prof. Dr. Fehrenbach mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fehrenbach ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ort, Datum

Barbara Landenberger