

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Geschäftsführende Direktorin Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus
Bereich „Experimentelle Pneumologie“
der Universität zu Lübeck



**Geschlechtsspezifische Unterschiede
bei der Emphysementwicklung
Surfactant Protein-D defizienter Mäuse**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Sarah Kristina Liefländer
aus Wickede
Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Fehrenbach
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Cordula Stamme

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.02.2010

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meiner Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung.....	1
2.1	Einführung in das Thema.....	1
2.2	Die Lunge der Maus.....	2
2.2.1	Unterschiede in der Anatomie der Lunge von Mensch und Maus	2
2.2.2	Physiologischer Alterungsprozess der Mäuselunge	3
2.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Lunge	5
2.4	Pathogenese des Emphysems	6
2.5	Der pulmonale Surfactant	9
2.5.1	Zusammensetzung und Produktion	10
2.5.2	Surfactant Lipide.....	11
2.5.3	Surfactant Proteine	12
2.5.3.1	SP-A.....	12
2.5.3.2	SP-B und SP-C	13
2.5.3.3	SP-D.....	14
2.5.3.3.1	Funktionen von SP-D.....	16
2.5.3.3.1.1	Interaktion mit Körperzellen	16
2.5.3.3.1.2	Interaktion mit körperfremden Zellen	18
2.5.3.3.2	Pro- und antiinflammatorische Eigenschaften von SP-D..	19
2.6	SP-D knockout Mäuse, SP-D und Emphysem	20
2.7	Zielsetzung.....	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Chemikalien	23
3.1.1.1	Materialgewinnung und Fixierung.....	23
3.1.1.2	Technoviteinbettung und Eindeckung	24
3.1.1.3	Richardsonfärbung	25
3.1.1.4	DNA-Purifikation und Polymerase Kettenreaktion.....	25
3.1.2	Geräte	27
3.1.3	SP-D knockout Mäuse	27
3.2	Methoden	29
3.2.1	Tierpräparation, Instillation und Volumenbestimmung.....	29
3.2.2	Einbettung.....	30
3.2.3	Schneiden der Blöcke am Rotationsmikrotom	32
3.2.4	Färbung	32
3.2.5	DNA Purifikation und Polymerase Kettenreaktion	33
3.2.6	Stereologische Auswertung	36
3.2.6.1	Prinzipien der Stereologie	36
3.2.6.2	Tissue Sampling.....	38
3.2.7	Messungen	39
3.2.7.1	Parameter zur Beurteilung der Kompartimente.....	41
3.2.7.2	Parameter zur Beurteilung der Gasaustauschfläche.....	43
3.2.8	Explorative Statistik und Datendarstellung.....	47

4	Ergebnisse	48
4.1	Körpergewicht	48
4.2	Lungenvolumen und massenspezifisches Lungenvolumen	49
4.3	Volumenveränderungen der Kompartimente	51
4.3.1	Nicht-Parenchym	51
4.3.2	Parenchym	52
4.4	Veränderungen der Gasaustauschräume	60
5	Diskussion	65
5.1	Methodik	65
5.1.1	Die Maus als Tiermodell in der Emphysemforschung	65
5.1.2	Materialauswahl, Gewebegewinnung, Fixierung, Sampling	66
5.2	Ergebnisse	67
5.2.1	Biologische Vorraussetzungen	67
5.2.2	Veränderungen der Lungenstrukturen	67
5.2.2.1	Veränderungen der Gasaustauschfläche und des MsV	67
5.2.2.2	Veränderungen der Kompartimente	71
5.3	Limitierung der Auswertungen	75
5.4	Klinische Relevanz der Arbeit	76
6	Zusammenfassung	78
7	Literaturverzeichnis	80
8	Anhang	88
8.1	Abkürzungsverzeichnis	88
8.2	Tierversuche	91
9	Danksagung	92
10	Lebenslauf	93

2 Einleitung

2.1 Einführung in das Thema

Der pulmonale Surfactant und seine Proteine haben vielfältige Funktionen. Bis vor wenigen Jahren bestand nach allgemeiner Auffassung die Hauptaufgabe des Surfactant in der Regulation der alveolären Oberflächenspannung, jedoch hat sich herausgestellt, dass vor allem den Surfactant Proteinen (SP-) A und D eine Schlüsselfunktion bei der Surfactant-Homöostase und der Abwehr viraler und bakterieller Pathogene zukommt (Kingma und Whitsett 2006). Es ist inzwischen bekannt, dass die Lungen von SP-D defizienten Mäusen pathologische Veränderungen der Atemwege aufweisen, die denen anderer Krankheitsbilder mit entzündlichen und parenchymdestruktiven Prozessen ähneln. Bisherige Studien an SP-D defizienten Mäusen haben pulmonale Veränderungen während der postnatalen Entwicklung der Versuchstiere dargestellt, wie sie auch bei Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease = COPD) bzw. dem Emphysem beobachtet werden. Darüber hinaus konnten verschiedene Forschungsgruppen zeigen, dass Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen mitunter Abnormalitäten ihres SP-D Haushalts aufweisen (Hirama et al. 2007). So findet man unter anderem bei der COPD, bei der cystischen Fibrose und bei dem Akuten Progressiven Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome = ARDS) reduzierte Spiegel an bronchoalveolärem SP-D (Hartl und Griesse 2006). Die therapeutische Anwendung von SP-D erscheint sinnvoll, jedoch fehlen bisher noch weiterführende Studien, die die genauen Mechanismen seiner Funktionen erklären könnten (Clark und Reid 2003; Kingma und Whitsett 2006). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzte 2007, dass die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung bis zum Jahre 2030 zur dritthäufigsten zum Tode führenden Krankheit der industrialisierten Welt aufsteigen werde. Obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen auch heute

noch zu großen Teilen ungeklärt sind hat sich heraus gestellt, dass Surfactant Protein-D bei der Pathogenese von COPD eine Rolle spielen könnte.

Weiterhin ist bekannt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede der Morphologie von Lungen, der Anfälligkeit für emphysematöse und karzinogen-metabolische Prozesse sowie der Progredienz verschiedener chronischer Atemwegserkrankungen gibt (Silverman et al. 2000; Massaro und Massaro 2004; Stelck et al. 2005).

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, den Einfluss eines Mangels an SP-D auf die weibliche und männliche Lunge im Zusammenhang mit dem Alter genauer zu beleuchten. In dieser Arbeit wurden beide Geschlechter getrennt voneinander untersucht, so dass nicht nur Rückschlüsse auf den generellen Einfluss eines SP-D Mangels auf den Organismus der Versuchstiere, sondern auch auf die geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Reaktionen möglich sind.

2.2 Die Lunge der Maus

2.2.1 Unterschiede in der Anatomie der Lunge von Mensch und Maus

Bezüglich der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie der Lunge sei auf Lehrbücher der Anatomie verwiesen, weswegen hier lediglich die Unterschiede zwischen menschlicher und Mäuselunge aufgezeigt werden sollen.

Im Gegensatz zum Menschen besteht der rechte Lungenflügel der Maus aus 4-5 Lobi, der linke aus einem (Abbildung 1). Es gibt keine bis wenige respiratorische Bronchiolen und kaum submuköse Drüsen (Irvin und Bates 2003). Clara Zellen finden sich bei der Maus schon weiter proximal als beim Menschen. Bereits in der Trachea beträgt ihr Anteil am Epithel 49%; in den Bronchiolen erhöht sich dieser auf bis zu 80% (Pinkerton und Green 2004). Die Totalkapazität der Mäuselunge beträgt, abhängig von Körpergröße und –gewicht ca. 1 Milliliter, die des Menschen ungefähr 6 Liter. Zwei weitere

Unterschiede sind der höhere Alveolarseptenanteil der Maus (18% im Vergleich zu 12% beim Menschen) und die kleinere Alveolengröße (80µm Mean Linear Intercept zu 210µm) (Irvin und Bates 2003). Allerdings gibt es auch zwischen den verschiedenen Mäusearten deutliche Unterschiede (Soutiere und Mitzner 2006).

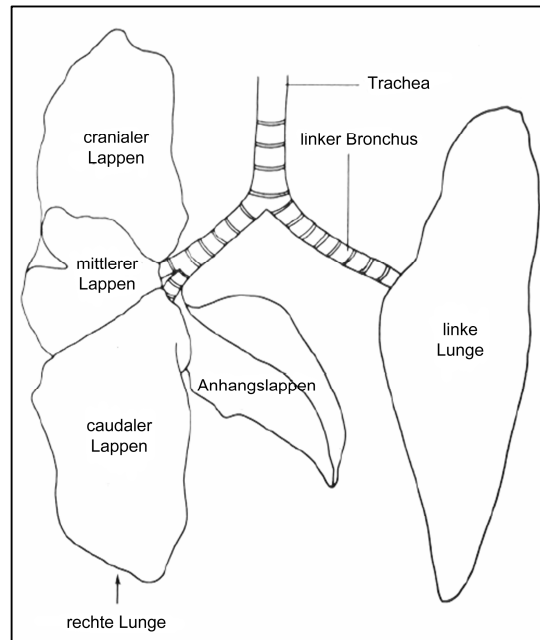


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Mäuselunge (nach Cook 1976)

2.2.2 Physiologischer Alterungsprozess der Mäuselunge

Die mittlere Lebenserwartung von Labormäusen, wie zum Beispiel des Stammes C57/BL6, beträgt etwa 24-30 Monate. Man kann die Entwicklung der Maus in zwei Phasen einteilen. Im Alter von einem bis ca. neun Monaten steht das Wachstum im Vordergrund, so dass Körpergewicht, Lungenvolumen und die Alveolargröße (Mittlere freie Alveolenweite = mean chord length (Cm)) zunehmen. Die postnatale Alveolarisierung ist mit circa 3 Wochen abgeschlossen und mit zwei bis drei Monaten werden die Mäuse geschlechtsreif (Kawakami et al. 1984). Prozesse, die sich nach der Vervollständigung des Wachstums und der Entwicklung vollziehen, werden allgemein als Altern bezeichnet. Alterungsprozesse sind genetisch

vorprogrammiert, werden jedoch durch äußere Einflüsse moduliert. Dies bedeutet bezogen auf die Mäuselunge, dass charakteristischerweise Lungenvolumen, Körpergewicht und alveoläre Oberfläche weiter zunehmen während die Alveolargröße relativ konstant bleibt, bzw. nur leicht steigt. Gleichzeitig nimmt der Anteil an septalem Gewebe und interalveolären Poren zu (Pinkerton und Green 2004).

Es besteht eine enge Beziehung zwischen dem Körpergewicht und beispielsweise dem Lungenvolumen, der Alveolaroberfläche und der Diffusionskapazität. Wenn die Maus im Laufe ihres Lebens, besonders in den ersten drei Monaten, an Gewicht und Größe zunimmt, steigt gleichzeitig auch das Lungenvolumen an. Im Alter vergrößern sich die Alveolen, die interalveolären Poren werden größer und der Gehalt an elastischen Fasern wird kleiner. Somit sinkt die Elastizität, es vergrößert sich die Compliance und es besteht eine vermehrte Tendenz zu Hyperinflation und Emphysementwicklung (Pinkerton und Green 2004). Im Alter wird bei Menschen und Nagern ein Verlust an Alveolen sowie alveolärer Oberfläche durch Vergrößerung der einzelnen Alveolen festgestellt (Massaro und Massaro 2006). Die zum Gasaustausch zur Verfügung stehende Oberfläche verkleinert sich, während das Lungenvolumen insgesamt unverändert bleibt. Darüber hinaus nimmt die Diffusionskapazität ebenfalls ab. Männer „altern“ diesbezüglich zunächst schneller als Frauen, die bis zur Menopause deutlich langsamer an Lungenfunktion verlieren (Massaro und Massaro 2006). Die Zahl der Makrophagen und anderer phagozytierender Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von alternden Mäusen ist erheblich höher als bei jungen Tieren. Die einzelnen Zellen produzieren jedoch weniger proinflammatorische Substanzen, so dass die Immunabwehr insgesamt beschränkt wird (Pinkerton und Green 2004).

2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Lunge

Es ist seit langem bekannt, dass sich die Lungen weiblicher und männlicher Individuen sowohl in anatomischer, als auch in physiologischer Hinsicht unterscheiden (Massaro et al. 1995; Massaro und Massaro 2004). Um den Anforderungen an den weiblichen Organismus während der Schwangerschaft und der Stillzeit gerecht zu werden, zeigen weibliche Säugetiere im Vergleich zu gleichaltrigen männlichen Tieren deutliche morphologische und funktionelle Unterschiede in der Beschaffenheit ihrer Lungen. Die Gasaustauschoberfläche der Lunge (S) ist direkt proportional zur Sauerstoffaufnahme (VO_2), also $S \sim VO_2$, und die Größe der Alveolen verhält sich umgekehrt proportional zum massenspezifischen VO_2 (Massaro und Massaro 2004). Kurzfristig gesteigerter Sauerstoffbedarf wird hauptsächlich über erhöhte Ventilation und Perfusion gedeckt. Obwohl weibliche Ratten und Mäuse, während sie trächtig sind, über längere Zeit ungefähr doppelt so viel Sauerstoff aufnehmen wie gleichaltrige nicht trächtige Tiere, bleibt ihre Gasaustauschoberfläche in etwa konstant. Die Anpassungsreaktion der weiblichen Lunge ist somit nicht durch eine Vergrößerung der Gasaustauschoberfläche zu erklären. Vielmehr ist es so, dass die Lungen der Mäuseweibchen ohnehin ein um 28% größeres massenspezifisches Lungenvolumen aufweisen, ihre Alveolen ungefähr 50% kleiner sind und sie insgesamt fast doppelt so viele Alveolen besitzen wie ihre männlichen Artgenossen. Die massenspezifische Alveolaranzahl ist also bei gleicher VO_2 bei den Weibchen um 80% erhöht. So können sie der erhöhten VO_2 in der Schwangerschaft und Stillzeit begegnen (erhöhtes massenspezifisches VO_2 durch zum Beispiel erhöhtes Körpergewicht), ohne, dass es hierzu eines adaptiven Lungenwachstums bedürfte (Massaro et al. 1995; Massaro und Massaro 2004).

Des Weiteren sind die Atemwege in der weiblichen Lunge enger, sie verfügen über eine geringere Vitalkapazität und über eine kleinere maximale expiratorische Flussrate als gleichaltrige und gleich große männliche Artgenossen. Die hormonellen Einflüsse von Östrogen und Progesteron

während der verschiedenen Phasen des weiblichen Zyklus beeinflussen Ventilation, Substratmetabolismus, Thermoregulation, Diffusionskapazität und die Lungenfunktion unter Belastung (Harms 2006). Auch die geschlechtsspezifische Verteilung der beiden bekannten Östrogenrezeptoren ER α und ER β (estrogen receptor α und β) hat wesentliche Auswirkungen auf den Metabolismus in der Lunge. Während ER β bei beiden Geschlechtern etwa in gleichem Maße ausgeprägt ist, wird ER α bei Frauen stärker exprimiert. Man geht davon aus, dass besonders ER α aktivierend auf den Metabolismus karzinogener Stoffe wirkt (Han et al. 2005). Es hat sich gezeigt, dass die Inhalation von Naphthalen, von einem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff (PAH = polycyclic aromatic hydrocarbon), der chemischer Hauptbestandteil von Zigarettenrauch ist und auch in Dieselabgasen vorkommt, bei Versuchstieren akute Entzündungsreaktionen hervorruft (Van Winkle et al. 2002; Stelck et al. 2005). Naphthalen scheint besonders die Clara Zellen zu schädigen, was bei Weibchen nicht nur ausgeprägter, sondern auch früher und bereits weiter proximal in den Luftwegen zu beobachten ist als bei Männchen. Die zytotoxischen Metabolite des PAH-Stoffwechsels und die Inzidenz von Adenokarzinomen nach Naphthalen-Exposition sind bei weiblichen Mäusen erhöht. Dies suggeriert, dass der weibliche Hormonhaushalt, speziell Östrogen, die Empfindlichkeit der Lunge für karzinogene Stoffe erhöht. Die zugrunde liegenden Mechanismen erklären so möglicherweise, warum Frauen bei gleicher Karzinogenanamnese häufiger an COPD und Lungenkrebs, insbesondere Adenokarzinomen, erkranken (Van Winkle et al. 2002; Stelck et al. 2005).

2.4 Pathogenese des Emphysems

Als pulmonales Emphysem bezeichnet man die irreversible Parenchymdestruktion der Alveolen und somit der für den Gasaustausch verfügbaren Oberfläche distal der Bronchioli terminales, sowie einen Verlust an

Gewebeelastizität. Es gibt zwei Hauptformen des Emphysems; auf der einen Seite das panazinäre Emphysem, welches sich überwiegend aufgrund eines α_1 -Antitrypsin-Mangels entwickelt, auf der anderen das zentrolobuläre Emphysem, dessen Ursache meist prolongierter Nikotinabusus ist (Vlahovic et al. 1999). Wenn über die Vergrößerung der Alveolen hinaus eine, meist progrediente, chronische Entzündung und Obstruktion der kleinen Atemwege, eine peribronchiale Fibrose und eine erhöhte Mukusproduktion vorliegen, spricht man von Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung. Nach aktueller Vorstellung vergrößern sich die Alveolen auf dem Boden einer chronischen Entzündung und eines Ungleichgewichts im Proteasen / Antiproteasenhaushalt (Vogelmeier et al. 2006; Herold und Mitarbeiter 2007; Koczulla und Vogelmeier 2008).

Die molekularen Mechanismen der Emphysementstehung sind bis heute nicht vollständig geklärt. Die folgende Grafik gibt einen Überblick über das gegenwärtige Verständnis der zellulären Grundlagen.

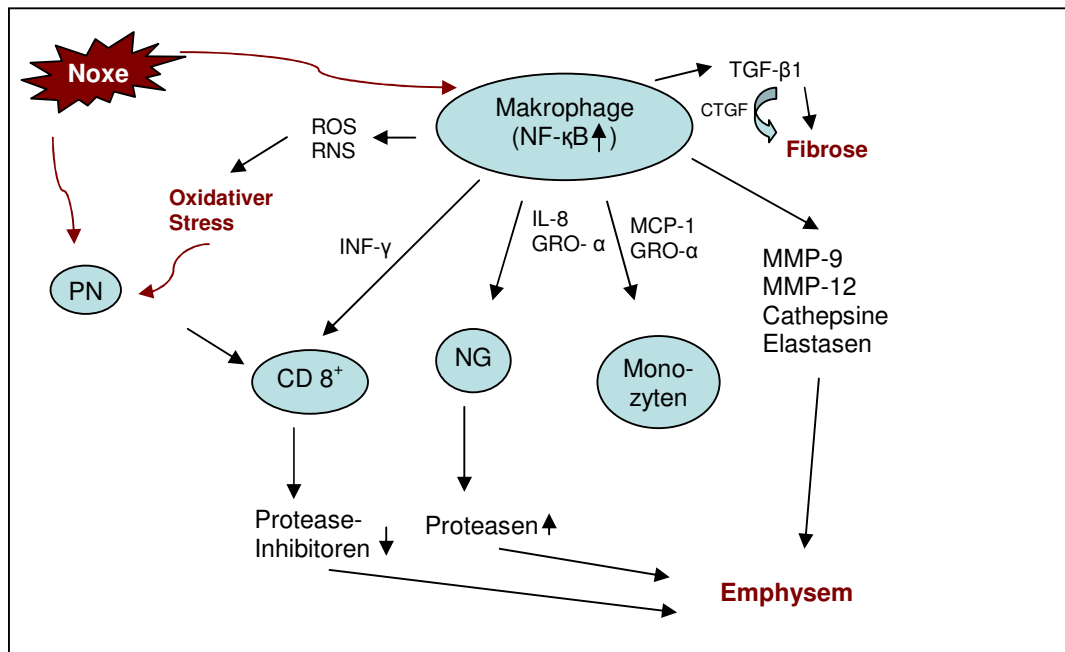


Abbildung 2: Zelluläre Mechanismen der Emphysem- und COPD-Entstehung (nach Barnes et al. 2003; Vogelmeier et al. 2006). PN: Pneumozyten, ROS: Reaktive Sauerstoffmetabolite, RNS: Reaktive Stickstoffmetabolite, NG: Neutrophile Granulozyten, CD8⁺: T-Lymphozyten, INF-γ: Interferon -γ, IL-8: Interleukin 8, GRO- α: growth related oncogene α, MCP-1: macrophage chemotactic protein 1, MMP: Metalloproteinase, NF-κB: nuclear factor- κB, TGF- β1: transforming growth factor -β1, CTGF: connective tissue growth factor

Zu Beginn steht die Schädigung des Lungenparenchyms durch relevante Noxen wie etwa Zigarettenrauch oder länger andauernde Kolonisierung mit Pathogenen. Diese greifen unter anderem die Alveolarepithelzellen an und führen zu einer Aktivierung der Alveolarmakrophagen, deren Zahl sich im Verlauf drastisch erhöht. Die Makrophagen setzen vermehrt proinflammatorische Substanzen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), growth related oncogene- α (GRO- α), macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1), Interleukine, Leukotriene, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite (ROS und RNS) frei, welche positive chemotaktische Signale an CD8⁺ T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Monozyten übermitteln, so dass diese in das betroffene Areal einströmen (Vogelmeier et al 2006). Die Neutrophilen sezernieren verstärkt Proteasen; gleichzeitig werden die Proteaseinhibitoren, wie zum Beispiel α_1 -Antitrypsin und tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3), gehemmt. Es kommt zum proteolytischen Verdau von Epithelzellen und Destruktion von elastischen Fasern. Die Makrophagen schütten vermehrt Metalloproteinasen (MMPs) aus, die die Antiproteasen zusätzlich hemmen.

Wahrscheinlich vermittelt durch Caspasen und Mangel an vascular endothelial growth factor (VEGF) kommt es zu gesteigerter Apoptose von Alveolar- und Bronchiolarepithelzellen sowie Endothelzellen. Unter anderem durch eine vermehrte Sekretion reaktiver Metabolite verschlechtert sich zudem die mukoziliäre Clearance. Das Resultat ist die Akkumulation apoptotischen Zellmaterials in den kleinen Atemwegen, was die chronische Entzündung und Alveolardestruktion zusätzlich fördert (Barnes et al. 2003; Morris und Sheppard 2006; Vogelmeier et al. 2006; Koczulla und Vogelmeier 2008). Gesteigerte Produktion von transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) fördert sowohl auf direktem Wege als auch über Induktion der CTGF-Synthese (connective tissue growth factor) die Transformation der Epithelzellen zu Myofibroblasten und führt somit zur Fibrose (Morris et al. 2006). Die Rigidität der Bronchiolen und das Residualvolumen in den Alveolen erhöht sich (air-trapping Phänomen), was die Entwicklung von nicht mehr ventilierten Alveolen und die Entstehung von so genannten Emphyseembullae begünstigt. Der Verlust an funktionsfähigem

Parenchym zwingt den Betroffenen, immer größere Volumina einzuatmen, um den Bedarf an Sauerstoff (O_2) zu decken, genügend Kohlendioxid (CO_2) zu eliminieren und seinen Säure-Basen-Haushalt aufrecht zu erhalten. Die Ausdehnungsfähigkeit der Lunge ist jedoch durch den Thorax begrenzt, so dass die Interkostalmuskulatur durch die enorme Beanspruchung ihre Elastizität verliert und die Ventilation zusätzlich behindert. Es entwickelt sich eine respiratorische Insuffizienz mit Hypoxämie und / oder Hyperkapnie. In der Lungenfunktion steigen Totraum- und Residualvolumen auf Kosten der Vitalkapazität (Barnes et al. 2003; Morris und Sheppard 2006; Vogelmeier et al. 2006).

In den nicht mehr ventilierten Arealen kommt es zur lokalen Hypoxie. Aufgrund des Euler-Liljestrand-Mechanismus kontrahieren sich die Arteriolen reflektorisch und der pulmonalarterielle Widerstand steigt an. Hieraus entwickelt sich im Laufe der Zeit eine pulmonale Hypertension, eine erhöhte Rechtsherzbelastung und schließlich die rechtsventrikuläre Dysfunktion.

2.5 Der pulmonale Surfactant

Die Oberfläche der Alveolen wird von der wässrigen Hypophase bedeckt. Wie an jeder Grenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit entstehen auch hier Oberflächenspannungen, die bewirken, dass die entsprechende Oberfläche die Tendenz aufweist, sich zu verkleinern. Bereits im Jahr 1929 stellte der dänische Forscher von Neergaard fest, dass, um die Lunge mit Luft zu befüllen ein deutlich höherer Druck notwendig war, als um sie mit Wasser zu füllen (Obladen 2005). Er schlussfolgerte damals, dass es etwas geben müsse, das die hohe Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze auf der Alveolaroberfläche reduziert. Die eigentliche Entdeckung und die Entschlüsselung der physikalischen Eigenschaften des Surfactant gelang jedoch erst in den 1950er Jahren durch R.E. Pattle (1955) und J.A. Clements (1957). Surfactant als „surface active agent“ reguliert die Oberflächenspannung

der Alveolen unter variierenden Volumina. Er verhindert, dass die Alveolarwände während der Expiration kollabieren und die große Oberflächenspannung der Alveolaroberflächen die Inspiration behindert (Harding et al. 2004).

2.5.1 Zusammensetzung und Produktion

Surfactant besteht zu 90% seines Gewichts aus Lipiden und zu 10 % aus Proteinen. Lediglich die Pneumozyten Typ II sind dazu fähig, alle Bestandteile des Surfactant, also Phospholipide und sämtliche Surfactant Proteine, zu bilden (Fehrenbach 2000; Fehrenbach 2001). Die Synthese von Surfactant erfolgt im endoplasmatischen Retikulum der Pneumozyten Typ II (RER). Bislang ging man davon aus, dass alle Surfactant Bestandteile von dort aus zum Golgi-Apparat (GA) transportiert und in die Lamellenkörperchen (LK) verpackt werden. Man vermutete, dass die Bestandteile dann via Exozytose entweder kontinuierlich oder nach Stimulation in die Hypophase des Oberflächenfilms sezerniert und schlussendlich per Endozytose wieder in die Pneumozyten Typ II aufgenommen werden, wo sie abgebaut oder wiederverwertet werden können.

Osanai und Mitarbeiter zeigten jedoch, dass es für die einzelnen Komponenten des Surfactant wahrscheinlich verschiedene Sekretionswege gibt. Durch Untersuchungen der Synthesewege von SP-A, SP-B und Phosphatidylcholin (PC) legten sie dar, dass von diesen lediglich SP-B auf dem bisher angenommenen Weg synthetisiert und sezerniert wird. Phosphatidylcholin wird am Golgi-Apparat vorbei geschleust und direkt in den Lamellenkörperchen gespeichert, während SP-A zunächst kontinuierlich sezerniert und erst nach Wiederaufnahme dort gelagert wird (siehe Abbildung 3) (Osanai et al. 2006).

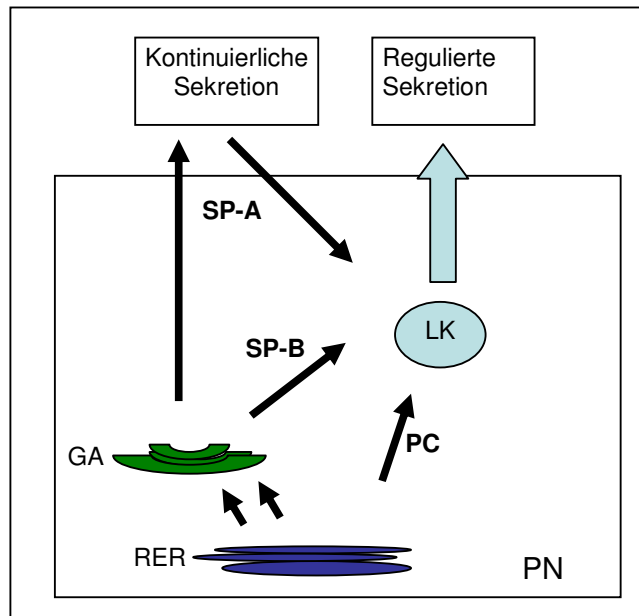


Abbildung 3: Synthese- und Sezernierungswege verschiedener Surfactant Bestandteile (Osanai et al. 2006). GA: Golgiapparat, LK: Lamellenkörper, PC: Phosphatidylcholin, PN II: Pneumozyt Typ II, SP-A, -B, -C: Surfactant Proteine –A, -B –C, RER: Rauhes endoplasmatisches Retikulum

Die Wiederaufnahme und der Abbau des Surfactant geschieht zu ungefähr gleichen Teilen durch Makrophagen, die ihn dem lysosomatischen Abbau zuführen, und Pneumozyten Typ II, wo er entweder ebenfalls katabolisch abgebaut oder wiederverwertet wird (Ikegami 2006).

2.5.2 Surfactant Lipide

Hauptanteil an den Lipiden haben mit ca. 80% die Phospholipide, wovon wiederum 80% Phosphatidylcholin ist. Dieses liegt überwiegend (zwischen 40 und 70%) als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vor. Aufgrund seiner sowohl hydrophilen als auch lipophilen Eigenschaften ist dieses hauptsächlich für die Reduzierung der Oberflächenspannung verantwortlich. Darüber hinaus enthält der menschliche Surfactant Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol als saure Phospholipide (10-15% der Phospholipide). Neben den Phospholipiden enthält Surfactant neutrale Lipide in Form von Cholesterol und Acylglycerol (Rooney 1998).

2.5.3 Surfactant Proteine

Wie bereits erwähnt entspricht der Proteingehalt von Surfactant ca. 10% seines Gewichtes. Neben den Surfactant Proteinen –A bis –D, deren Anteil insgesamt ca. 7% beträgt, findet man in der Hypophase außerdem 3% Serumproteine. Die Surfactant Proteine haben einen Anteil am Surfactant von ca. 5,3% (SP-A), 0,7% (SP-B), 0,4% (SP-B) und 0,6% (SP-D). Man unterscheidet die kleinen, hydrophoben Proteine SP-B und SP-C und die größeren, hydrophileren SP-A und SP-D (Kishore et al. 2005).

Erst Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts begann man, sich für die genaueren Funktionen der Surfactant Proteine zu interessieren. Eine einheitliche Nomenklatur der Surfactant Proteine -A bis -D existiert seit 1990. Bezüglich SP-B und SP-C fand man 1994 heraus, dass sie essentiell für die spannungsregulierenden Eigenschaften des Surfactant sind und ein Mangel an SP-B mit dem Leben unvereinbar ist (Clark und Reid 2003). Kuan und Mitarbeiter konnten 1992 erstmals darstellen, dass Surfactant Protein -D zur angeborenen Immunabwehr beiträgt, indem es bakterielle Pathogene bindet. Seitdem rückten die immunmodulatorischen Eigenschaften der Surfactant Proteine immer mehr in das Interesse der modernen Wissenschaft. Inzwischen weiß man, dass SP-A und SP-D sind in der Lage sind, über verschiedene Erkennungsmechanismen diverse Pathogene zu binden und zu opsonisieren, was deren Phagozytose und Clearance durch Makrophagen erleichtert. Zudem modulieren sie die Zellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr direkt und können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Signalkaskaden induzieren (Crouch 1998; Korfhagen et al. 1998; Crouch 2000; Kishore et al. 2005; Kishore et al. 2006).

2.5.3.1 SP-A

SP-A (26-38kDa) stellt mit ca. 5,3 % Gewichtsanteil die größte Menge an Surfactant Proteinen. Es reguliert die Surfactant-Homöostase, so dass ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Surfactant-Pool gewährleistet ist. In vitro konnte gezeigt werden, dass SP-A die Sekretion von

Phosphatidylcholin aus Pneumozyten Typ II über Feedback Mechanismen drosseln, bzw. die Wiederaufnahme (Re-uptake) der Surfactantlipide steigern kann (Hohlfeld et al. 2002). SP-A gehört (wie auch SP-D) zur Familie der Collectine (siehe Abschnitt SP-D) und ist Bestandteil der angeborenen Abwehr. Es interagiert mit Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems; so verstärkt es zum Beispiel die Phagozytose von Bakterien und Viren durch Neutrophile (Hohlfeld et al. 2002; Chiba et al. 2006). SP-A ist essentiell für die Ausbildung von tubulärem Myelin, der extrazellulären Form der Surfactant Lipide. Bei vollständigem Mangel an SP-A wird daher kein tubuläres Myelin (TM) gebildet (Kishore et al. 2005; Sano und Kuroki 2005).

SP-A^{-/-} Mäuse sezernieren vor allem in der Oberflächenaktivität minderwertigen Surfactant, allerdings anscheinend ohne dass dies die normale Lungenfunktion beeinträchtigt (Hohlfeld et al. 2002). Darüber hinaus zeigen SP-A^{-/-} Mäuse deutliche Defekte bei der Pathogenabwehr und der bakteriellen sowie viralen Clearance (Sano und Kuroki 2005). SP-A und SP-D teilen viele ihrer Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch unter anderem in ihrer Ligandenaffinität. Während SP-D Phosphatidylinositol, Fettsäuren, Glykoproteine und N-verknüpfte Zucker bindet, hat SP-A eine hohe Affinität zu N-verknüpften Oligosacchariden und DPPC. Beide binden jedoch an Lipopolysaccharide bestimmter Bakterien.

2.5.3.2 SP-B und SP-C

SP-B (14kDa) und SP-C (6kDa) sind kleine, stark hydrophobe Proteine und werden deswegen auch Proteolipide genannt (Rooney 1998). Sie spielen eine Rolle bei der Verpackung der Phospholipide und erleichtern durch ihren hydrophoben Charakter die Interaktionen der Surfactant Lipide in der Luft-Flüssigkeits-Schranke. SP-B übt hierbei stärkeren Einfluss auf die Lipide aus als SP-C. Ihr Einfluss ist zwar additiv, sie können sich gegenseitig jedoch nicht ersetzen. Sowohl bei reifen menschlichen Neugeborenen als auch im Tiermodell führte der komplette Mangel an SP-B zu pulmonalem Versagen und zum Tod bei der Geburt. Im Fall einer Störung auf dem SP-B Gen wird auch

SP-C fehlerhaft prozessiert (Rooney 1998). Während SP-A, -B, und -D sowohl in den Clara Zellen als auch in Pneumozyten Typ II produziert werden, ist der einzige Syntheseort für SP-C der Pneumozyt Typ II (Harding et al. 2004).

2.5.3.3 SP-D

Surfactant Protein-D gehört zusammen mit SP-A, den Serumlektinen, den Mannose-bindenden Proteinen und den bovinen Conglutininen zur Familie der Ca^{2+} abhängigen Lektine (auch Collectine oder C-Typ-Lektine genannt) (Clark et al. 2002). Diese sind in der Lage mit mindestens einer, oft auch mit mehreren Domänen Kohlenhydratreste zu erkennen und zu binden, wodurch sie mit viralen oder bakteriellen Zuckerresten interagieren können. Über C-Typ-Lektin-Rezeptoren modulieren sie die Funktion von Effektorzellen des Immunsystems und sind somit an der Immunabwehr körperfremder Substanzen beteiligt (Korfhagen et al. 1998; Crouch 2000; Kishore et al. 2005; Chiba et al. 2006; Kishore et al. 2006).

Hauptort der SP-D Produktion ist die Lunge, obwohl inzwischen auch andere Gewebe, vor allem Zellen epithelialer Oberflächen und Drüsenzellen bekannt sind, die SP-D exprimieren. SP-D wurde zum Beispiel im Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt, im Fruchtwasser sowie mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) in Magen, Niere und Herz der Maus nachgewiesen (Motwani et al. 1995). Man vermutet, dass SP-D durch seine bakterio-, viro-, und fungostatischen Eigenschaften nicht nur in der Lunge sondern auch dort zum Infektionsschutz beiträgt (Kishore et al. 2005). In der Lunge wird SP-D im proximalen Bereich von Bronchiolarepithel, den Clara Zellen und weiter distal von Pneumozyten Typ II synthetisiert und sezerniert (Crouch 2000). Der Großteil an SP-D sammelt sich in der Lunge als lösliches Protein. SP-D besitzt vier essentielle strukturelle Bestandteile (Abbildung 4). Proteintypisch verfügt es über ein C-terminales Ende mit einer Carboxylgruppe und eine N-terminale Aminogruppe, außerdem ein amphipathisches Verbindungspeptid und eine kollagene Triplehelix-Domäne (Sano und Kuroki 2005; Whitsett 2005).

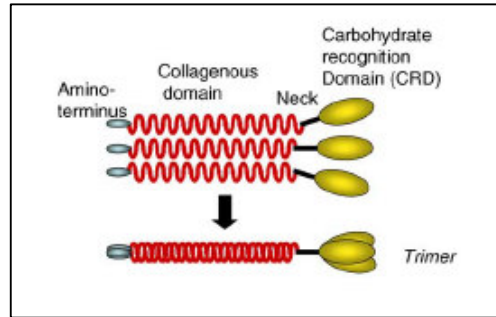


Abbildung 4: Strukturelle Bestandteile von SP-D (aus Sano und Kuroki 2005)

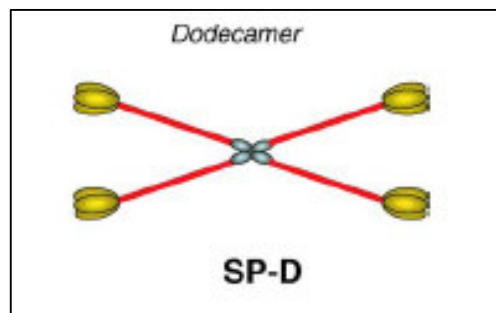


Abbildung 5: Molekülstruktur von SP-D (aus Sano und Kuroki 2005)

Am C-terminalen Ende befindet sich die CRD (carbohydrate recognition domain), wo Kohlenhydratreste viraler, bakterieller und anderer körperfremder Substanzen erkannt werden. Meist besteht ein Molekül aus vier trimerischen Untereinheiten (4x3x43kDa), die am Aminoende verbunden sind (Dodecamer) (Abbildung 5). Die Strukturvariabilität ist hoch. Beim Menschen ist die trimere Struktur Voraussetzung der hoch affinen Kohlenhydraterkennung; zur Stabilisierung der Tertiärstruktur des Proteins sind zwei gebundene Ca^{2+} Ionen sowie zwei Disulfidbrücken essentiell (Crouch 2000). Liganden von SP-D sind hauptsächlich einfache und komplexe Zucker. Die meisten Mikroorganismen haben ein oder mehrere Oberflächenmerkmale, die von SP-D erkannt werden.

2.5.3.3.1 Funktionen von SP-D

Wie bereits erwähnt besitzt SP-D bakterio-, viro-, und fungostatische Eigenschaften. Es interagiert mit einer Vielzahl an körpereigenen Zellen sowie mit Bakterien und Viren (Restrepo et al. 1999; Sano und Kuroki 2005; Chiba et al. 2006). Einen Überblick über die Reaktion von SP-A und SP-D nach Erkennung pathogener Oberflächenmerkmale gibt Abbildung 6.

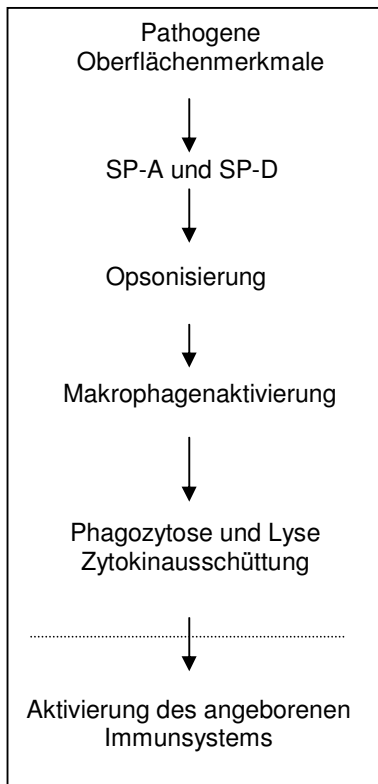


Abbildung 6: Reaktionsweg von SP-A und SP-D nach Erkennung körperfremder Oberflächenmerkmale (Whitsett 2005)

2.5.3.3.1.1 Interaktion mit Körperzellen

Bis heute weiß man, dass SP-D auf mindestens zwei verschiedene Arten mit körpereigenen Zellen interagieren kann: CRD-abhängig und CRD-unabhängig. Vermutlich kann zum Beispiel CD14, das als Oberflächenmerkmal auf vielen Körperzellen vertreten ist, als membranständiger Rezeptor für SP-D chemotaktische Signale an Neutrophile und Monozyten vermitteln.

Ebenfalls lektinabhängig bindet SP-D vermutlich an Lymphozyten und über Phosphoinositol an Alveolarmakrophagen. Lektinunabhängig kann SP-D, wahrscheinlich vermittelt über Glykoprotein 340 (gp-340), eventuell an Alveolarmakrophagen gebunden werden. Eine Bindung von SP-D an Pneumozyten Typ II wird ebenfalls beobachtet. Da SP-D Bindung ohne vorherigen Kontakt des Proteins mit einem Liganden keine bis wenige direkte Effekte hat, ist wahrscheinlich eine Aktivierung durch Ligandenkontakt nötig, um Bindungsstellen für zelluläre Rezeptoren freizuschalten (Crouch 2000).

Zunächst ging man davon aus, dass SP-D im Gegensatz zu SP-A zwar aufgenommen und abgebaut wird, den Surfactant Lipid-Pool jedoch nicht beeinflusst (Crouch 2000). Später fand man heraus, dass auch SP-D den Metabolismus der Surfactant Lipide und vor allem von PC reguliert (Whitsett 2005). SP-D beeinflusst die Oxidantien-, Zytokin- und Metalloproteinaseaktivierung von Makrophagen und kann so als Antioxidans in der Lunge wirken (Stahlman et al. 2002). SP-D wirkte in einer Studie von Clark et al als Opsonin apoptotischer Neutrophiler, wodurch es deren Phagozytose durch Makrophagen beschleunigte. Die Apoptoserate der Alveolarmakrophagen selbst sank ebenfalls. Aufgrund der schnelleren Clearance sterbender Zellen wurden weniger toxische Metabolite wie Proteasen und ROS freigesetzt und so die Entzündungsreaktion gebremst, was wiederum die Surfactant Clearance steigerte. Es zeigte sich, dass SP-D somit indirekten Einfluss auf die Surfactant-Homöostase hat. Es gibt Hinweise, dass SP-D die Fragmente der DNA apoptotischer Zellen jedoch auch direkt erkennen kann, wonach diese phagozytiert und abgebaut werden. Durch all diese Mechanismen verhindert es die Akkumulation nekrotischer Zellen, wodurch wiederum entzündliche Reaktionen und Auto-Antikörperbildung auf, aus diesen Zellen frei gewordene, DNA gebremst werden (Clark et al. 2002; Palaniyar et al. 2005; Hartshorn et al. 2007).

2.5.3.3.1.2 Interaktion mit körperfremden Zellen

Aufgrund seiner Fähigkeit, lektinabhängig Oberflächenmerkmale von Pathogenen zu binden, erkennt SP-D sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien, bindet außerdem an Viren, Pilze, Hefen und Hausstaubmilben. Pathogenassoziation führt dabei überwiegend zu Wachstumsbehinderung, Opsonisierung, Agglutination und Neutralisierung (Sano und Kuroki 2005).

Bakterien: SP-D inhibiert das Wachstum von *Escherichia coli* (McCormack 2006), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, bindet über Lipoteichonsäure an *Bacillus subtilis* und über Peptidoglycan an *Staphylococcus aureus* (Kishore et al. 2005). Darüber hinaus erkennt SP-D Lipidkomponenten der zellwandlosen *Mycoplasma pneumoniae* (Chiba et al. 2006; Yoshida und Whitsett 2006). Nach Bindung von *Mycobacterium tuberculosis* verstärkt SP-D dessen Phagozytose durch Alveolarmakrophagen. Daraufhin kann dieses Bakterium aufgrund des nun leichteren und schnelleren intrazellulären Zugangs allerdings in seiner Infektiosität gefördert werden. Bindung an *Mycobacterium avium* jedoch erhöht dessen Phagozytose (Kishore et al. 2005; Sano und Kuroki 2005).

Pilze und Hefen: SP-D opsonisiert eine Vielzahl an Pilzen und Hefen wie *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* und *Aspergillus fumigatus*. Interaktion mit *Candida albicans* verlangsamt das Wachstum und behindert hier die Phagozytose durch Makrophagen und die Zytokinausschüttung (Kishore et al. 2005; Sano und Kuroki 2005).

Viren: Durch Bindung und Aggregation von Influenza A Virus (IAV) behindert SP-D dessen Replikationszyklus. Es senkt durch Hemmung der Hämagglutinin- und Neuraminidaseaktivität die Infektiosität von IAV, wobei es stärker wirkt als SP-A (Kishore et al. 2005; Hartshorn et al. 2007). Des Weiteren werden Herpes simplex Virus (HSV) und Respiratory syncytial Virus (RSV) erkannt und gebunden (Whitsett 2005).

Allergene: SP-D kann CRD-abhängig Allergene wie Pollen, Hausstaubmilben und *Aspergillus fumigatus* binden, verhindert damit die Immunglobulin E (IgE)-Bindung an diese Allergene und die allergeninduzierte Ausschüttung von Histamin und IL-2 (Interleukin-2). Darüber hinaus kann SP-D, wahrscheinlich durch Beeinflussung der Makrophagenfunktion, die Th2-Antwort unterdrücken und so über vermehrte IL-10 und IL-12 Produktion die Th1-Antwort steigern (Takeda et al. 2003; Kishore et al. 2005). Th1-Lymphozyten dienen hauptsächlich als Regulatorzellen bei Entzündungsreaktionen, insbesondere durch Interaktion mit den antigenpräsentierenden Makrophagen. Sie können auch zur Differenzierung von B-Lymphozyten beitragen, dies ist jedoch zum überwiegenden Teil Aufgabe der Th2-Lymphozyten. Die Th1-Zellen regen die Makrophagen mittels Interferon- γ und CD40 Liganden zu vermehrter Synthese von toxischen und antibakteriellen Substanzen wie Sauerstoffradikalen und Stickoxid (NO), sowie TNF- α an. Darüber hinaus fördern sie über eine Zytokinausschüttung die Apoptose und senden chemotaktische Reize an Leukozyten aus dem Blut. Eine überwiegende Th1-Antwort spricht also im Akutereignis eher für eine proinflammatorische Reaktion (Hof et al. 2004). Bedenkt man jedoch, dass die überwiegende Th1-Antwort die Proliferation von B-Lymphozyten zu B-Gedächtniszellen behindert, mildert sie längerfristig gesehen so die Chronifizierung der Entzündung, speziell bei autoimmunen Erkrankungen wie Asthma Bronchiale.

2.5.3.3.2 Pro- und antiinflammatorische Eigenschaften von SP-D

Obwohl die Lunge ständigen Pathogenkontakt hat, führt dies normalerweise nicht zur Entzündung. Dies ist auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von SP-A und SP-D zurückzuführen, die im ersten Schritt der angeborenen Immunantwort die Alveolarmakrophagen zu erhöhter Aktivität anregen. Überwinden die Pathogene jedoch diese Barriere und besiedeln die Lunge, leiten SP-A und SP-D eine proinflammatorische Immunantwort ein (Kishore et al. 2005). Gardai und Mitarbeiter haben gezeigt, dass SP-A und SP-D, abhängig vom Charakter der Bindung an der CRD und ihrer Interaktion mit Makrophagen, sowohl pro- als auch antiinflammatorische Signale vermitteln

können. Die Bindung an die Makrophagen kann sowohl am „globular head“, als auch am „collagen tail“ erfolgen und so den Charakter der Makrophagenaktivität bestimmen (Haczku et al. 2004).

2.6 SP-D knockout Mäuse, SP-D und Emphysem

Die bisher dargestellten Eigenschaften von SP-D lassen erkennen, dass ein Mangel an funktionsfähigem SP-D für den betroffenen Organismus schwerwiegende immunologische Folgen haben könnte. Um weitere Informationen über die Reaktionen der Lunge auf diesen Mangel zu erforschen, haben sich SP-D^{-/-} Mäuse als Studienobjekte seit langem bewährt. Im Folgenden werden die Erkenntnisse bisheriger Untersuchungen mit SP-D^{-/-} Mäusen erläutert. Es stellte sich heraus, dass diese vor allem in drei Bereichen Defizite aufweisen. Sie zeigen eine gestörte Surfactant Lipid-Homöostase, eine beeinträchtigte Clearance von Pathogenen und eine überschießende pro-inflammatorische Reaktionen nach Pathogenkontakt, woraus erhebliche morphologische und funktionelle Veränderungen der Lunge resultieren (Atochina et al. 2004). SP-D^{-/-} Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen jedoch keine Gewichts- und Mortalitätsunterschiede (Korfhagen et al. 1998).

Surfactant Homöostase: SP-D reguliert auf bislang nicht genau geklärte Weise die Surfactant Homöostase und vor allem den Surfactant Lipid Pool. SP-D^{-/-} Mäuse zeigen bei nur leicht erhöhter Synthese einen bis zu dreifach erhöhten Gehalt an PC und abnormale, verminderte TM-Strukturen. Der Gehalt an mRNA und Protein von SP-A im Surfactant ist reduziert, die Surfactant Proteine B und C bleiben in ihrer Synthese und Sekretion jedoch unbeeinflusst. Es ist weitgehend unklar, ob SP-D die Lipid-Pool Größe durch Regulation der Synthese, Sekretion oder des katabolen Stoffwechsels durch Makrophagen und PN II beeinflusst (Korfhagen et al. 1998). In neueren Studien hat sich allerdings gezeigt, dass vermutlich eher der Einfluss auf den Lipid-Re-Uptake

durch die PN II als die Clearance durch Makrophagen durch SP-D beeinflusst wird und hierbei die entscheidende Rolle spielt (Whitsett 2005).

Atemwegsmorphologie: Verschiedene Forschungsgruppen haben bisher darstellen können, dass die peripheren Atemwege von SP-D^{-/-} Mäusen ein, im Allgemeinen mit drei Wochen beginnendes, und mit zunehmendem Alter progredientes emphysematöses Bild zeigen. Dieses geht mit der Ansammlung von atypischen, schaumigen Makrophagen und perivaskulären Monozyteninfiltraten einher (Botas et al. 1998; Yoshida und Whitsett 2006). Im Lungenparenchym finden sich vermehrt Elastinfasern und Zeichen chronischer Entzündung (Wert et al. 2000). Die Alveolen sind im Vergleich zum Wildtyp vergrößert, in ihrer Zahl verringert und die Pneumozyten Typ II sowohl hyperplastisch als auch hypertroph. Sie enthalten auffallend viele Lammellenkörperchen, was bedeutet, dass mehr Surfactant Lipide intrazellulär gespeichert werden. Die Alveolarsepten sind verdickt und die Alveolaroberfläche (=Gasaustauschfläche) ist reduziert (Ochs et al. 2004).

Makrophagen: Besonders deutlich wirkt sich der Mangel an SP-D bezüglich der Alveolarmakrophagen aus. Der Anteil an Makrophagen in der BAL von SP-D^{-/-} Mäusen ist bis zu zehnfach erhöht; in ihrer Struktur zeigen sie im Vergleich zu Wildtyp und heterozygoten SP-D^{+/-} Tieren bereits im Alter von drei Wochen deutliche morphologische Veränderungen. Sie sind vergrößert, erscheinen schaumig und aufgetrieben und enthalten vermehrt zytoplasmatische Vesikel. Unklar ist, ob diese Veränderungen durch direkte Einflussnahme von SP-D oder sekundär durch den erhöhten Surfactant Lipid-Spiegel bedingt sind (Botas et al. 1998; Korfhagen et al. 1998). Die Makrophagen von SP-D defizienten Mäusen produzieren weitaus mehr ROS, wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), RNS und Metalloproteinasen als die von Wildtyp-Mäusen. Folgen sind makrophagenvermittelte, spontane inflammatorische Aktivität und emphysemähnliche Läsionen sowie alveoläres Remodelling (Wert et al. 2000; Hawgood et al. 2002; Ochs et al. 2004; Yoshida und Whitsett 2006). Es wird deutlich, dass die beobachteten pathologischen Prozesse in den Lungen von SP-D knockout Mäusen der Pathogenese des Emphysems sehr ähnlich sind (siehe Abschnitt Pathogenese des Emphysems).

2.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Analyse des postnatalen Lungenwachstums von SP-D knockout Mäusen hinsichtlich möglicher geschlechtsspezifischer Unterschiede. Zu diesem Zweck wurden die Lungen von 45 Versuchstieren, jeweils Männchen und Weibchen im Alter von 28 Tagen, 3, 6 und 12 Monaten mit stereologischen Verfahren auf quantitative Veränderungen der verschiedenen Lungenstrukturen untersucht.

Die meisten bisherigen Erkenntnisse zu SP-D knockout Mäusen beruhen auf Arbeiten mit relativ jungen, maximal 6 Monate alten Tieren. Darüber hinaus gibt es bislang keine Studien, in denen SP-D defiziente Mäuse nach Geschlechtern getrennt ausgewertet wurden, obgleich bekannt ist, dass sich die strukturellen Gegebenheiten der Lungen von Männchen und Weibchen unterscheiden.

Durch die Einbeziehung verschiedener Altersgruppen beider Geschlechter können sowohl Rückschlüsse auf mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede als auch auf mögliche Veränderungen der Lungen mit fortschreitendem Alter der Mäuse von einem bis zu 12 Monaten gezogen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anderweitig gekennzeichnet, von folgenden Herstellern bezogen:

Merck AG (Darmstadt, Deutschland), Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland), Haraeus Kulzer GmbH (Wehrheim, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), ChemPur GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Serva Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland), Agar Scientific LTD (Stansted, UK), Gentra Systems (Minneapolis, USA), QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

3.1.1.1 Materialgewinnung und Fixierung

10% Paraformaldehydlösung (PFA)

10 g	PFA (Merck)
100 ml	Ampuwa (Aqua ad iniectabilia Braun)
→	zusammen geben, zweimal auf einer Heizplatte mit Magnetrührer auf maximal 60 °C erwärmen und mit 1N Natronlauge (NaOH) klären

0,2 M Natrium – Cacodylatpuffer (Na-CP)

1000 ml	Ampuwa (Aqua ad iniectabilia Braun)
42,8 g	Di-Methylarsinsäure – Natriumsalz (Carl Roth)
→	mit 1 N Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 einstellen
→	durch Verdünnung mit Ampuwa erhält man eine 0,1 % Lösung (1 Teil Gebrauchslösung + 1Teil Ampuwa)

Fixans

- | | |
|-------|---|
| 10 ml | 10 % PFA (EV 1 %) |
| 4 ml | 25 % Glutaraldehyd (EV 1 %) (Serva) |
| 50 ml | 0,2 M Na-CP (EV 0,1 M) |
| → | auf 100 ml mit Ampuwa auffüllen |
| → | Der pH-Wert sollte zwischen 7,35 und 7,4 liegen und wird meistens mit NaOH eingestellt. |

2% Agar-Agar

- | | |
|--------|--|
| 2 g | Agar-Agar-Granulat (Merck) |
| 100 ml | Leitungswasser |
| → | zusammen geben und einmal in der Mikrowelle bei 450 Watt aufkochen |

3.1.1.2 Technoviteinbettung und Eindeckung

1% PFA

- | | |
|--------|---|
| 1 g | PFA (Merck) |
| 100 ml | Ampuwa (Aqua ad iniectionem Braun) |
| → | zusammen geben und zweimal auf einer Heizplatte mit Magnetrührer auf maximal 60 °C erwärmen |

- | | |
|-------|---|
| 1% | Glutaraldehyd (Serva) |
| 0,1 M | Natrium – Cacodylatpuffer |
| 1% | Osmium Tetra Oxid (OsO ₄) (ChemPur) |
| 3% | Acidum tannicum (=Tannin) |

- | | |
|------|----------------|
| 100% | Aceton (Merck) |
| 90% | Aceton |
| 70% | Aceton |

Uranylacetat (Agar Scientific)

Aqua bidest

Technovit 7100 Basislösung (Kunststoff, Kaltpolymersat auf Basis
Hydroxymethylmethacrylat) (Kulzer)

Härter I und Härter II (Kulzer)

3.1.1.3 Richardsonfärbung

Stammlösung

0,25 g Methyleneblau (Merck)

0,25 g Borax (Di-Natriumtetraborat-10-hydrat) (Merck)

0,5 g Azur II (Merck)

→ auf 100 ml Ampuwa auffüllen, vor Gebrauch filtrieren und
lichtgeschützt aufbewahren

Gebrauchslösung

Stammlösung wird im Verhältnis 1:1 mit Leitungswasser gemischt

Aqua dest

Xylol (Merck)

Entellan Schnelleindeckmittel (Merck)

3.1.1.4 DNA-Purifikation und Polymerase Kettenreaktion

Puregene[®] DNA Purification Kit (Gentra Systems)

Enthält:

- Cell Lysis Solution
- Proteinase K Solution (20 mg/ml)
- RNase A Solution
- Protein Precipitation Solution
- DNA Hydration Solution

Isopropanol 100%

Ethanol 70%

2,5 % Agarosegel

5g Agar-Agar-Granulat (Merck)

200 ml TAE Puffer (Sigma)

5 µl Ethidiumbromid (Carl Roth)

→ Granulat und TAE Puffer in der Mikrowelle bei 450 Watt
aufkochen bis keine Luftbläschen mehr aufsteigen.
Ethidiumbromid zugeben und erneut vorsichtig kochen, bis keine
Luftbläschen mehr aufsteigen. In entsprechende Gelkammern
gießen und 1 Stunde bedeckt ruhen lassen.

Polymerase Kettenreaktions-Kit (QIAGEN)

Enthält: TAQ DNA Polymerase

 10 x QIAGEN PCR Puffer

 5 x Q-Solution

 25 mM MgCl₂

 dNTP Mix, 10 mM pro dNTP

Loading Dye Solution (Fermentas)

3.1.2 Geräte

Einbettungskassetten	(Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland)
Rotationsmikrotom „Biocut“	(Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland)
Lichtmikroskop Olympus BX 51	(Olympus, Japan)
CAST 2.0	(Computer Assisted Stereological Toolbox) (Olympus, Albertslund, Dänemark)
Thermocycler	RoboCycler® (Stratagene, La Jolla, USA)

3.1.3 SP-D knockout Mäuse

Die in dieser Arbeit verwendeten SP-D^{-/-} C57/BL6 Mäuse wurden im Labor von Professor S. Hawgood der University of California, San Francisco (USA), hergestellt und entstammen einer mit dessen Genehmigung in Marburg aufgebauten Population.

Der knockout des SP-D Gens geschah durch homologe Rekombination. Um das SP-D Gen der Maus zu identifizieren, wurde zunächst mithilfe der Polymerasekettenreaktion eine cDNA (complementary Desoxyribonukleinsäure) von der SP-D RNA (Ribonukleinsäure) aus BAL erstellt. Die genomische Bibliothek einer embryonalen 129/SV Stammzelle wurde mit dem 1,2kb (Kilobasen) großen für SP-D kodierenden Fragment der cDNA gescreent, um ein 15kb großes cDNA-Stück zu erhalten, das alle kodierenden Sequenzen des Gens für SP-D außer dem 3' Ende enthält. Ein Primer wurde in einen Vektor eingebracht, band an das 5' Ende von Exon 2 auf Chromosom 14 und unterband die Translation von SP-D am Startcodon. Dies wurde dann durch Southern Blot bestätigt, das Genkonstrukt in embryonale Stammzellen

eingbracht, welche in Eizellen injiziert und in scheinschwangere Weibchen transferiert wurden. Postnatal wurden die Tiere dann erneut mit Southern Blot auf die Exprimierung von SP-D überprüft und die homozygoten SP-D^{-/-} Tiere nachfolgend miteinander gepaart (Botas et al. 1998; Lawson et al. 1999). Die Versuchstiere für diese Studie wurden unter SPF (specific pathogen free) - Bedingungen gehalten und erhielten Nahrung und Wasser ad libitum. In dieser Studie wurden in den Altersgruppen 28 Tage, 3, 6 und 12 Monate insgesamt 22 weibliche und 23 männliche Mäuse, mit jeweils vier bis sieben Tieren pro Altersgruppe untersucht.

Erfassungsnummern			
w28T	w3Mon	w6Mon	w12Mon
59-05	87-05	84-05	100-05
60-05	88-05	102-05	277-05
62-05	89-05	103-05	278-05
63-05	90-05	104-05	279-05
	91-05	37-06	334-05
		38-06	335-05
		39-06	

Tabelle 1: Erfassungsnummern Weibchen (w)

Erfassungsnummern			
m28T	m3Mon	m6Mon	m12Mon
55-05	92-05	50-05	96-05
56-05	93-05	51-05	97-05
57-05	94-05	52-05	98-05
58-05	95-05	53-05	274-05
172-05	168-05	54-05	275-05
173-05	169-05		276-05

Tabelle 2: Erfassungsnummern Männchen (m)

3.2 Methoden

Folgend werden die angewandten Methoden in ihrer chronologischen Reihenfolge beschrieben.

3.2.1 Tierpräparation, Instillation und Volumenbestimmung

Die Mäuse wurden im entsprechenden Alter durch zervikale Dislokation getötet. Dann wurde die Schwanzspitze für PCR-Untersuchungen entnommen. Das Tier wurde auf dem Rücken liegend auf der Arbeitsfläche fixiert und zunächst die Haut des Abdomens, des Thorax und des Halses entfernt. Nachfolgend wurde die Trachea freigelegt, in Larynxnähe eröffnet und eine kleine Kanüle eingebracht, über die später das Fixans instilliert werden sollte. Sie wurde mit einem Faden fixiert. Das Zwerchfell wurde frei präpariert und anschließend eröffnet, wodurch die Lungen kollabierten, so dass der Thorax mit einer Olivenschere eröffnet werden konnte. Hierzu wurde das Sternum durchtrennt, die beiden Thoraxhälften aufgeklappt und auf der Arbeitsfläche fixiert. Nach Entfernung des Thymus mit einer Pinzette konnte die Trachea komplett freigelegt werden. Sie wurde im Anschluss oberhalb der Kanülierung am Larynx durchtrennt und leicht angehoben, so dass umgebendes Bindegewebe entfernt werden konnte. Die Bindegewebsverbindungen der Lungen wurden ebenfalls entfernt und im letzten Schritt wurden der Ösophagus und die Aorta durchtrennt, so dass Trachea, Lungen und Herz dem Thorax komplett entnommen werden konnten. Die entfernten Organe wurden nun an der Kanüle in eine Instillationsapparatur gehängt, über die unter Druck von 20 cm Flüssigkeitssäule das Fixans instilliert wurde. Beide Lungenflügel entfalteten sich hierdurch vollständig. Nach Ablauf von 20 Minuten wurde die Trachea unterhalb der Kanüle mit einem Faden ligiert und die Kanüle entfernt. Anschließend wurden die Lungen in ein Gläschen mit Fixans transferiert, in dem sie frei schwebend für 24h bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wurden.

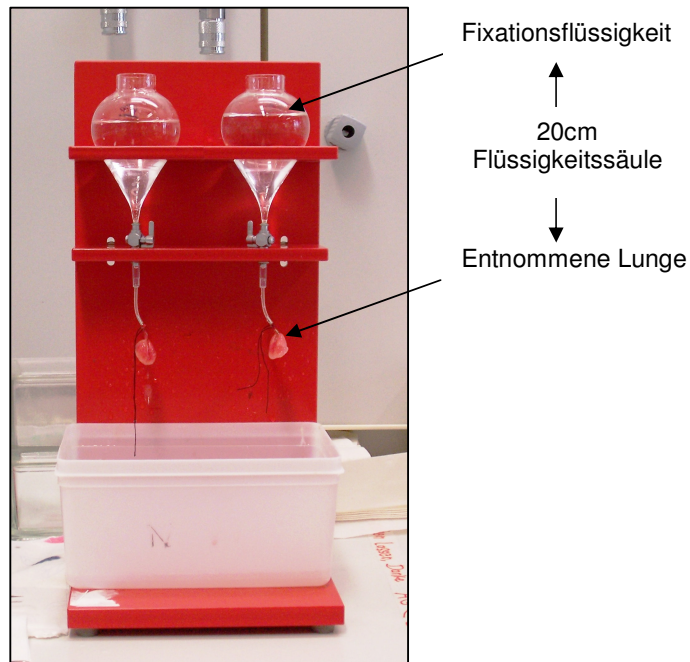


Abbildung 7: Instillationsapparatur

Nach 24h wurden die Lungen aus den Gläsern entfernt und die Lungenflügel hilusnah getrennt, wobei das Herz entfernt wurde. Folgend wurden eventuell verbliebene Gewebereste ebenfalls entfernt und das Volumen der beiden Lungenflügel einzeln bestimmt.

Die Volumenbestimmung erfolgte mittels Wasserverdrängung. Der jeweilige Lungenflügel wurde in ein Gefäß mit Wasser getaucht, das auf einer Waage stand und dessen Gewicht vorher bestimmt worden war. Nach dem archimedischen Prinzip entspricht bei einem spezifischen Gewicht der Flüssigkeit von 1 g/ml die Gewichtszunahme der Flüssigkeit in dem Gefäß dem durch den Lungenflügel verdrängten Volumen (Scherle 1970).

3.2.2 Einbettung

Zur Vorbereitung der Einbettung in Glykolmethacrylat (Technovit 7100) wurden die Präparate in Agar-Agar transferiert. Hierzu wurden zunächst die beiden Lungenflügel mit der lateralen Seite nach unten gerichtet in jeweils ein

Becherglas mit flüssigem, warmem, 2%-igem Agar-Agar gelegt und vollständig damit bedeckt. Nach einer Härungszeit von ca. 60-90 min bei 4°C im Kühlschrank konnte der Agar-Agar Block mit den eingelegten Lungen komplett aus dem Becherglas entnommen und in einer Schneidekammer in ca. 2mm dicke Scheiben geschnitten werden. Im Anschluss wurden die Lungenscheiben von den Agar-Agar Resten befreit. Nach den Prinzipien des Systematic Uniform Random Sampling (SURS) wurden die Scheiben in zwei repräsentative Fraktionen aufgeteilt (siehe Abschnitt Tissue Sampling), von denen eine zur Einbettung in Technovit für die quantitative lichtmikroskopische Analyse und eine zweite für die Aralditeinbettung im Rahmen einer anderen Untersuchung am Elektronenmikroskop weiter vorbereitet werden sollten. Anschließend wurden die Lungenscheiben wieder in Fixierlösung, bestehend aus 1% Glutaraldehyd und 1% PFA in 0,1M Na-CP (Gesamtosmolarität ca. 300 mOsm, pH 7,35) gelagert. Die Lungenscheiben wurden, abhängig von ihrer Größe, in ein bis drei Blöcke Technovit eingebettet. Vorteil der Einbettung in Technovit im Vergleich zu Paraffin ist, dass das Gewebe bei der Einbettung nicht schrumpft (Weibel et al. 2007). Hierzu mussten die Proben bei Raumtemperatur wie folgt aufgearbeitet werden: nach Lagerung in Fixativ über Nacht, wurden sie zunächst 4 x 5 min mit 0,1 M Na-CP gewaschen. Dann erfolgte die Postfixierung mit 1% OsO₄ (in 0,1 M Na-CP). Im Anschluss mussten die Proben erneut 4 x 5 min in 0,1 M Na-CP und 2 x 5 min in Aqua bidest gewaschen werden, worin sie dann noch ca. 1h gelagert wurden. Über Nacht erfolgte dann die Blockkontrastierung mit halbgesättigter, wässriger Uranylacetat-Lösung. Hierbei sollten die Gläschen im Dunkeln stehen. Zum Schluß wurden die Lungen 4 x 5 min mit Aqua bidest. gewaschen. Danach erfolgte die Entwässerung mit Aceton. Dazu wurden die Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe jeweils 2 x 1h in 70% und 90%, anschließend noch mal 1h in 100% Aceton eingelegt. Im nächsten Schritt lagerten sie nach Empfehlungen des Herstellers über Nacht in einer Lösung aus 100ml Technovit 7100 Basislösung + 1 Beutel Härter I und Aceton 1:1. Es erfolgte eine Entgasung bei -300mbar, um restliche Luft im Gewebe zu entfernen. Zur Infiltration wurden die Schnitte wiederum über Nacht in Technovit Basislösung + 1 Beutel Härter I

eingelegt. Am folgenden Tag wurde zu 15 ml der Infiltrationslösung 1 ml Härter II pipettiert und gut vermischt. Die infiltrierten Präparate wurden in einer Teflonform angeordnet und mit dem Gemisch bedeckt; bei Raumtemperatur polymerisieren die so behandelten Proben in ca. 2h aus. Da sich die im letzten Schritt der Einbettung verwendete Lösung erhitzt, verwendet man bei der Technoviteinbettung, wie hier geschehen, Teflonformen, die die Wärme ableiten.

3.2.3 Schneiden der Blöcke am Rotationsmikrotom

Nach einem Tag Aushärtung und der Aufblockung konnten die Technovitblöcke am Rotationsmikrotom „Biocut“ in 1,8 µm dicke Scheiben geschnitten werden. Aus dem destillierten Wasserbad wurden dann jeweils zwei Schnitte pro Block ausgewählt und auf einen Objektträger (OT) übertragen; pro Tier entstanden auf diese Weise ein bis drei OT mit jeweils zwei Schnitten pro Block. Von diesen wiederum wurde später je ein Schnitt pro Block am CAST ausgewertet. Durch kurze Inkubation der fertigen OT auf einer Wärmeplatte bei 65°C blieben die Schnitte auf dem Träger haften.

3.2.4 Färbung

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Schnitte nach Richardson angefärbt, der gängigsten Übersichtsfärbung bei Technoviteinbettung. Die Gebrauchslösung wurde am Vortag der Färbung bei 65°C in den Wärmeschränk gestellt. Für die Färbung der einzelnen Schnitte wurde der getrocknete OT zunächst bei 60°C auf eine Heizplatte gelegt, um dann für 30 sec. mit der warmen Farblösung bedeckt zu werden. Die Lösung wurde mit Leitungswasser abgespült und die OT in einer Standkuvette mit kaltem Leitungswasser gesammelt. Im Anschluss wurde unter mikroskopischer Kontrolle so lange mit warmem Leitungswasser differenziert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Danach wurden die OT mit Aqua dest. kurz abgespült. Vor dem Eindecken wurden sie kurz auf eine 70°C warme

Heizplatte gelegt und zur Entwässerung warm in Xylol eingestellt. Im letzten Schritt wurden die OT mit Entellan eingedeckt. Die gefärbten Schnitte sollten bis zur lichtmikroskopischen Betrachtung lichtgeschützt gelagert werden

3.2.5 DNA Purifikation und Polymerase Kettenreaktion

Um verifizieren zu können, dass es sich bei den in dieser Studie verwendeten Versuchstieren um SP-D knockout Mäuse handelt, verglichen wir die DNA der Tiere mit Wildtyp DNA. Hierzu vervielfältigten wir die DNA- Fragmente von jeweils zwei Tieren pro Versuchsgruppe und trennten sie anschließend gelelektrophoretisch auf. Aufgrund der Fähigkeit von Nukleinsäuren, im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe zu wandern, konnten wir so die Unterschiede der jeweiligen DNA- Fragmente von knockout- und Wildtyp-Mäusen im Vergleich darstellen.

Im Vorfeld wurde zunächst von jedem verwendeten Tier ein Schwanzspitzenstück zurückbehalten und bei -80 °C tiefgefroren. Hierdurch war es möglich, später aus diesem Gewebe die DNA des Tieres zu purifizieren und mittels Polymerasekettenreaktion und Gelelektrophorese den knockout des SP-D Gens zu bestätigen. Im ersten Schritt der DNA Purifikation wurden ca. 5-10 mg der tiefgefrorenen Schwanzspitzen zusammen mit 300 µl Cell Lysis Solution in ein 1,5 ml Eppendorf Cup gegeben. Dann wurden 1,5 µl Proteinase K Solution hinzugegeben, vermischt und bei 55 °C über Nacht inkubiert, so dass sich das Gewebe in der Trägerflüssigkeit lösen konnte. Am nächsten Tag setzten wir 1,5 µl RNase A Solution zu und inkubierten das Gemisch 30 Minuten lang bei 37 °C. Nach Herunterkühlung auf Raumtemperatur fügten wir 100 µl Protein Precipitation Solution hinzu. Durch Vortexen vermischten sich die verschiedenen Zusätze vollständig; im nachfolgenden Schritt wurde dann die DNA von den Geweberesten getrennt. Hierzu wurde das Eppendorf Cup 3 Minuten lang bei 14.000 rpm (revolutions per minute) zentrifugiert, so dass sich die Gewebereste als Pellet am Boden des Cups absetzten und die gelöste DNA als Überstand abpipettiert werden konnte. Sie wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Cup gegeben, mit 300 µl 100%igem Isopropanol versetzt und

vermischt. Durch erneutes Zentrifugieren für ca. 1 Minute wurde die DNA gefällt, der Überstand wurde entfernt und 300 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt um das DNA Pellet zu reinigen. Nach wiederholter Zentrifugation wurde auch das Ethanol entfernt. Das Eppendorf Cup wurde nun für einige Minuten auf einem absorbierenden Papier auf den Kopf gestellt, damit die enthaltene DNA vollständig trocknen konnte. Zur Hydratation wurden im letzten Arbeitsschritt 50 µl DNA Hydratation Solution hinzu gegeben und 1 Stunde bei 65°C inkubiert. Die erhaltene DNA Lösung mit einer Konzentration von ca. 500 µg/ml wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten. Grundprinzip ist die enzymatische Duplikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Durch sich wiederholende Zyklen von Hitzedenaturierung, Anlagerung von spezifischen Oligonukleotidprimern und DNA-Synthese werden die zwischen den Primern liegenden Bereiche der DNA in Anwesenheit von Trinukleotidphosphat-Substrat (dNTP) exponentiell amplifiziert. Dem nachfolgenden Schema entsprechend setzten wir unseren Proben unter anderem drei Primer zu, die am 3' Ende der Wildtyp und knockout Sequenz sowie am 5' Ende binden und somit Start- und Endpunkte der Transkription festlegen.

PCR Protokoll	Volumen (µl)
DNA-Template	1,0
H ₂ O	18,0
10x PCR Puffer	2,5
50 mM MgCl ₂	1,0l
10 mM dNTP Mix	0,75
Primer I (5') 10 µM	0,75l
Primer II (3' WT) 10 µM	0,75
Primer III (3' KO) 10 µM	0,75
TAQ-Polymerase (5U/µl)	0,25
Endvolumen	25,75

Tabelle 3: PCR Protokoll

Die Proben wurden nun in einen Thermocycler gegeben. Das Prinzip, nach welchem sie hierbei einem definierten Temperaturwechsel unterlagen, ist in Tabelle 4 dargestellt.

Thermocycler-Programm (°C)	Zeit (min)	Effekt	Wiederholungen
94	5		
94	1	DNA-Denaturierung	30 Mal
60	1	Anlagerung der Primer	
72	1	Transkription	
72	5		
4	unbegrenzt		

Tabelle 4: Thermocycler Zyklen

Erhitzen auf 94 °C führt zunächst zur Denaturierung der DNA. Die Temperatur wird anschließend auf 60 °C erniedrigt, so dass sich die Primer an die DNA anlagern. Das Temperaturoptimum der TAQ Polymerase, einem Abkömmling thermophiler Bakterien, der die beiden DNA Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplettiert, liegt bei 72 °C. Im Anschluss wird die Temperatur wieder auf 94 °C erhöht und der Zyklus beginnt erneut. Der Thermozyklus wurde 30 Mal wiederholt, so dass die Zielsequenz zum Schluss mehr als 10⁶ Mal amplifiziert war. Die amplifizierte DNA-Sequenz der SP-D^{-/-} Mäuse betrug so am Ende 350 bp. Die DNA-Sequenz der Wildtyp Mäuse enthielt hingegen 520 bp.

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren im elektrischen Feld ist abhängig von der Größe der Nukleinsäuren, der angelegten Stromspannung und der Konzentration des verwendeten Gels. Wir verwendeten ein 2,5%iges Agarose-Gel. Die DNA-Proben wurden mit 6x Loading Dye Solution MBI Farbindikator vermischt, jeweils 12 µl in eine Tasche des Agarose-Gels gegeben und mit einer Spannung von 100 V/cm² elektrophoretisch aufgetrennt.

Im Anschluss konnte die Größe der einzelnen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit unter UV Licht bestimmt werden. Die folgende Abbildung verdeutlicht, dass es sich bei den verwendeten Mäusen um SP-D^{-/-} Mäuse handelt.

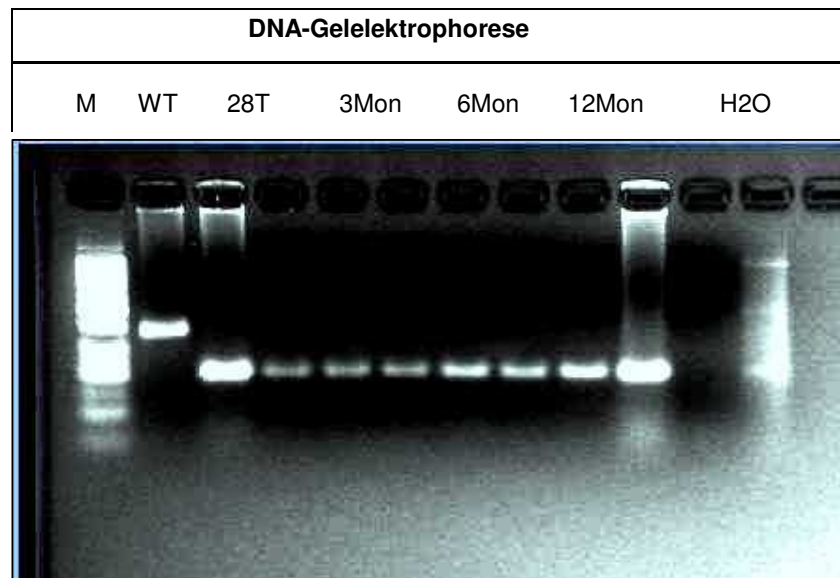


Abbildung 8: Ergebnis der PCR Kontrolle bei je zwei Tieren pro Versuchsgruppe.
M= Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (0,5 mg DNA/ml), WT: Wildtyp

3.2.6 Stereologische Auswertung

3.2.6.1 Prinzipien der Stereologie

Die Stereologie befasst sich mit der quantitativen Analyse dreidimensionaler Strukturen an zweidimensionalen Schnitten; sie ist ein Teilgebiet der stochastischen Geometrie. Mithilfe verschiedener geometrischer Testsysteme, wie Punkte-Raster, Test-Linien, -Flächen oder Volumina, können die innerhalb des Organs interessierenden Strukturen in ihrem Volumen, ihrer Oberfläche, Länge oder Anzahl analysiert werden. Unter Verwendung dieser Methoden werden systematische Fehler (Bias), die aufgrund von Annahmen über die geometrische Form oder die Verteilung der Struktur im Organ hervorgerufen würden, vermieden (Howard und Reed 1998). In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen drei verschiedene geometrische Test-Systeme verwendet.

Zur Analyse von Gewebe-Volumina benutzt man Punkteraster (point counting); das Verhältnis der Punkte, die auf eine Struktur fallen, zur Gesamtzahl der Punkte auf dem Referenzraum ergibt die Volumen"dichte" (i.e. den prozentualen Anteil einer Struktur an ihrem Referenzraum) der analysierten Struktur. Will man die Oberflächendichten ermitteln, bietet sich ein kombiniertes Punkte- / Linienraster an (intersection counting). Um das volumen-gewichtete mittlere Volumen einer Struktur zu ermitteln, benutzt man eine als point sampled intercept bekannte Methode (Fehrenbach et al., 1999). Unter Verwendung eines Linienrasters mit in definiertem Abstand befindlichen Punkten werden die Schnittpunkte der Linien mit der begrenzenden Oberfläche der interessierenden Struktur markiert. Aus dem Abstand der beiden Grenzflächen wird mit Hilfe der Software CAST-Grid 2.0 das jeweilige Volumen berechnet. Zur Analyse aller stereologischen Parameter wurde ein Olympus BX 51 Lichtmikroskop, das mit einem Computer verbunden ist und die entsprechend des "Systematic Uniform Random Sampling" (SURS) Verfahrens ausgewählten Sichtfelder auf den Bildschirm überträgt, verwendet. Mittels der integrierten CAST Grid 2.0 Software erfolgte die stereologische Auswertung.



Abbildung 9: Olympus BX 51 Lichtmikroskop mit Computerbildschirm zur computerassistenten stereologischen Auswertung

3.2.6.2 Tissue Sampling

Wesentliche Voraussetzung dafür, dass die erhobenen Daten repräsentativ für das untersuchte Organ sind, ist die repräsentative Probenauswahl (engl. Sampling). Eine Probenauswahl ist dann repräsentativ, wenn sicher gestellt ist, dass jeder Teil einer Grundgesamtheit (z.B. eines Organs) mit derselben Wahrscheinlichkeit (uniform) in die Analyse eingehen kann. Dies wird durch das Prinzip des SURS erreicht. Hierzu wird an einem zufällig gewählten Punkt (random) ausserhalb des Organs oder Schnittes begonnen und von dort aus in systematischen Schritten (systematic) weitere Schnitte durch das Organ gelegt oder weitere Sichtfelder angefahren.

Zur Entnahme der Organscheiben wurde beim Schneiden der in Agar-Agar eingelegten Lungen zunächst ein zufälliger Startpunkt außerhalb der Lunge gewählt und der Agar-Lungen-Block komplett in gleich dicke Scheiben von etwa 2µm Dicke geschnitten. Im Anschluss wurde per Würfel entschieden, welche Lungenscheiben (gerade oder ungerade Nummern) zur elektronenmikroskopischen und welche zur lichtmikroskopischen Untersuchung verwendet wurde. Mithilfe dieses Auswahlverfahrens ist gewährleistet, dass für beide Untersuchungen jeweils repräsentative Anteile des Organs zur Verfügung stehen (Nyengaard 1999; Ochs 2006).

Zur Auswahl der zu untersuchenden Sichtfelder am Computer-gestützten Lichtmikroskop wurde an einer Stelle außerhalb der Schnitte, zum Beispiel an einem zufällig gewählten Punkt in der oberen linken Ecke des Schnittpräparats, begonnen und von dort aus systematisch der gesamte Schnitt in X/Y-Richtung mit festgelegter Schrittgröße durchgemustert. Die Schrittdistanz kann so eingestellt werden, dass eine ausreichende, aber im Sinne der Effizienz auch nicht zu große Anzahl an Zählereignissen erreicht wird. Verfahren, bei denen die beschriebenen Maßnahmen zur Probenauswahl nicht garantiert werden, können zu einem systematischen Fehler (Bias) führen.

3.2.7 Messungen

Die quantitative Analyse der einzelnen Gewebeanteile erfolgte nach einem Kaskaden-Verfahren auf verschiedenen Ebenen bei steigender Vergrößerung, wobei das ermittelte Volumen der ersten Ebene als Referenzvolumen der nächst niedrigeren Ebene diente. So konnte beispielsweise nach Bestimmung des Lungenvolumens und des prozentualen Parenchymanteils dessen absolutes Volumen bestimmt werden. Im nächsten Schritt wurde der prozentuale Luftanteil am Parenchym ermittelt und das absolute Luftvolumen aus dem Parenchymvolumen berechnet. Um die Veränderung der verschiedenen Kompartimente der Lunge zu erfassen, wurden die Volumendichten (V_v) und das absolute Volumen (V) von Parenchym, Nicht-Parenchym, Luft, Alveolarsepten, Makrophagen und Kapillarlumen bestimmt. Die alveoläre Gasaustauschfläche wurde aus der alveolären Oberflächendichte (S_v) im Parenchymvolumen bestimmt. Die Weite der Gasaustauschräume (Alveolen und Ductus) wurde anhand der mittleren freien Alveolenweite (Mean Chord Length, C_m) und des volumen-gewichteten mittleren Volumens von Alveolen und Ductus (MV) ermittelt.

Die Volumen/Oberflächenrelation (VS) der Alveolarsepten, und somit ihre Dicke wurde ebenfalls berechnet. Mithilfe der genannten Verfahren wurden, je nach Größe des Organs, an je ein bis drei Schnitten pro Tier folgende Strukturparameter untersucht:

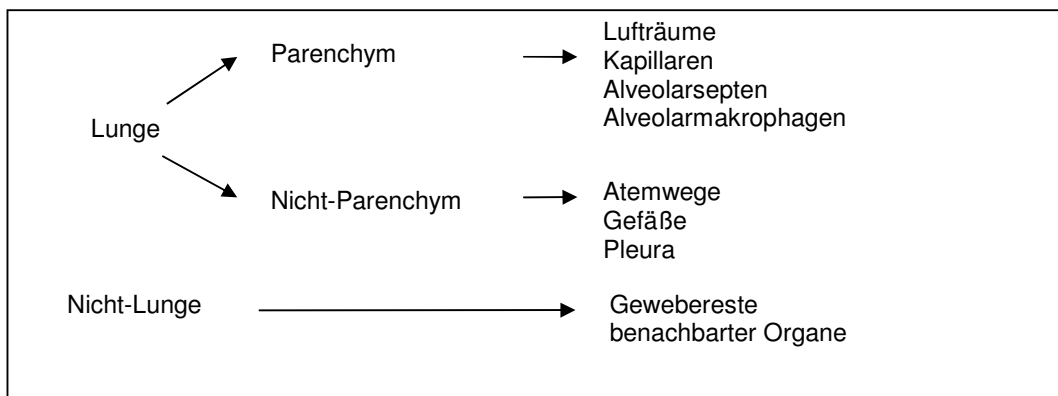


Abbildung 10: Ebenen der mittels stereologischer Analyse untersuchten Strukturen

Parameter	Abkürzung	Methode
Parenchymanteil (%)	Vv (Par/Lunge) (%)	point counting
Nicht-Parenchymanteil (%)	Vv (NPar/Lunge) (%)	point counting
Nicht-Lungengewebeanteil (%)	Vv (NLunge/Lunge) (%)	point counting
Luftanteil (%)	Vv (Luft/Par) (%)	point counting
Alveolarseptenanteil (%)	Vv (AS/Par) (%)	point counting
Kapillarlumenanteil (%)	Vv (KL/Par) (%)	point counting
Alveolarmakrophagenanteil (%)	Vv (AM/Par) (%)	point counting
Mean Chord Length (μm)	Cm (μm)	intersection counting
Alveoläre Oberflächendichte (μm^{-1})	S _v (Alvepi) (μm^{-1})	intersection counting
Volumen-gewichtetes mittleres Volumen (μm^3)	MV (μm^3)	point sampled intercept

Tabelle 5: Direkt erhobene Parameter

Berechnete Parameter	Abkürzung
Parenchymvolumen (mm^3)	V (VvPar * VLunge) (mm^3)
Nicht-Parenchymvolumen (mm^3)	V (VvNpar * VLunge) (mm^3)
Nicht-Lungengewebevolumen (mm^3)	V (VvNLung * VLunge) (mm^3)
Luftvolumen (mm^3)	V (VvLuft * VPar) (mm^3)
Alveolarseptenvolumen (mm^3)	V (VvAS * VPar) (mm^3)
Alveolarmakrohagenvolumen (mm^3)	V (VvAM * VPar) (mm^3)
Kapillarlumenvolumen (mm^3)	V (VvKL * VPar) (mm^3)
Totale alveoläre Oberfläche (cm^2)	S (S _v Alvepi * VLunge) (cm^2)
Massenspezifisches Lungenvolumen und massenspezifische Gewebevolumina (mm^3/g)	MsV (mm^3/g)
Massenspezifische alveoläre Oberfläche (cm^2/g)	MsS (cm^2/g)
Volumen/Oberflächenrelation der Alveolarsepten (μm)	VS (V AS/S) (μm)

Tabelle 6: Ermittelte Parameter

3.2.7.1 Parameter zur Beurteilung der Kompartimente

Volumendichten und Volumen von Parenchym, Nicht-Parenchym und Nicht-Lungengewebe: In dieser Auswertung wurden die Volumendichten oder Volumenanteile der jeweiligen Gewebeanteile am Gesamtvolumen bestimmt. Der Volumenanteil reicht von Null bis Eins, wird üblicherweise in Prozent angegeben und wurde mittels einem auf dem Delessee-Prinzip basierenden Punktezählverfahren ermittelt (Howard und Reed 1998). Man legt hierzu ein definiertes Punkteraster über das Sichtfeld, woraufhin großvolumige Strukturen eines Organs in einem Schnitt häufiger „getroffen“ werden, weniger voluminöse Strukturen entsprechend seltener.

Der Anteil der gezählten Punkte an der Gesamtheit des Referenzraumes repräsentiert demnach deren Anteil am Volumen des Organs. Es wurde ein 10-fach vergrößerndes Objektiv gewählt, die Schrittgröße betrug 1000 x 1000 µm und das Punkteraster verfügte über neun Punkte. Um alle Parameter mit gleicher Präzision einschätzen zu können, wurden sogenannte Masterpunkte (hier umkringelt) verwendet, die nur gezählt wurden, wenn sie auf Parenchym fielen. Die mit einem Masterpunkt assoziierte Fläche war hier dann 9 Mal so groß wie die der restlichen Punkte, welche zum Bemessen von Nicht-Parenchym und Nicht-Lungengewebe verwendet wurden. Zur Berechnung der absoluten Volumina wurden die Volumenfraktionen anschließend auf das Lungenvolumen bezogen. Unter Berücksichtigung des Körpergewichtes konnten die massenspezifischen Volumina ebenfalls ermittelt werden. Die erhobenen Werte ermöglichen die Beurteilung der Veränderungen der einzelnen Gewebeanteile mit zunehmendem Alter der Versuchstiere bzw. der geschlechtsspezifischen Unterschiede der Veränderungen.

$$V_v(\text{struct}) = \frac{\sum P(\text{struct})}{\sum P(\text{ref})} \times 100 \quad (\%)$$

Formel 1: $V_v(\text{struct})$: Volumendichte Struktur X (%), $\sum P(\text{struct})$: Gesamtheit aller Punkte auf Struktur X, $\sum P(\text{ref})$: Gesamtheit aller Punkte auf dem Referenzraum (z.B.: $P(\text{Par}) + P(\text{NPar})$)

$$V(\text{struct}) = V_v(\text{struct}) \times V_{\text{Lunge}} \quad (\text{mm}^3)$$

Formel 2: $V(\text{struct})$: Volumen Struktur X (mm^3), $V_v(\text{struct})$: Volumendichte Struktur X (%), V_{Lunge} : Lungenvolumen (mm^3)

$$\text{MsV}(\text{struct}) = \frac{V(\text{struct})}{\text{KG}} \quad (\text{mm}^3/\text{g})$$

Formel 3: $\text{MsV}(\text{struct})$: Massenspezifisches Volumen Struktur X (mm^3/g KG), $V(\text{struct})$: Volumen Struktur X (mm^3), KG: Körpergewicht (g)

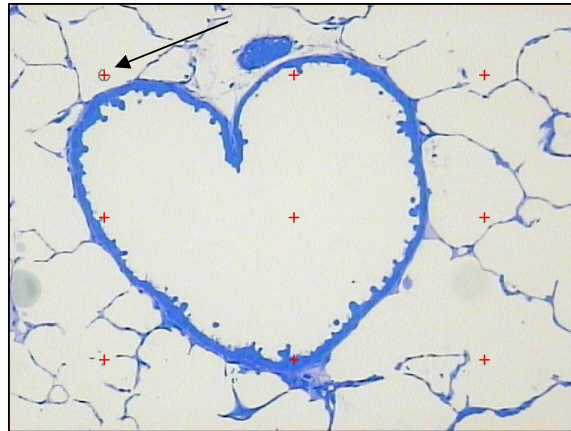


Abbildung 11: Sichtfeld mit Punkteraster und Masterpunkt (Pfeil) zur Berechnung der Volumendichten von Parenchym, Nicht-Parenchym und Nicht-Lungengewebe

Volumen von alveolärem Gasraum, Alveolarsepten, Kapillarlumen und Alveolarmakrophagen: Die Berechnung der Volumenfraktionen des alveolären Gasraumes, der Alveolarsepten (AS), des Kapillarlumens (KL) und der Alveolarmakrophagen (AM) erfolgte erneut nach dem Punktezählverfahren. Zur Vergrößerung wurde ein 20-faches Objektiv gewählt, die Schrittgröße betrug $1000 \times 1000 \mu\text{m}$. Die roten Masterpunkte wurden nur gezählt, wenn sie auf AS oder KL fielen (und zur Berechnung wieder mit neun multipliziert), für Makrophagen wurden alle roten Punkte gezählt.

$$V_v(\text{struct}) = \frac{\sum P(\text{struct})}{\sum P(\text{ref})} \times 100 \quad (\%)$$

Formel 4: $V_v(\text{struct})$: Volumendichte Struktur X (%), $\sum P(\text{struct})$: Gesamtheit aller Punkte auf Struktur X, $\sum P(\text{ref})$: Gesamtheit aller Punkte auf dem Referenzraum (z.B.: $P(\text{Par}) + P(\text{NPar})$)

$$V(\text{struct}) = V_v(\text{struct}) \times V_{\text{Lunge}} \quad (\text{mm}^3)$$

Formel 5: $V(\text{struct})$: Volumen Struktur X (mm^3), $V_v(\text{struct})$: Volumendichte Struktur X (%), V_{Lunge} : Lungenvolumen (mm^3)

$$MsV(\text{struct}) = \frac{V(\text{struct})}{KG} \quad (\text{mm}^3/\text{g})$$

Formel 6: $MsV(\text{struct})$: Massenspezifisches Volumen Struktur X (mm^3/g KG), $V(\text{struct})$: Volumen Struktur X (mm^3), KG: Körpergewicht (g)

3.2.7.2 Parameter zur Beurteilung der Gasaustauschfläche

Oberflächendichte: Gleichzeitig wurde auch die Dichte der alveolären Oberfläche S_v bestimmt. Um die alveoläre Oberfläche in der Lunge zu quantifizieren, wird ein Linienraster über das Sichtfeld gelegt und die Durchtritte der Linien durch AS und Nicht-Parenchym gezählt. Das Volumen der Oberfläche korreliert mit der Anzahl der intersections mit den Testlinien. Die Oberflächendichte ist dann die Oberfläche pro Referenzvolumen unter Berücksichtigung der Testlinienlänge. In diesem Fall wurden die blauen Masterpunkte der Linien nur gezählt, wenn sie auf Luft fielen. Über den vorher bestimmten Anteil der Luft am gesamten Parenchym konnten dann die relativ auf Parenchym liegenden Punkte ermittelt werden, welche das Referenzvolumen bildeten. Durch Multiplikation von S_v mit dem Lungenvolumen konnte die absolute Oberfläche S in cm^2 berechnet werden. Außerdem wurde die massenspezifische Oberfläche (MsS) ermittelt, indem S in Bezug zum Körpergewicht gesetzt wurde. Die L_p (μm) bezeichnet die Länge pro im Raster verwendeter Testlinie.

$$S_v(\text{Alvepi}) = \frac{2 \times \sum \text{intersections (AS)}}{\frac{\sum P(\text{Luft}) \times L_p}{V_v(\text{Par})}} \quad (\mu\text{m}^{-1})$$

Formel 7: $S_v(\text{Alvepi})$: Oberflächendichte Alveolarepithel (μm^{-1}), $\sum \text{intersections (AS)}$: Gesamtheit der Schnittpunkte mit Alveolarseptum, $\sum P(\text{Luft})$: Gesamtheit der Punkte auf Luft, $V_v(\text{Par})$: Volumendichte Parenchym (%), L_p : length per Point = $78,7 \mu\text{m}$

$$S(\text{Alvepi}) = V(\text{Par}) \times S_v(\text{Alvepi}) \quad (\text{cm}^2)$$

Formel 8: S(Alvepi): Gesamtoberfläche Alveolarepithel (cm²), V(Par): Volumen Parenchym (mm³), S_v(Alvepi): Oberflächendichte Alveolarepithel (μm⁻¹)

$$MsS(\text{Alvepi}) = \frac{S(\text{Alvepi})}{KG} \quad (\text{cm}^2/\text{g})$$

Formel 9: MsS(Alvepi): Massenspezifische Oberfläche Alveolarepithel (cm²/g), S(Alvepi): Gesamtoberfläche Alveolarepithel (cm²), KG: Körpergewicht (g)

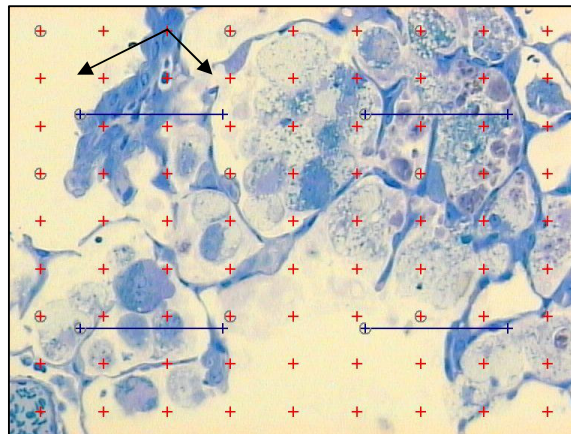


Abbildung 12: Kombiniertes Punkte- / Linienraster zur Berechnung der Volumendichten von Luft, AS, AM und KL (rotes Punkteraster) sowie der S_v (Pfeile)

Volumen/Oberflächenrelation der Alveolarsepten: Bei bekannter alveolärer Oberfläche (S) und Volumen der Alveolarsepten (V (AS)), kann die Volumen/Oberflächenrelation der beiden Parameter zur Beurteilung der Septendicke ermittelt werden.

$$V/S (\text{Sept}) = 2x \left[\frac{V (\text{AS}) * 10^9}{S (\text{Alvepi}) * 10^8} \right] \quad (\mu\text{m})$$

Formel 10: V/S (Sept): Volumen/Oberflächenrelation der Alveolarsepten (μm), V (AS): Volumen Alveolarsepten (mm³), S (Alvepi): Gesamtoberfläche Alveolarepithel (cm²)

Mean Chord Length (Cm): Für diese Auswertung wurde eine 20-fache Vergrößerung gewählt; die Schrittgröße betrug 2000x2000 µm. Um die Größe der Alveolen zu analysieren, wurde ein vertikales Liniennetz über das Sichtfenster gelegt und die intersections der Linien mit Alveolarepithel bzw. den Wänden der Ductus Alveolares, da der Übergang fließend ist, vermessen. Die Linien besaßen darüber hinaus Punkte, die gekennzeichnet wurden, wenn sie auf Alveolarseptum fielen. Diese konnten dann ins Verhältnis zu den intersections gesetzt werden. Diese Vorgehensweise wird als TVP (total vertical projections) bezeichnet und ermöglicht die direkte Bestimmung der absoluten Länge eines Objektes. Cm repräsentiert die Distanz zwischen den Alveolarsepten und somit die Alveolengröße; eine Vergrößerung der Alveolen führt folglich zur Vergrößerung von Cm.

$$Cm = \frac{\sum P(AS) \times Lp}{\sum \text{intersections (AS)}} \quad (\mu m)$$

2

Formel 11: Cm: Mean Chord Length (µm), $\sum P(AS)$: Gesamtheit aller Punkte auf Alveolarseptum, Lp: length per point = 35µm, $\sum \text{intersections (AS)}$: Gesamtheit aller Schnittpunkte mit Alveolarseptum

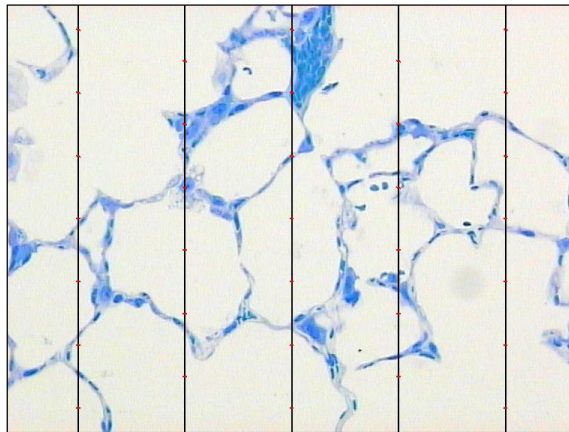


Abbildung 13: Sichtfeld mit Liniennraster der Cm Auswertung

Volumen-gewichtetes mittleres Volumen (MV) = Alveolarweiten: Methode der Wahl zur Bemessung des MV ist das von Gundersen und Jensen 1985 vorgestellte „point sampled intercept“ (PSI). Wie bei Cm gehen auch hier sowohl Alveolen, als auch die Ductus Alveolares in die Auswertung ein. Es wurde hierzu ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung benutzt und die Größe der Schritte auf 2000 x 2000 µm festgelegt. Auf das Sichtfeld wurde ein isotropes Liniengitter mit drei Linien und jeweils vier darauf befindlichen Punkten projiziert, welche in ihrem Abstand definiert waren. Befand sich ein Punkt zwischen zwei Alveolarwänden, wurden diese markiert und der Abstand durch die Software bestimmt. So wurden gleichzeitig die Anzahl der Alveolen pro Sichtfeld und der Abstand zwischen den einzelnen Septen vermessen. Das Volumen-gewichtete mittlere Volumen (= volume weighted mean volume) entspricht dem mittleren Volumen einer Struktur, wenn diese proportional zu ihrem Volumen gewichtet wird. Man kann das MV auch als funktionsgewichtetes mittleres Volumen bezeichnen. Es lassen sich somit Rückschlüsse vom MV auf die Funktionalität seiner Struktur ziehen (Inuwa und El Mardi 2005). So wie Cm ist auch MV ein Parameter zur Beurteilung der Gasaustauschräume.

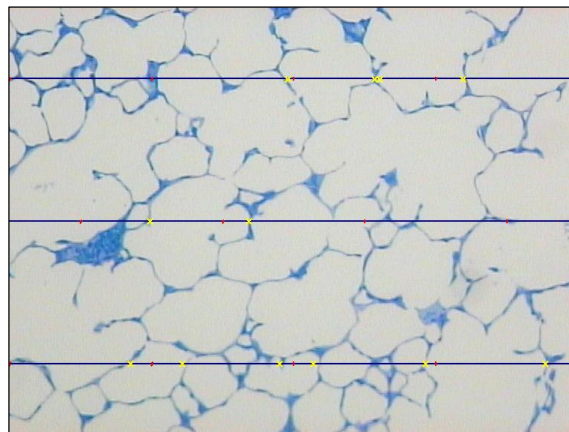


Abbildung 14: Sichtfeld mit Liniengitter zur Berechnung des volumen-gewichteten mittleren Volumens

3.2.8 Explorative Statistik und Datendarstellung

Die statistische Untersuchung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Software Programms GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Die Daten werden im Ergebnisteil als arithmetische Mittelwerte (MW) mit einfacher Standardabweichung ($\pm$ StAbw) dargestellt und wurden mithilfe von two-way ANOVA (analysis of variance) inklusive Bonferroni-Adjustierung hinsichtlich der Faktoren „Alter“ und „Geschlecht“ miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde innerhalb des 95% Konfidenzintervalls mit einem p-Wert $< 0,05$ bemessen. Die Daten sind in Form von „boxes and whiskers“ dargestellt, wobei Median, arithmetischer Mittelwert, die 25. und 75. Perzentile der Werteverteilung sowie die minimal und maximal erreichten Werte gezeigt werden (siehe Abbildung 15).

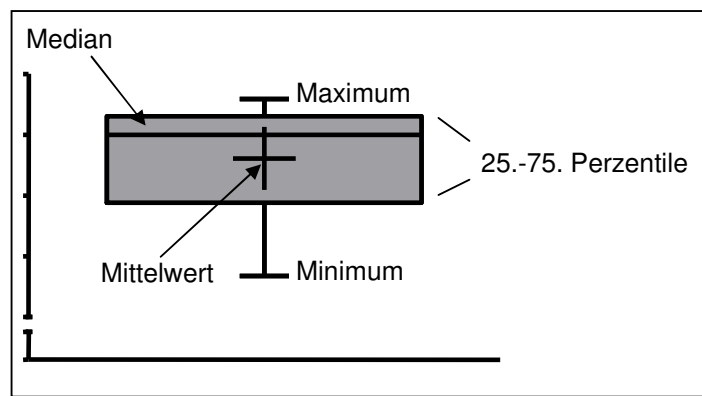


Abbildung 15: Ergebnisdarstellung

4 Ergebnisse

4.1 Körpergewicht

Sowohl weibliche als auch männliche Tiere zeigten im Versuchsverlauf eine deutliche Gewichtszunahme. Das Gewicht der Tiere betrug im Alter von 28 Tagen $14,4 \pm 0,5$ g (w) beziehungsweise $17,3 \pm 1,75$ g (m) und unterschied sich damit signifikant vom Körpergewicht der 12 Monate alten Tiere mit $34,2 \pm 4,89$ g (w), respektive $47,1 \pm 3,48$ g (m) ($p < 0,05$). Bei den Weibchen unterschieden sich nur die Altersgruppen 6 und 12 Monate signifikant, wohingegen das Gewicht der Männchen sowohl zwischen 28 Tagen und 3 Monaten, als auch zwischen 6 und 12 Monaten signifikant zunahm. Hinsichtlich des Faktors „Geschlecht“ zeigten sich bei gleichaltrigen Tieren signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen ab dem Alter von 3 Monaten.

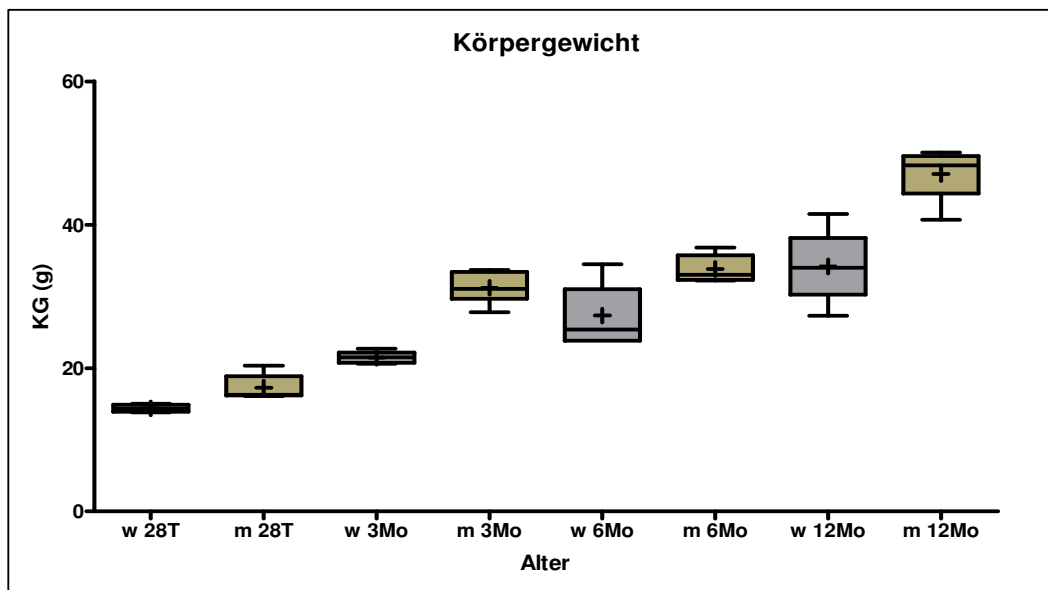


Abbildung 16: Körpergewicht in Bezug auf Alter und Geschlecht (g)

4.2 Lungenvolumen und massenspezifisches Lungenvolumen

Bezüglich des Faktors „Alter“ verdoppelte sich bei beiden Geschlechtern das Lungenvolumen im Versuchsverlauf annähernd. Es nahm bei den Weibchen von $653 \pm 184 \text{ mm}^3$ auf $1410 \pm 140 \text{ mm}^3$ und bei den Männchen von $727 \pm 150 \text{ mm}^3$ auf $1390 \pm 163 \text{ mm}^3$ zu. Die Zunahme des Lungenvolumens war jeweils nur zwischen 28 Tagen und 3 Monaten signifikant festzustellen ($p < 0,05$), danach erhöhte es sich nur noch geringfügig. Obwohl Körpergewicht und Lungenvolumen zunahmen, blieb das massenspezifische Lungenvolumen (MsV) bei den Weibchen ($45,4 \pm 12,8$ (28T) zu $42 \pm 7,44 \text{ mm}^3/\text{g}$ (12Mon)) konstant, während es bei Männchen von $41,8 \pm 5,06$ (28T) auf $29,5 \pm 2,64 \text{ mm}^3/\text{g}$ (12Mon) abnahm. Im direkten Geschlechtervergleich der gleichaltrigen Tiere zeigten sich in keiner Altersgruppe signifikante Unterschiede bezüglich des Lungenvolumens (siehe Abbildung 17 und 18).

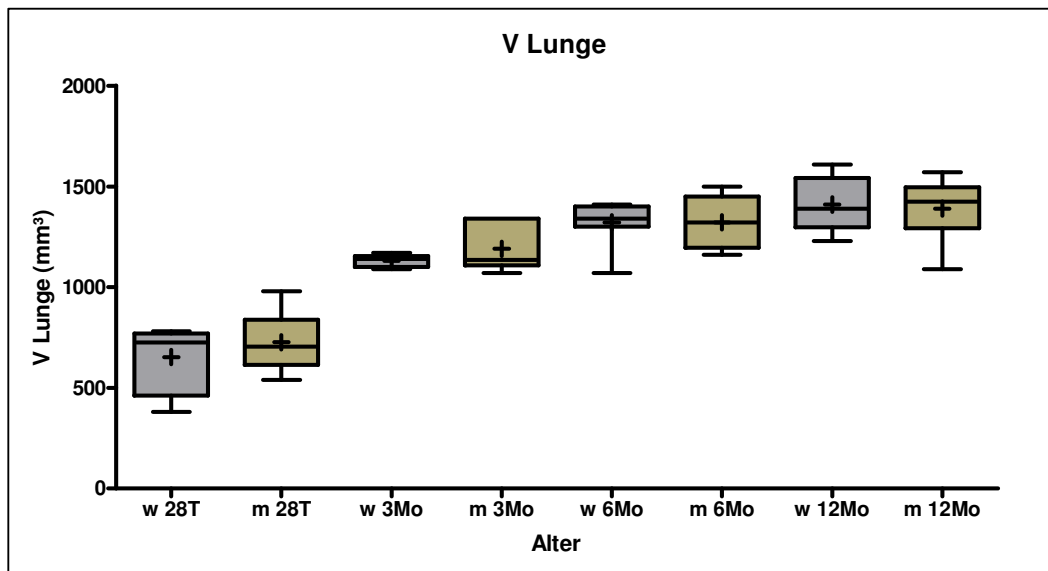


Abbildung 17: Lungenvolumen in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³)

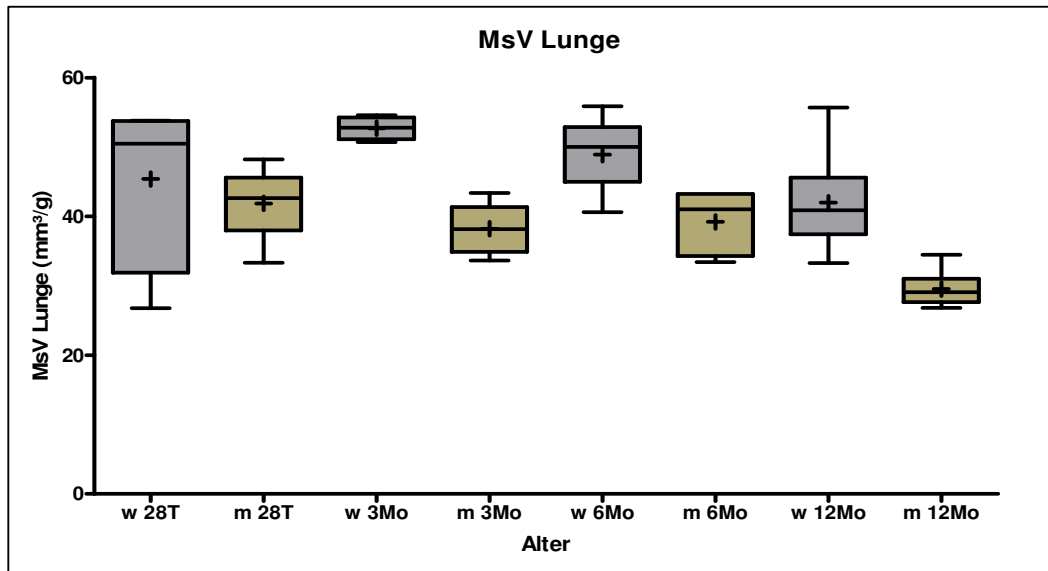


Abbildung 18: Massenspezifisches Lungenvolumen in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³/g)

	w28T	m28T	w3Mo	m3Mo	w6Mo	m6Mo	w12Mo	m12Mo
n =	4	6	5	6	7	5	6	6
Gewicht	14,4 ±	17,3 ±	21,5 ±	31,2 ±	27,3 ±	33,8 ±	34,2 ±	47,1 ±
(g)	0,51	1,75	0,81	2,15	4,12	1,93	4,89	3,48
V Lunge	653 ±	727 ±	1130 ±	1190 ±	1321 ±	1322 ±	1410 ±	1390 ±
(mm³)	184	150	30,8	119	119	135	140	163
MsV Lunge	45,4 ±	41,8 ±	52,7 ±	38,2 ±	48,9 ±	39,2 ±	42 ±	29,5 ±
(mm³/g)	12,77	5,06	1,59	3,67	5,46	4,62	7,44	2,64

Tabelle 7: Biologische Voraussetzungen

4.3 Volumenveränderungen der Kompartimente

Zur Bewertung der Veränderungen der einzelnen Lungenkompartimente betrachteten wir die Volumendichten von Parenchym und Nichtparenchym, Luft und Alveolarsepten, Makrophagen und Kapillarlumen, sowie die Volumendichte und das absolute Volumen von Nicht-Lungengewebe.

4.3.1 Nicht-Parenchym

Für Volumenanteile des Nicht-Parenchyms ergaben sich weder hinsichtlich des Faktors „Alter“, noch bezogen auf den Einfluss des Geschlechts signifikante Unterschiede. Die altersspezifischen Unterschiede im absoluten Volumen des Nicht-Parenchyms sowie des massenspezifischen Volumens spiegeln daher die Veränderungen auf der Ebene des Lungenvolumens wider.

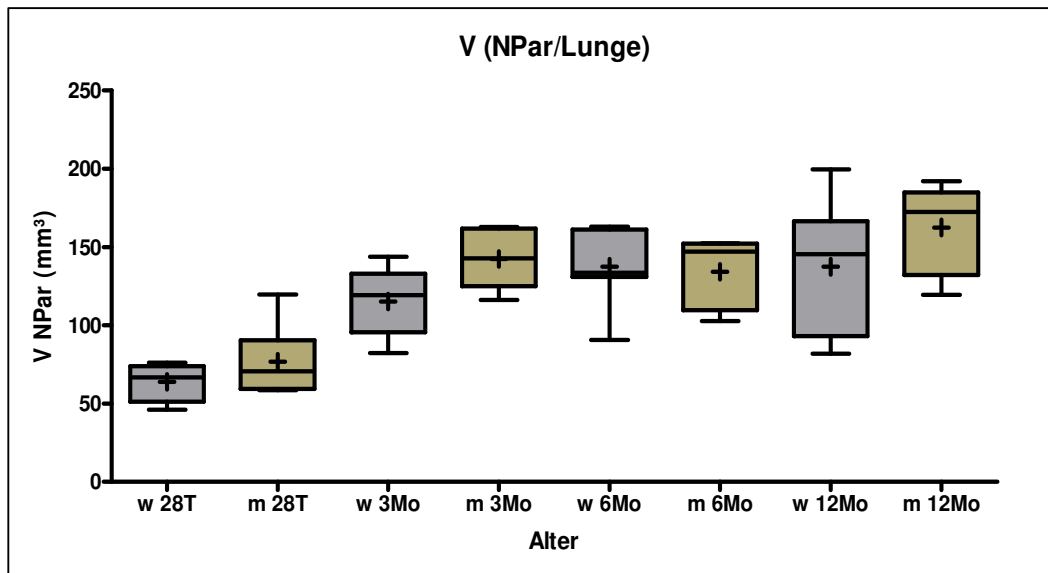


Abbildung 19: Volumen Nicht-Parenchym in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³)

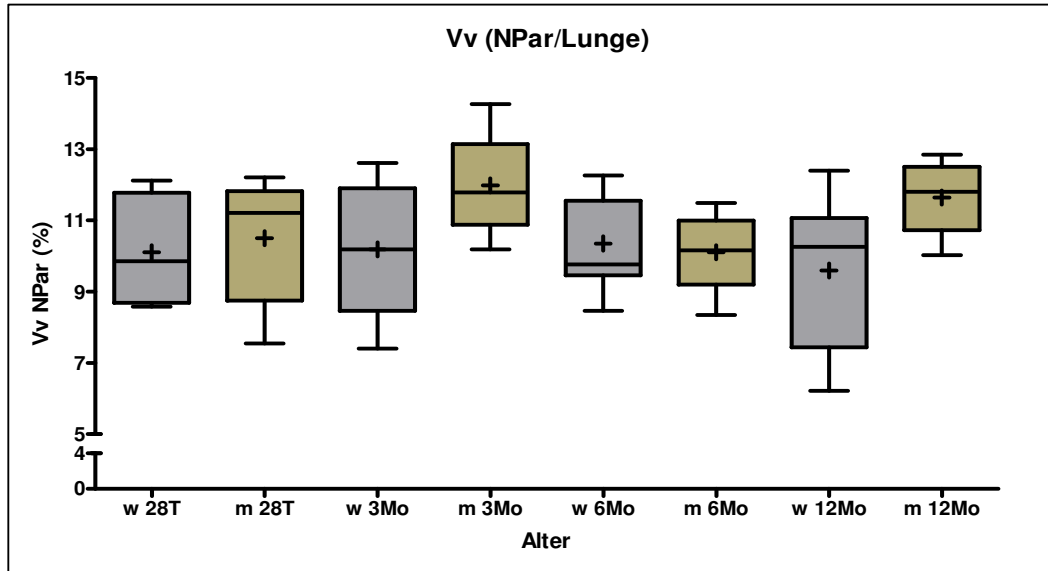


Abbildung 20: Volumendichte Nicht-Parenchym in Bezug auf Alter und Geschlecht (%)

	w28T	m28T	w3Mon	m3Mon	w6Mon	m6Mon	w12Mon	m12Mon
V Npar (mm ³)	63,9 ± 12,7	76,6 ± 23,5	115 ± 22,5	142 ± 18,7	137 ± 24,7	134 ± 23	137 ± 42,8	163 ± 29
Vv Npar (%)	10,1 ± 1,63	10,5 ± 1,78	10,2 ± 1,94	12 ± 1,42	10,4 ± 1,39	10,1 ± 1,14	9,6 ± 2,20	11,6 ± 1,05
MsV Npar (mm ³ /g)	4,44 ± 0,82	4,41 ± 1,02	5,37 ± 1,05	4,59 ± 0,81	5,11 ± 1,18	3,99 ± 0,81	4,05 ± 1,23	3,45 ± 0,52

Tabelle 8: Volumen (V), Volumendichte (Vv), Massenspezifisches Volumen (MsV) Nicht-Parenchym

4.3.2 Parenchym

Die Volumendichten von Parenchym, Luft und Alveolarsepten zeigten im Verlauf weder im Vergleich der Altersgruppen innerhalb eines Geschlechts, noch zwischen den gleichaltrigen Männchen und Weibchen signifikante Veränderungen. Die Veränderungen der absoluten Volumina repräsentieren somit verhältnismäßig die Zunahme des Lungenvolumens insgesamt.

Für die parenchymalen Volumendichten von Luft und Alveolarsepten ergaben sich sowohl hinsichtlich des Alters als auch des Geschlechts der Vergleichsgruppen keine Unterschiede, allerdings sank der Anteil an septalem Gewebe mit dem Alter leicht. Insgesamt stieg der Anteil des Kapillarlumens bei beiden Geschlechtern an, wobei der Unterschied bei den Weibchen erst zwischen 3 und 12 Monaten signifikant war (siehe Abbildung 26-30). Lediglich bei den Männchen nahm die Volumendichte der Makrophagen mit dem Alter leicht zu.

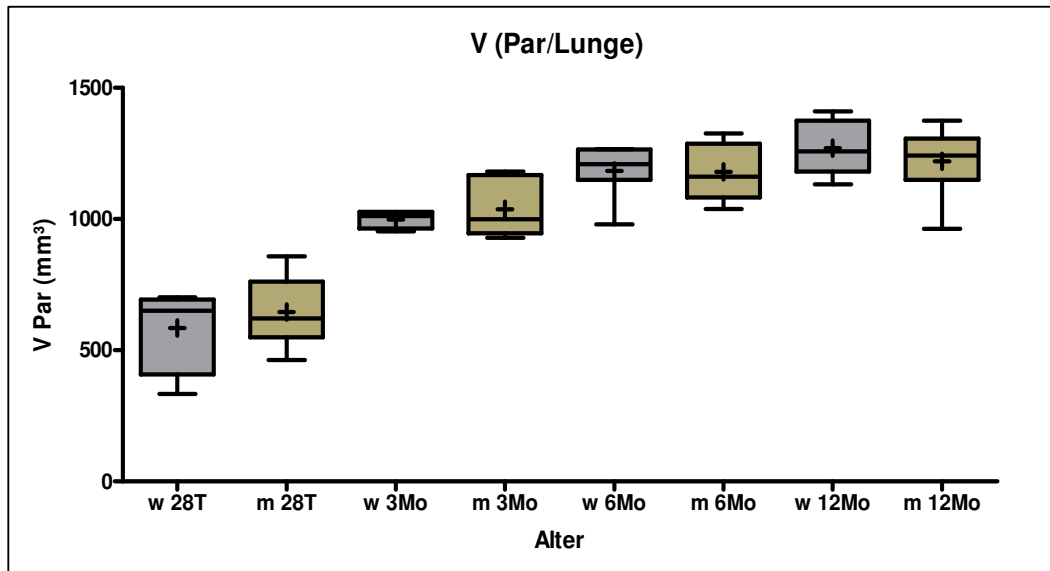


Abbildung 21: Volumen Parenchym in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³)

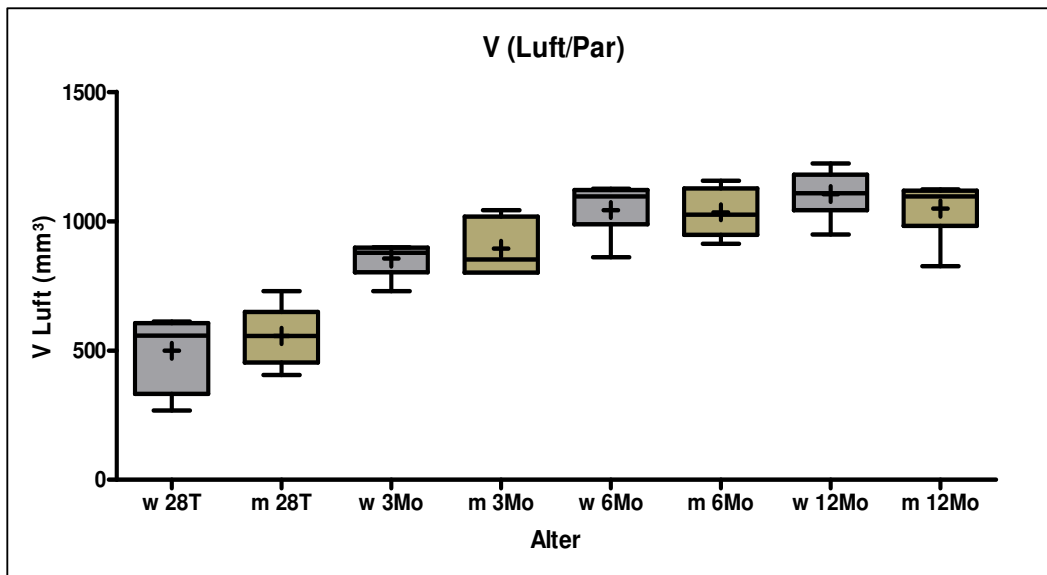


Abbildung 22: Volumen alveoläre Luft in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³)

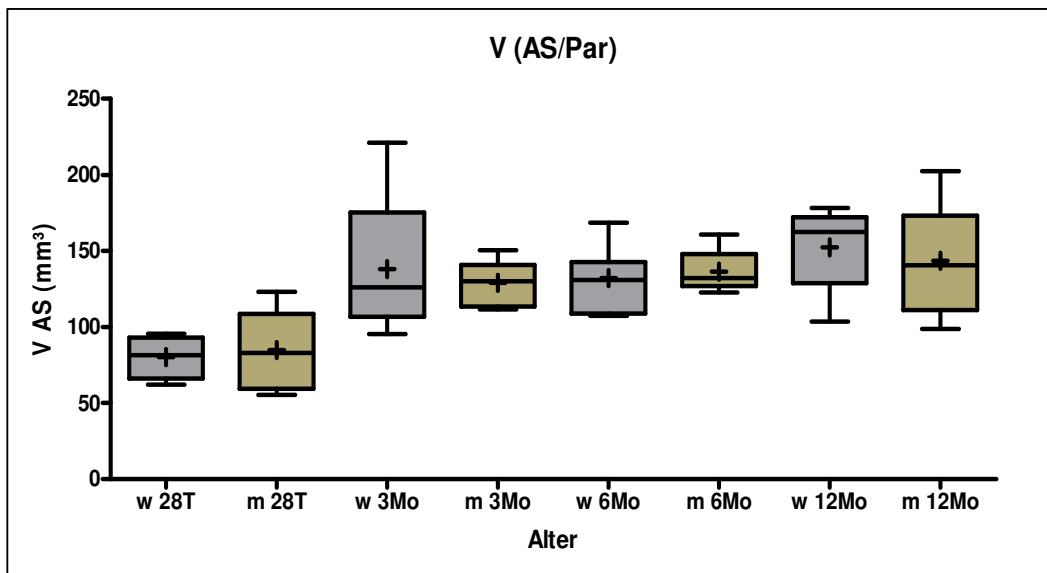


Abbildung 23: Volumen Alveolarsepten in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³)

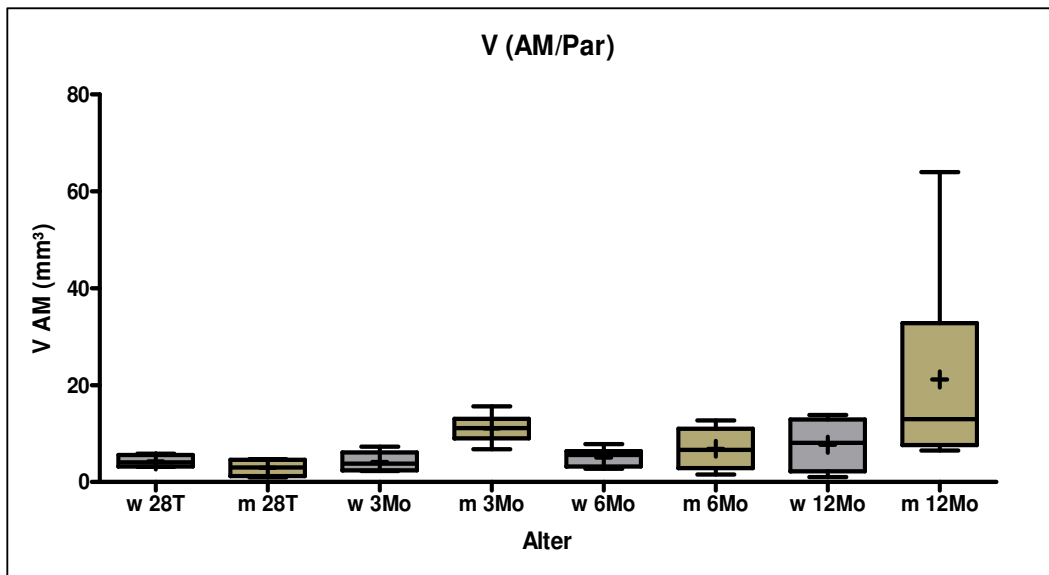


Abbildung 24: Volumen Alveolarmakrophagen in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³)

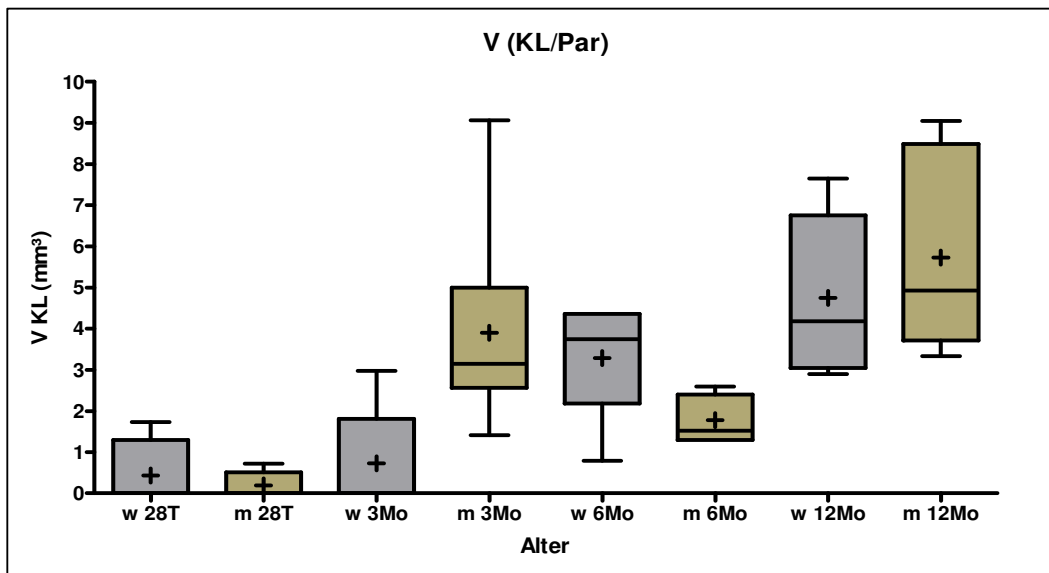


Abbildung 25: Volumen Kapillarlumen in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm³)

	w28T	m28T	w3Mo	m3Mo	w6Mo	m6Mo	w12Mo	m12Mo
V Par (mm ³)	584 ± 170	645 ± 136	999 ± 33,4	1037 ± 109	1184 ± 101	1180 ± 111	1270 ± 104	1220 ± 138
V Luft (mm ³)	499 ± 158	557 ± 115	856 ± 71,4	893 ± 109	1043 ± 96,6	1035 ± 95,5	1105 ± 93,8	1049 ± 114
V AS (mm ³)	80,2 ± 14,1	84,9 ± 28,8	138 ± 48,4	129 ± 15,1	132 ± 21,1	136 ± 14,3	152 ± 27,6	144 ± 38,8
V AM (mm ³)	4,30 ± 1,23	2,94 ± 1,62	4,17 ± 2,06	11,1 ± 2,92	5,10 ± 1,83	6,89 ± 4,33	7,72 ± 5,58	21,2 ± 21,84
V KL (mm ³)	0,43 ± 0,87	0,19 ± 0,31	0,72 ± 1,29	3,90 ± 2,64	3,29 ± 1,35	1,78 ± 0,591	4,74 ± 1,93	5,73 ± 2,39

Tabelle 9: Absolute Volumina (V) von Parenchym und Parenchymkomponenten

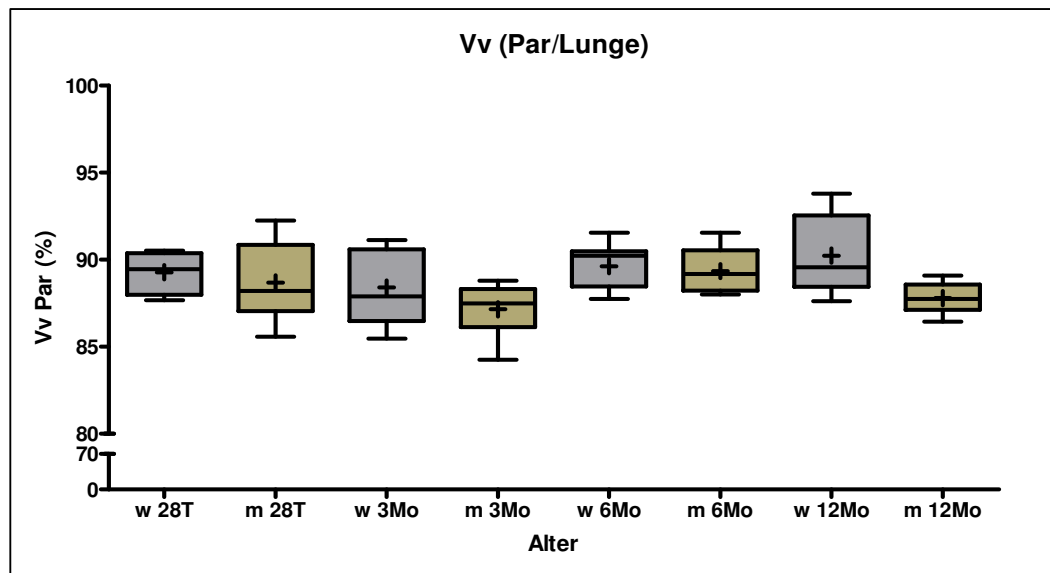


Abbildung 26: Volumendichte Parenchym in Bezug auf Alter und Geschlecht (%)

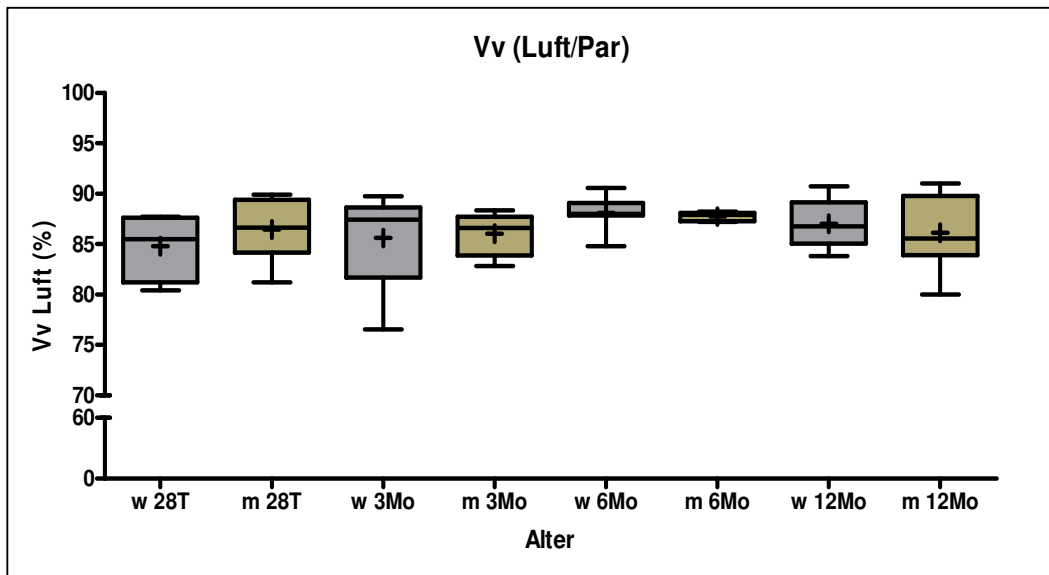


Abbildung 27: Volumendichte alveoläre Luft (%)

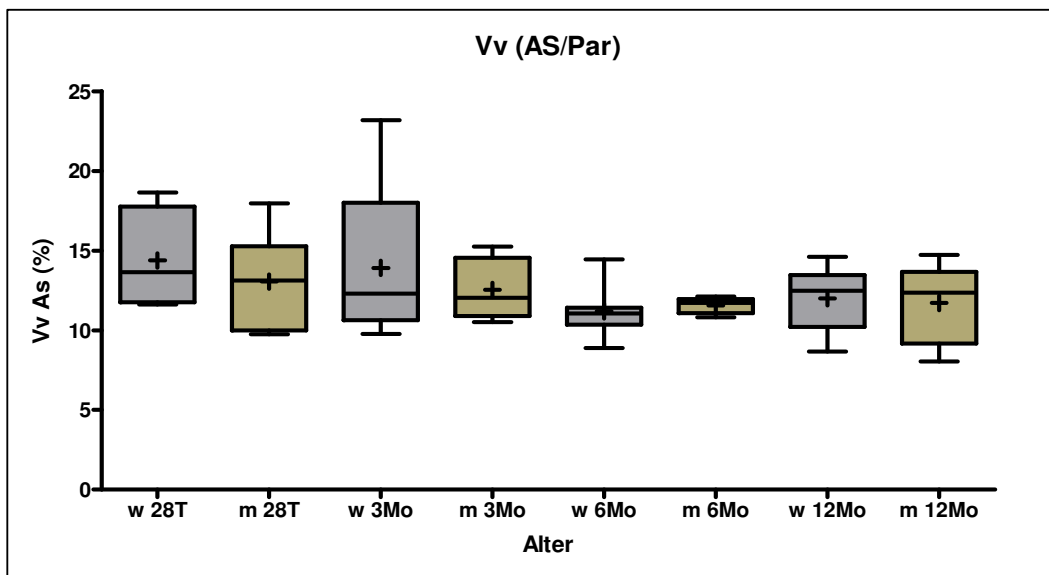


Abbildung 28: Volumendichte Alveolarsepten in Bezug auf Alter und Geschlecht (%)

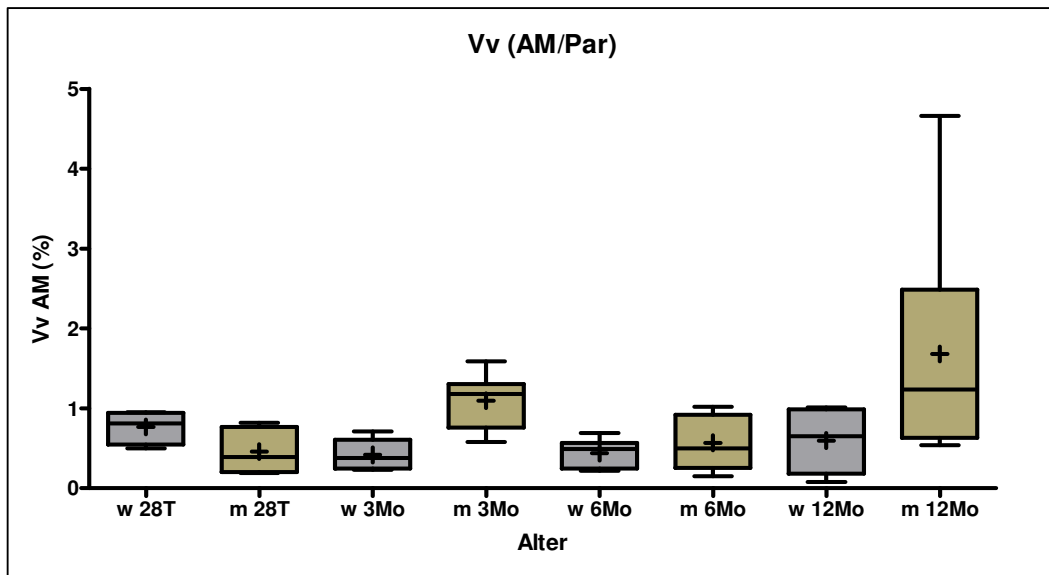


Abbildung 29: Volumendichte Alveolarmakrophagen in Bezug auf Alter und Geschlecht (%)

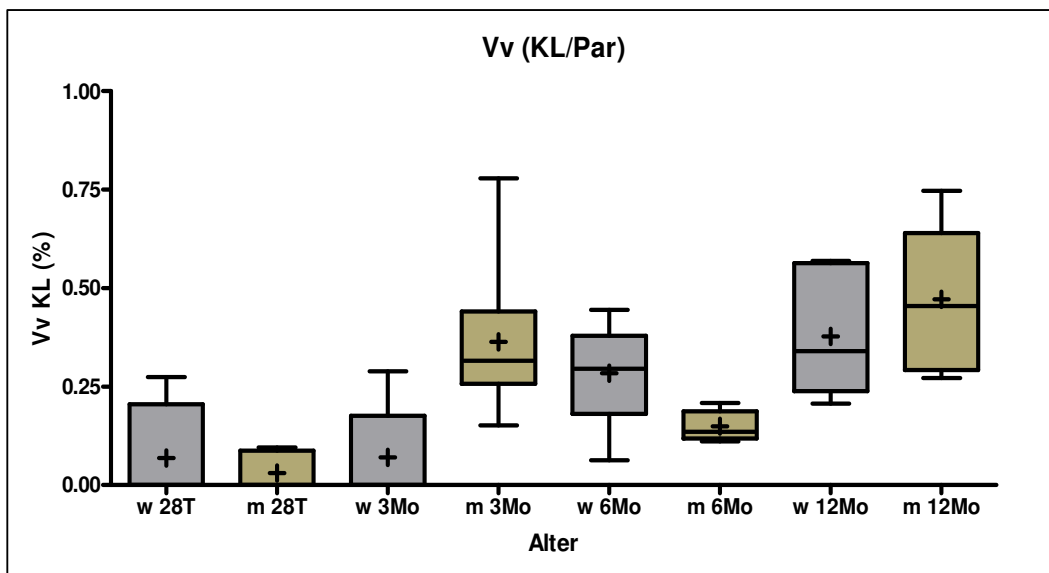


Abbildung 30: Volumendichte Kapillarlumen in Bezug auf Alter und Geschlecht (%)

	w28T	m28T	w3Mo	m3Mo	w6Mo	m6Mo	w12Mo	m12Mo
Vv Par	89,3 ±	88,7 ±	88,4 ±	87,2 ±	89,6 ±	89,3 ±	90,2 ±	87,8 ±
(%)	1,25	2,35	2,23	1,63	1,37	1,37	2,3	0,91
Vv Luft	84,8 ±	86,5 ±	85,6 ±	86 ±	88,1 ±	87,7 ±	87 ±	86,1 ±
(%)	3,44	3,19	5,19	2,09	1,75	0,44	2,42	3,84
Vv AS	14,4 ±	13,1 ±	13,9 ±	12,5 ±	11,2 ±	11,6 ±	12 ±	11,7 ±
(%)	3,23	3,10	5,32	1,87	1,67	0,51	2,07	2,49
Vv AM	0,77 ±	0,46 ±	0,42 ±	1,09 ±	0,44 ±	0, 57 ±	0,6 ±	1,68 ±
(%)	0,21	0,27	0,2	0,35	0,17	0,35	0,42	1,56
Vv KL	0,07 ±	0,03 ±	0,07 ±	0,36 ±	0,28 ±	0,15 ±	0,38 ±	0,47 ±
(%)	0,14	0,05	0,13	0,21	0,13	0,04	0,16	0,19

Tabelle 10: Volumendichten (Vv) von Parenchym und Parenchymkompartimenten

	w28T	m28T	w3Mo	m3Mo	w6Mo	m6Mo	w12Mo	m12Mo
MsV Par	40,6 ±	37,1 ±	46,6 ±	33,3 ±	43,8 ±	35 ±	37,8 ±	25,9 ±
(mm ³ /g)	11,8	4,78	1,87	2,98	4,41	3,74	6,66	2,25
MsV Luft	34,7±	32,1 ±	39,9 ±	28,7 ±	38,5 ±	30,7 ±	32,9 ±	22,3 ±
(mm ³ /g)	11,1	4,28	3,51	2,95	3,75	3,3	5,71	1,42
MsV AS	5,57 ±	4,86 ±	6,44 ±	4,15 ±	4,91 ±	4,04 ±	4,54 ±	3,06 ±
(mm ³ /g)	0,85	1,32	2,25	0,55	1,05	0,41	1,17	0,84
MsV AM	0,3 ±	0,17 ±	0,19 ±	0,36 ±	0,19 ±	0,2 ±	0,23 ±	0,46 ±
(mm ³ /g)	0,08	0,1	0,09	0,09	0,09	0,13	0,17	0,48
MsV KL	0,03 ±	0,01 ±	0,03 ±	0,13 ±	0,12 ±	0,05 ±	0,15 ±	0,13 ±
(mm ³ /g)	0,06	0,02	0,06	0,08	0,05	0,02	0,08	0,05

Tabelle 11: Massenspezifische Volumina (MsV) von Parenchym und Parenchymkompartimenten

4.4 Veränderungen der Gasaustauschräume

Zur Beurteilung der Gasaustauschräume wurden die Mean Chord Length (Cm) und das volumen-gewichtete mittlere Volumen (MV) als Indikatoren für die Weite der distalen (parenchymalen) Lufträume (Alveole und Ductus) ermittelt. Bei den Männchen nahm Cm von $55,4 \pm 6,04 \mu\text{m}$ (28T) auf $63,1 \pm 4,77 \mu\text{m}$ (12Mon) leicht zu, während die Weibchen zu Beginn kleinere Alveolen besaßen, deren Größe sich signifikant erhöhte ($46,5 \pm 8,52 \mu\text{m}$ (28T) zu $63,9 \pm 4,38 \mu\text{m}$ (12Mon)). Dieser Größenzuwachs geschah vor allem bis zum dritten Lebensmonat. Zwischen den jeweils gleichaltrigen Männchen und Weibchen sowie der durchschnittlichen Cm aller weiblichen bzw. männlichen Mäuse zeigten sich leichte, jedoch nicht signifikante Unterschiede.

Der einzige signifikante Unterschied in der Veränderung von MV zeigte sich zwischen den 28 Tage alten Männchen und Weibchen und den 12 Monate alten Weibchen ($216 \pm 153 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ (w 28T) bzw. $231 \pm 55,9 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ (m 28T) zu $419 \pm 152 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^3$ (w 12Mon)). Zwischen allen anderen Vergleichsgruppen bestanden, wenn überhaupt, nur leichte Differenzen. Zu Beginn war das MV der Weibchen kleiner, im Alter von 12 Monaten jedoch leicht größer als bei den Männchen. Es zeigte sich also, dass sowohl Cm als auch MV bei den Weibchen stärker zunehmen, als bei den Männchen. Die individuellen Werte der Weibchen variierten jedoch stärker als die der Männchen.

Ein Parameter zur Beurteilung der Veränderung von Oberflächen ist die Alveolaroberflächendichte (S_V), bzw. die absolute (S) und massenspezifische Alveolaroberfläche (MsS). Bei beiden Geschlechtern nahm die Oberflächendichte mit dem Alter ab. Bei den Weibchen war der Unterschied zwischen den 28 Tage und 12 Monate alten Tieren signifikant und am deutlichsten ausgeprägt zwischen dem ersten und dritten Monat. Bei den Männchen war der Verlust an Oberflächendichte nur leicht ausgeprägt. Es gab weder zwischen den Geschlechtern insgesamt, noch zwischen den verschiedenen geschlechtlichen Altersgruppen signifikante Unterschiede. Bezogen auf das Lungenvolumen jedoch, das wie erwähnt im Versuchsverlauf deutlich zunahm, nahm die absolute Alveolaroberfläche ebenfalls zu. Der Größenzuwachs

erfolgte hierbei analog zum Volumenwachstum und war zwischen 28 Tagen und 3 Monaten am deutlichsten zu sehen ($p < 0,05$). Die Tiere verloren also in geringerem Maße an Oberflächendichte, als sie an Lungenvolumen gewannen. Bei den Weibchen nahm S von $326 \pm 73,5 \text{ cm}^2$ (28T) auf $609 \pm 56,1 \text{ cm}^2$ (12Mon) zu, bei den Männchen betrug S $342 \pm 56,4 \text{ cm}^2$ (28T, bzw. $579 \pm 70,8 \text{ cm}^2$ (12Mon). Zwischen den Geschlechtern zeigten sich erneut in keiner der Altersgruppen Unterschiede. Wie das massenspezifische Lungenvolumen lag auch die durchschnittliche massenspezifische Oberfläche der Weibchen deutlich über der der Männchen ($21,6 \pm 3,8$ zu $16,5 \pm 3,26 \text{ cm}^2/\text{g}$). Sie nahm bei den Männchen deutlich, bei den Weibchen nur leicht ab, wobei die Unterschiede vor allem im Geschlechtervergleich im Alter von 3 und 12 Monaten deutlich wurden. Innerhalb eines Geschlechtes traten signifikante Veränderungen nur bei den Männchen 28T/12Mon auf ($p < 0,05$) (siehe Abbildung 31-36). Die Alveolarseptendicke (V/S) als weiterer Parameter zur Beurteilung der Veränderungen von Gasaustauschräumen zeigte für keine der Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede.

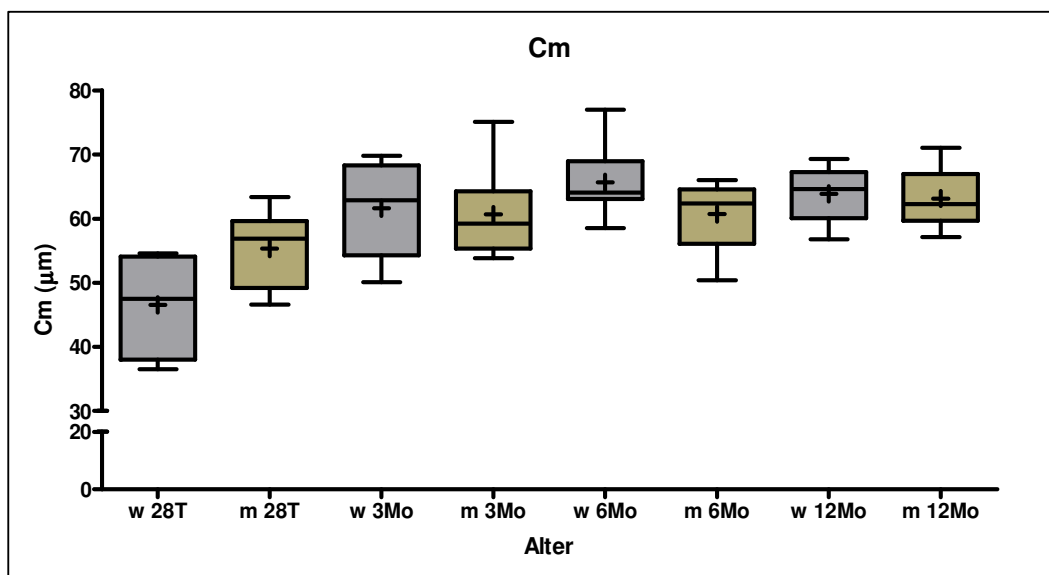


Abbildung 31: Mean Chord Length Cm in Bezug auf Alter und Geschlecht (µm)

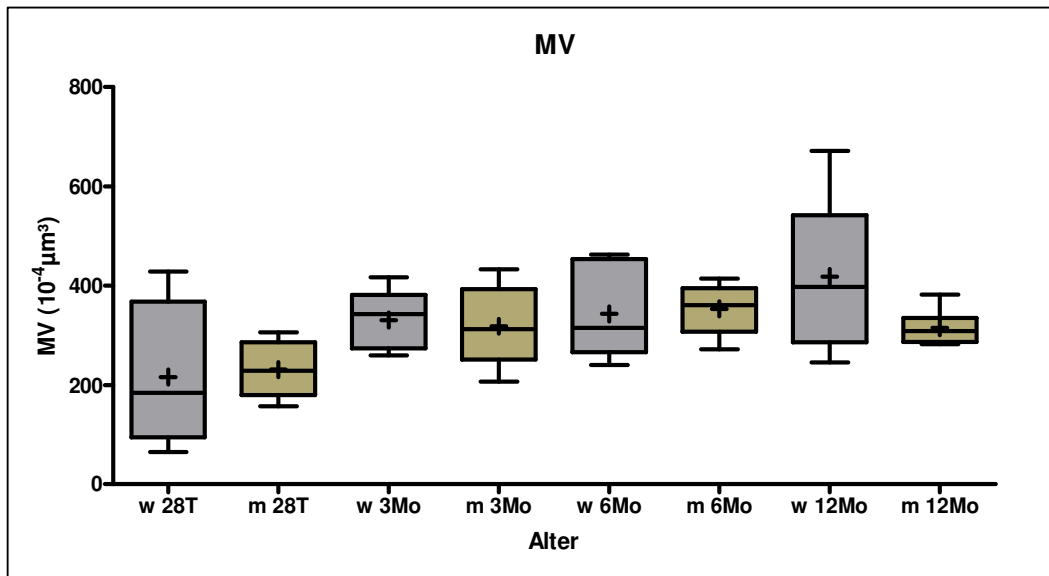


Abbildung 32: volumen-gewichtetes mittleres Volumen in Bezug auf Alter und Geschlecht ($10^{-4} \mu\text{m}^3$)

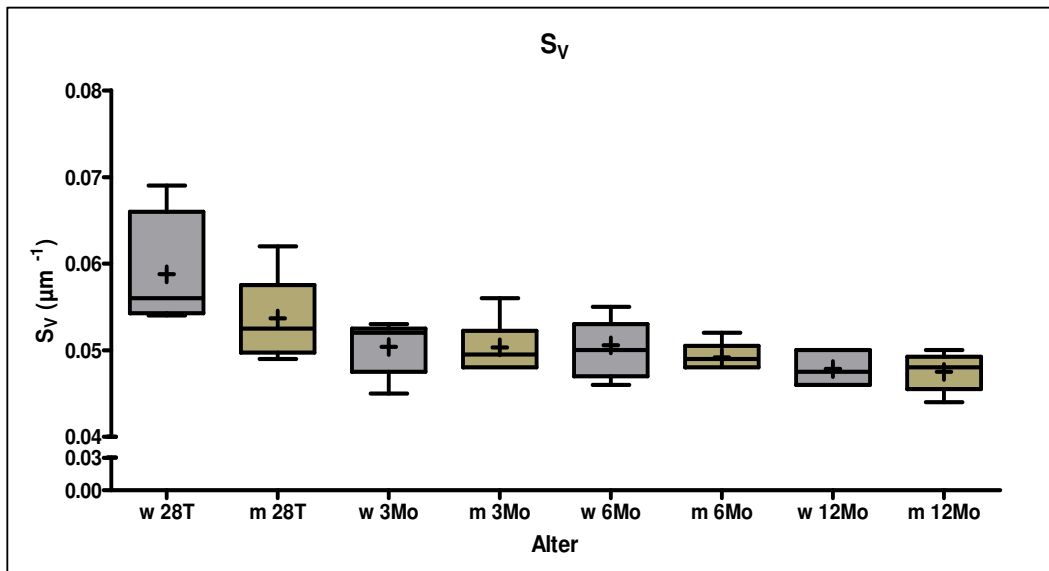


Abbildung 33: Oberfläche Alveolarepithel in Bezug auf Alter und Geschlecht (cm^2)

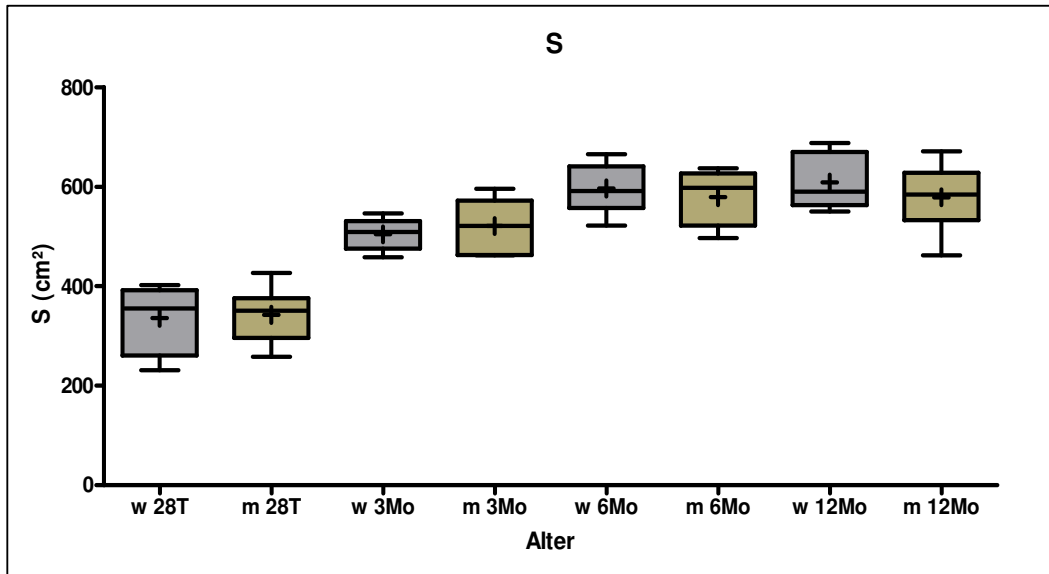


Abbildung 34: Oberfläche Alveolarepithel in Bezug auf Alter und Geschlecht (cm^2)

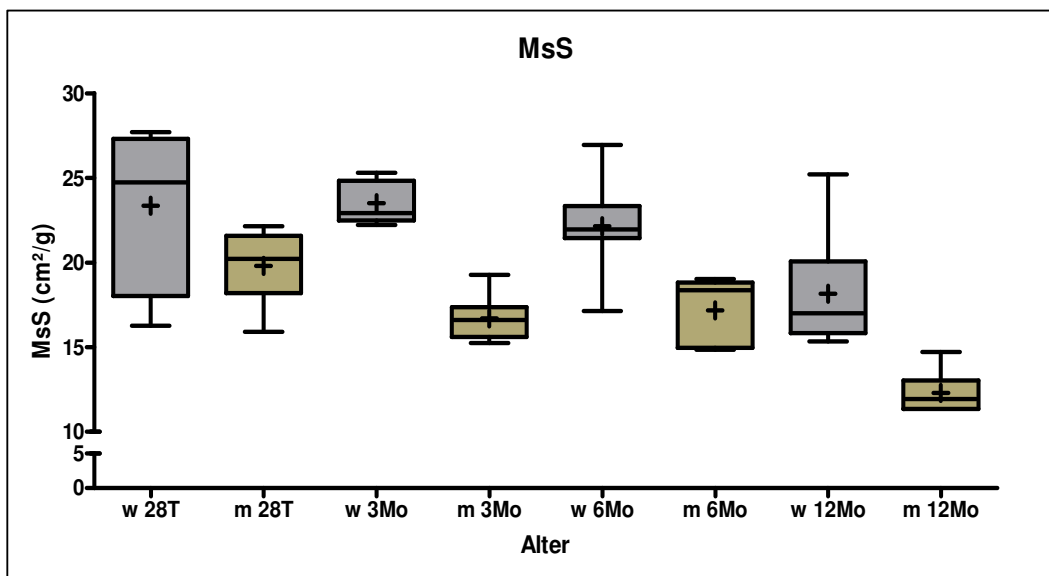


Abbildung 35: Massenspezifische Oberfläche Alveolarepithel in Bezug auf Alter und Geschlecht (mm^3/g)

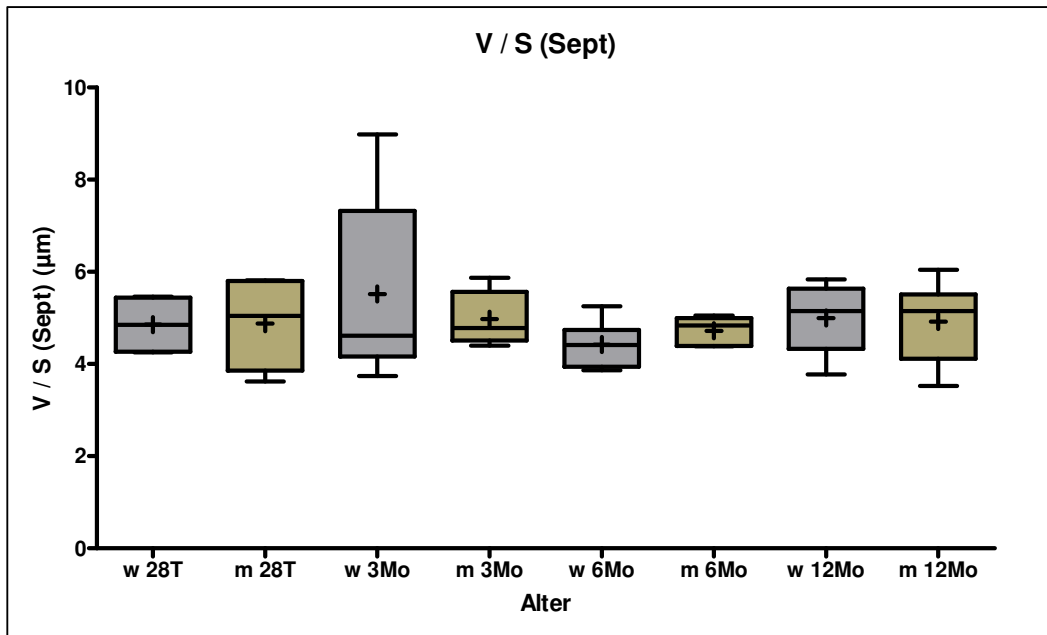


Abbildung 36: Alveolarseptendicke in Bezug auf Alter und Geschlecht (µm)

	w28T	m28T	w3Mon	m3Mon	w6Mon	m6Mon	w12Mon	m12Mon
Cm (µm)	46,5 ± 8,52	55,4 ± 6,04	61,6 ± 7,72	60,7 ± 7,54	65,7 ± 5,86	60,7 ± 6,01	63,9 ± 4,38	63,1 ± 4,77
MV (10⁻⁴ µm³)	216 ± 153	231 ± 55,9	331 ± 60,5	318 ± 85,3	344 ± 88,5	353 ± 52,5	419 ± 152	315 ± 36,2
Sv (µm⁻¹)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0	0,05 ± 0
S (cm²)	336 ± 73,5	342 ± 56,4	504 ± 32,3	521 ± 56,8	597 ± 50,4	579 ± 56,8	609 ± 56,1	579 ± 70,8
MsS (cm²/g)	23,4 ± 5,07	19,8 ± 2,26	23,5 ± 1,28	16,7 ± 1,39	22,1 ± 2,89	17,2 ± 2,04	18,2 ± 3,61	12,3 ± 1,28
V/S (µm)	4,85 ± 0,66	4,87 ± 1,03	5,51 ± 2,05	4,97 ± 0,58	4,42 ± 0,49	4,72 ± 0,31	5 ± 0,75	4,92 ± 0,88

Tabelle 12: Parameter zur Berteilung der Gasaustauschfläche

5 Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Die Maus als Tiermodell in der Emphysemforschung

Im Zuge der Entwicklung molekularbiologischer Technologien der letzten Jahrzehnte haben sich in-vivo Modelle zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen von Physiologie und Pathologie der Lunge als erfolgreich erwiesen. Vor allem durch die Vielzahl an Möglichkeiten, Gene gezielt an- oder auszuschalten, stellt die Maus ein hervorragendes Versuchsobjekt zur Untersuchung der Konsequenzen von Genvariationen für den Organismus dar (Kwak et al. 2004). Die Maus ist momentan das dem Menschen am engsten verwandte Labortier, für welches Gen-knockouts verhältnismäßig unkompliziert erreicht werden können. So ermöglicht sie die genauere Erforschung der von den ausgeschalteten Genen kodierten Proteine. In der Surfactant Forschung haben sich eine Reihe von Mausmodellen und -stämmen mit verschiedenen, für die Produktion der jeweiligen Proteine relevanten Genvariationen etabliert (Glasser und Noguee 2006). Mithilfe von knockout Mäusen konnte unter anderem dargestellt werden, dass ein Mangel an SP-B mit dem Leben unvereinbar ist, während hingegen SP-C^{-/-} Mäuse postnatal zunächst normal gedeihen und erst später interstitielle Lungenerkrankungen entwickeln. Von entscheidender Bedeutung waren und sind transgene Mausmodelle speziell für die Entdeckung und Erforschung der immunmodulatorischen Eigenschaften von SP-A und SP-D (siehe auch Abschnitt SP-D knockout Mäuse, SP-D und Emphysem) (Glasser und Noguee 2006).

5.1.2 Materialauswahl, Gewebegewinnung, Fixierung, Sampling

Diese Arbeit wurde an C57/BL6 Mäusen durchgeführt, die nach Zigarettenrauchexposition in vorausgehenden Studien eine mittlere Emphysemanfälligkeit zeigten (Guerassimov et al. 2004), so dass die von uns beobachteten Veränderungen für den Mangel an SP-D repräsentativ sind und nicht auf generell erhöhter Tendenz zur Emphysementstehung dieses Stammes beruhen. Man kann davon ausgehen, dass, wenn sich ein Parameter bei 5 Versuchstieren in dieselbe Richtung entwickelt, dies einen signifikanten Unterschied darstellt und nicht auf Zufälle zurückzuführen ist ($p = (\frac{1}{2})^5$, also $p < 0,05$) (Jung et al. 2005), weswegen die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe dieser Arbeit entsprechend gewählt wurde.

Die verwendeten Fixationsmethoden bieten einen einfachen, schnellen und gleichmäßigen Weg zur Gewebefixierung, wobei das Fehlerrisiko bei der Instillation begrenzt bleibt (Fehrenbach und Ochs 1998; Fehrenbach 2000). Das verwendete Fixans in seiner Zusammensetzung aus Glutaraldehyd, Paraformaldehyd und Natrium-Cacodylatpuffer nutzt zum einen die Eigenschaft des Glutaraldehyds, in Geweben eine starke, wenngleich langsame Proteinvernetzung zu bewirken, zum anderen wird das Gewebe durch PFA relativ schnell, aber weniger stabil fixiert (Griffiths 1993; Fehrenbach und Ochs 1998). Bei der weit verbreiteten Einbettung von Geweben in Paraffin schrumpfen diese unvorhersehbar und ungleichmäßig um bis zu 25%. Die Einbettung in Glycol-Methacrylat (Technovit) bietet den Vorteil, dass es hierbei nicht zur Schrumpfung des Gewebes und somit zur Verfälschung der Ergebnisse durch die Einbettung kommt (Mandarim-de-Lacerda 2003; Ochs 2006). Die möglichst identische Abbildung der Organstrukturen auf den untersuchten Präparaten wurde hiermit gewährleistet. Bei der Auswahl der Schnitte wurden, wie schon erwähnt, verschiedene Design-basierte Verfahren angewandt, so dass ein systematischer Bias vermieden wurde (Cruz-Orive und Weibel 1981; Fehrenbach und Ochs 1998; Howard und Reed 1998).

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Biologische Voraussetzungen

Die Zunahme von Gewicht und Lungenvolumen der Versuchstiere entwickelten sich prinzipiell artgerecht. Sie nahmen jeweils zwischen dem ersten und dritten Lebensmonat am deutlichsten zu und wuchsen bis zum 12. Monat langsam weiter (Pinkerton und Green 2004).

5.2.2 Veränderungen der Lungenstrukturen

Im Laufe der Zeit haben sich in der Stereologie eine Reihe von Parametern zur Quantifizierung von Lungenstrukturen etabliert. Da sich Verlust von funktionsfähigem Lungengewebe und Gasaustauscheinheiten nicht mit allen Parametern gleich gut beurteilen lassen, wird zur unmissverständlichen Analyse emphysematöser Prozesse die Auswertung von Lungen-, Parenchym-, Luft- und Alveolarseptenvolumen, sowie der alveolären Oberfläche und des volumen-gewichteten mittleren Alveolarvolumens empfohlen. Die Alveolarseptendicke dient als Indikator für fibrotische Umwandlungen (Ochs 2006). Diese Arbeit orientiert sich an den genannten Empfehlungen; durch die Evaluation der Alveolarmakrophagen und des Kapillarlumens sind weitere Rückschlüsse auf Diffusionskapazität, alveoläre Entzündungsreaktionen und -Remodelling möglich (Ochs et al. 2004; Weibel et al. 2007).

5.2.2.1 Veränderungen der Gasaustauschfläche und des MsV

Die untersuchten Weibchen hatten meist ein signifikant höheres massenspezifisches Lungenvolumen als die gleichaltrigen Männchen. Es lag bei den 3 Monate alten Weibchen 37%, bei den 12 Monate alten sogar 65% über dem ihrer gleichaltrigen Artgenossen.

Tendenziell liegen das massenspezifische Lungenvolumen und die massenspezifische Oberfläche von geschlechtsreifen weiblichen Säugetieren über denen der Männchen. Das ist notwendig, um den Anforderungen an den weiblichen Organismus während der Reproduktion gerecht zu werden und wird nach allgemeiner Vorstellung durch eine höhere Anzahl an bis zu 50% kleineren Alveolen unterstützt (Massaro et al. 1995). Dies ließ sich in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigen. Zwar waren die Alveolen der Weibchen im Alter von 28 Tagen unsignifikant kleiner als die der Männchen, was sich in der Mean Chord Length Cm widerspiegelt, jedoch nahm ihre Größe derart zu, dass Cm ab dem Alter von 3 Monaten leicht über der der Männchen lag. Tendenziell ähnlich verhielt sich auch das volumen-gewichtete mittlere Volumen MV.

Wenn man berücksichtigt, dass Soutiere et al bei sechs bis acht Wochen alten C57/BL6 Wildtyp Mäusen (nach Fixation für 4 Stunden unter 14 cm Flüssigkeitssäule und Einbettung in Glykoldmethacrylat) eine Mean Chord Length von ca. 35 μm feststellten, suggerieren unsere Ergebnisse, dass die Cm unserer Versuchstiere bereits im Alter von 28 Tagen signifikant erhöht war. Sie nahm bei den Weibchen bis zum Alter von 12 Monaten um 37% und bei den Männchen um 14% weiter zu. Da unterschiedliche Fixationsbedingungen Entfaltung und Weite von Alveolen beeinflussen, ist die Vergleichbarkeit der Werte verschiedener Studien fraglich, so dass die aufgezeigten Unterschiede lediglich als Tendenz berücksichtigt werden können. Es fehlen zur Interpretation weitere vergleichbare Daten. Die deutliche Größenzunahme der Alveolen beider Geschlechter zwischen 28 Tagen und drei Monaten ist grundsätzlich zu erwarten, da die Tiere bis zur Geschlechtsreife insgesamt am stärksten wachsen. Danach vergrößern sich die Alveolen unserer Versuchstiere nur noch mäßig, was ebenfalls normal ist (Kawakami et al. 1984). Ausgehend von einem schon zu Beginn der Beobachtungen erhöhten Cm verläuft die Zunahme der Alveolargröße also vermutlich relativ artgerecht. Ungewöhnlich ist also, dass die Mean Chord Length der weiblichen SP-D^{-/-} Mäuse ab dem Alter von drei Monaten leicht über der der Männchen lag.

Durch die größere Menge kleinerer Alveolen erreichen Weibchen normalerweise auch eine höhere Oberflächendichte als Männchen. Diese lag zu Beginn unserer Untersuchungen, also während die Alveolen der Weibchen tatsächlich kleiner waren, unsignifikant über der Oberflächendichte S_V der Männchen. Mit steigender Alveolargröße der Weibchen passte sie sich jedoch der S_V der Männchen in etwa an. Bei beiden Geschlechtern nahm die Oberflächendichte mit dem Alter ab (bei den Weibchen signifikant, bei den Männchen nur geringfügig).

Obwohl S_V abnahm, wuchs die absolute Gasaustauschoberfläche S beider Geschlechter. Im, unter gleichen Fixationsbedingungen erzielten, Vergleich mit 3 Monate alten C57/BL6 Wildtyp Mäusen ($1001 \pm 38 \text{ cm}^2$) (Ochs et al. 2004) betrug die Oberfläche unserer Weibchen trotz ähnlicher Lungenvolumina nur $504 \pm 32,3 \text{ cm}^2$, die der Männchen $521 \pm 56,8 \text{ cm}^3$. Es wird deutlich, dass die Gasaustauschoberfläche unserer SP-D^{-/-} Mäuse verglichen mit gesunden Tieren deutlich erniedrigt ist. In der Arbeit von Ochs und Mitarbeitern lag auch die S der SP-D^{-/-} Mäuse mit $813 \pm 93 \text{ cm}^2$ deutlich über der von gemessenen S . Der Effekt des SP-D knockouts zeigt sich auf dieser Ebene in unseren Ergebnissen somit eventuell deutlicher, als zuvor vermutet.

Wie bereits erwähnt hatten die Weibchen meist ein signifikant höheres massenspezifisches Lungenvolumen als die Männchen. Aus einem höheren MsV und kleineren Gasaustauscheinheiten ergibt sich als physiologische Konsequenz eine ebenfalls höhere massenspezifische Oberfläche MsS (cm^2/g). Zwar bestätigte sich unsere Vermutung, dass die Weibchen kleinere Gasaustauscheinheiten besitzen müssten, nicht. Trotzdem lag die MsS der Weibchen in allen Altersgruppen zumindest leicht über den Werten der Männchen, was geschlechtsspezifisch also normal ist. Im Alter von 28 Tagen lag die MsS der Weibchen lediglich 18%, im Alter von 12 Monaten bereits signifikante 48% über der MsS der Männchen ($18,2 \pm 3,61 \text{ cm}^2/\text{g}$ (w) zu $12,3 \pm 1,28 \text{ cm}^2/\text{g}$ (m)).

Schlussfolgerung

Die Vergrößerung der Alveolen und die abnehmende alveoläre Oberfläche im Vergleich zur gesunden Lunge sind Anzeichen für eine emphysemähnliche Morphologie (Ochs et al. 2004). Allgemein bekannt ist, dass die alveoläre Oberflächendichte mit fortschreitender Parenchymdestruktion abnimmt und die Alveolarweite, hier repräsentiert durch C_m , ansteigt (Vlahovic et al. 1999). Unsere Beobachtung der Gasaustauschflächen von SP-D^{-/-} Mäusen zeigen chronisch vergrößerte Alveolen, ein leicht ansteigendes MV und eine abnehmende alveoläre Oberflächendichte bei jedoch ansteigender absoluter Gasaustauschoberfläche. Diese Veränderungen zeigen sich bei den Weibchen deutlicher als bei den Männchen. Der Einfluss des SP-D Mangels scheint bei den Weibchen gravierender zu sein, als bei den Männchen, da ihre C_m im Verhältnis zu den Männchen stärker erhöht ist und ihre S_v im größerem Maße sinkt. Der geschlechtliche Unterschied im MsV wird mit dem Alter immer deutlicher. Wenn man bedenkt, dass Massaro und Mitarbeiter bei Wildtyp Mäusen feststellten, dass das MsV der Weibchen ca. 28% über der der Männchen liegt, während das von uns ermittelte MsV der Weibchen bis zu 65% über der der Männchen lag, lässt sich erklären, warum sich die Alveolargröße nicht auf die MsS der Weibchen auswirkt (Massaro und Massaro 2004).

Möglicherweise wirkt sich somit das Fehlen von SP-D schon auf die embryonale Lungenentwicklung der Weibchen aus und führt zu kompensatorisch erhöhtem Lungenwachstum. Die Alveolarisierung der Weibchen könnte außerdem deutlicher beeinträchtigt sein, so dass die Alveolen sich stärker vergrößern als bei den Männchen. Die Tatsache, dass das MsV der Weibchen jedoch vor allem mit fortschreitendem Alter immer markanter zunimmt, legt allerdings auch die Überlegung nahe, ob sie eventuell tendenziell mehr zur Hyperinflation der Lunge im Zuge von progredienter Emphysementwicklung neigen.

5.2.2.2 Veränderungen der Kompartimente

Zur Beurteilung der Veränderung der einzelnen Gewebeanteile betrachten wir die Volumendichten, absoluten Volumina und massenspezifischen Volumina von Parenchym, Nicht-Parenchym, Luft, Alveolarsepten, Makrophagen und Kapillarlumen. Wir erhofften uns Rückschlüsse darauf, wie sich die einzelnen Gewebeanteile, abgesehen von physiologischen Alterungsprozessen wie der Zunahme interalveolärer Poren, sinkendem Anteil von Alveolarsepten und einer milden Hyperinflation der Lunge mit Luft (Pinkerton und Green 2004), verändern. Die Hinweise auf emphysemähnliche Veränderungen, welche sich in der Auswertung der Gasaustauschflächen ergaben, waren auf der Ebene der Volumendichten nicht zu erkennen. Ochs und Mitarbeiter haben 2004 allerdings gezeigt, dass sich die emphysematösen Veränderungen in den Lungen von SP-D^{-/-} Mäusen auf der Volumendichtenebene mitunter nicht darstellen lassen.

Es zeigte sich, dass der Parenchymanteil der Weibchen insgesamt leicht über dem der Männchen lag und der Nicht-Parenchymanteil entsprechend geringer ausfiel (Par w/m: $89,4 \pm 1,85$ % / $88,2 \pm 1,76$ %, NPar $10,1 \pm 1,70$ / $11,1 \pm 1,51$ %). Mit fortschreitendem Alter sowie zwischen den Vergleichsgruppen gleichaltriger Tieren ergaben sich keinerlei wesentliche Unterschiede. In Bezug auf den parenchymalen Luftanteil und das septale Gewebe ergaben sich in keiner der Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede, wenngleich der Anteil an Alveolarsepten im Verlauf bei beiden Geschlechtern minimal abfiel. Eine altersbedingt normale Zunahme des septalen Gewebes ließ sich demnach nicht feststellen. Die Veränderungen der absoluten sowie massenspezifischen Volumina von Parenchym und Nicht-Parenchym, Luft und Alveolarsepten beruhen auf Körper- und Organwachstum, nicht jedoch auf Unterschieden in der anteiligen Zusammensetzung der Lunge. Bis auf die Makrophagen und das Kapillarlumen sind die Volumendichten aller Tiere nahezu identisch. Das prozentuale Kapillarlumen nahm bei beiden Geschlechtern zu. Der Anstieg war bei den Männchen, deren Kapillarlumendichte auf das 15fache anstieg ($0,03 \pm 0,05$ % zu $0,47 \pm 0,19$ %), wesentlich deutlicher als bei den Weibchen, deren

Kapillarlumendichte auf das 5fache anstieg ($0,07 \pm 0,14$ % zu $0,38 \pm 0,16$ %). Bis zum Alter von 6 Monaten lag die Volumendichte des Kapillarlumens der Weibchen allerdings leicht über dem der Männchen.

Eines der klassischen Kennzeichen des pulmonalen Emphysems ist die Destruktion von Alveolarsepten. Analog zum progredienten Verlauf des Emphysems nehmen die alveoläre Oberflächendichte und kapilläre Oberfläche ab. Gleichzeitig nimmt die Dicke der Alveolarsepten (i.e. die Volumen/Oberflächenrelation) zu, was den pulmonalen Gasaustausch zusätzlich behindert (Vlahovic et al. 1999). Bei den von uns untersuchten Tieren blieb Vv(AS) nahezu unverändert, während Vv(KL) im Verlauf sogar zunahm. Es konnte also weder ein absinkender Anteil an septalem Gewebe nachgewiesen werden, noch sank die Volumendichte des Kapillarlumens. Die Anzeichen emphysemähnlicher Veränderungen, die sich auf der Ebene der Gasaustauschflächen zeigten, werden somit durch diese strukturellen Parameter nicht widerspiegelt. Die große Standardabweichung der Kapillarlumendichte macht eine eindeutige Interpretation jedoch schwierig.

Wie bereits erwähnt gab es auf der Ebene der Volumendichten keinerlei Anhalt für die Entwicklung einer emphysemähnlichen Pathologie. Eine steigende Alveolarseptendicke V/S dient als Indikator für fibrotische Umwandlungen. Wenn man die V/S unserer SP-D^{-/-} Mäuse betrachtet, so fällt auf, dass sie mit fortschreitendem Alter nicht zunimmt und sich auch sonst in keiner der Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede zeigten. Im Vergleich mit vorangegangenen Studien, in denen die V/S von 3 Monate alten C57/BL6 Wildtyp Mäusen lediglich um $2,3\mu\text{m}$ liegt (Ochs et al. 2004), ist sie jedoch mit $4,42\mu\text{m}$ bis hin zu $5,51\mu\text{m}$ deutlich erhöht.

Bislang hat sich in mehreren Studien gezeigt, dass Surfactant Protein-D die Makrophagenfunktion modulieren kann und ein SP-D Mangel die Anzahl und Größe der Makrophagen in der Lunge erhöht (Takeda et al. 2003; Ochs et al. 2004). Durch Auswertung des Makrophagenanteils und die Beobachtung

dessen, ob er im Versuchsverlauf zunimmt, kann man Rückschlüsse darauf ziehen, inwiefern eine Zunahme mit Veränderungen der anderen Parameter assoziiert ist und ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen gibt. Lediglich bei den Männchen nahm der Anteil der Makrophagen am Parenchym mit dem Alter leicht zu.

Die Betrachtung der Gasaustauschfläche der Mäuse zeigte eine generelle, jedoch nicht auffallend progrediente Vergrößerung der Alveolen, speziell bei den Weibchen, und sinkendes S_v . Logisch wäre zunächst die Schlussfolgerung, dass der gesteigerte Makrophagenanteil der 12 Monate alten Männchen die parenchymdestruktiven Prozesse emphysematöser Pathologie fördern könnte. Lungenparenchym reagiert auf eine anhaltende Schädigung mit gesteigerter Makrophagenaktivierung. Diese sezernieren vermehrt proinflammatorische Substanzen, was die Extravasation von weiteren Immunzellen und ein Ungleichgewicht im Proteasen - / Antiproteasenhaushalt zur Folge hat. Als Resultat kommt es zur Proteolyse der Epithelzellen und zur Destruktion elastischer Fasern (Vogelmeier et al. 2006; Koczulla und Vogelmeier 2008). SP-D beeinflusst die Emphysementstehung, indem es sowohl die Zeichen chronischer Entzündung reduziert, als auch die Entstehung von toxischen Metaboliten und den Proteasen - / Antiproteasenhaushalt reguliert (Stahlman et al. 2002). Unsere Männchen sollten demnach im Alter etwas stärker zur Emphysementwicklung neigen, als die Weibchen. Die Auswertung von Mean Chord Length und Oberflächendichte lässt allerdings vermuten, dass die Wirkung des SP-D knockouts auf die Lungen der Weibchen ausgeprägter ist. Eventuell möglich wäre diesbezüglich, dass der Parenchymschädigung bei beiden Geschlechtern unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, worauf zum Beispiel die unterschiedlichen Makrophagenanteile hindeuten könnten. Es hat sich ebenfalls gezeigt, dass SP-D die Apoptoserate von Makrophagen senkt (Clark et al. 2002). Angenommen, dass die Weibchen aufgrund erhöhter Apoptoseraten eine etwas geringere Volumendichte an Makrophagen aufweisen, oder die Makrophagen der Männchen zwar in ihrem Volumen, nicht jedoch zahlenmäßig

vermehrt sind, so ist dies jedoch in unserer Art der Auswertung nicht zu differenzieren.

Mühlfeld und Mitarbeiter fanden Hinweise darauf, dass die emphysemähnlichen Prozesse bei SP-D knockout Mäusen von den Alveolarmakrophagen möglicherweise doch unabhängig sind (Mühlfeld et al, unveröffentlichte Daten).

Die emphysematösen Veränderungen des Lungengewebes, die sich anhand unserer Untersuchungen auf der Ebene der Gasaustauschflächen darstellen ließen, scheinen sich nicht messbar auf die Gewebeanteile auszuwirken.

Schlussfolgerung

In der klinischen Forschung hat sich wiederholt gezeigt, dass die weiblichen Atemwege offensichtlich empfindlicher auf endo- und exogene Reize reagieren, als männliche. Weibliche Mäuse bildeten nach Provokation mit dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Naphthalen, einem Hauptbestandteil von Zigarettenrauch, in vorhergehenden Studien deutlich mehr karzinogene Metabolite als die männlichen Tiere (Han et al. 2005). Aus diesen Gründen war unsere Hypothese, dass emphysemähnliche Veränderungen bei den Weibchen früher und deutlicher ausgeprägt sein müssten. Zwar haben sich die Veränderungen insgesamt weniger deutlich gezeigt als angenommen, jedoch scheint es so, dass die Weibchen in der Tat deutlicher und früher auf den SP-D Mangel reagieren, als die Männchen. Dies wird vor allem in der Vergrößerung der Alveolarweiten (C_m) und der Abnahme der Alveolaroberflächendichte (S_v) deutlich.

5.3 Limitierung der Auswertungen

Die Veränderungen des Lungengewebes stellten sich auf lichtmikroskopischer Ebene äußerst heterogen dar. Einige Regionen schienen relativ normal, während andere deutliche Veränderungen zeigten. Mitunter waren auf einem Präparat in verschiedenen Arealen deutliche Unterschiede bezüglich der alveolären Größe, der Dicke der Septen oder etwa der Menge an Makrophagen zu beobachten. Auch zwischen den einzelnen Tieren einer gleichgeschlechtlichen Altersgruppe zeigten sich mitunter deutliche Unterschiede, was die manchmal großen Standardabweichungen erklärt. Dies macht eine einheitliche Interpretation der Ergebnisse teilweise schwierig. Anhand unserer Untersuchungsmethoden war es nicht möglich, zwischen einer größen- und einer zahlenmäßigen Zunahme der Makrophagen zu unterscheiden, was die Interpretation der erhobenen Makrophagenwerte erschwert. Da weder Referenzwerte für die Volumendichte der Makrophagen bei Wildtyp Mäusen, noch bei SP-D knockout Mäusen zur Verfügung standen, war es ebenfalls schwer zu beurteilen, ob es sich um eine Vermehrung der Makrophagen bei den Männchen oder eine Abnahme bei den Weibchen handelt. Es wäre hier eventuell sinnvoll gewesen, eine Kontrollgruppe mit den gleichen Messmethoden zu untersuchen, oder an unseren Tieren exakt dieselben Parameter zu untersuchen, wie in vorherigen Studien mit SP-D^{-/-} Mäusen, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können. Bei der Betrachtung der Kapillarlumina wird deutlich, dass die Werte für diesen Parameter so klein sind und es pro Lunge so wenige Zählereignisse gab, dass nur geringfügige Abweichungen den letztendlichen Wert stark veränderten. Bei den gewählten geringen Vergrößerungen war es mitunter schwierig, das Kapillarlumen als solches zu identifizieren, so dass es möglicherweise sein kann, dass nur einige wenige übersehene Kapillaren die berechneten Werte für Kapillarlumen verfälschen. Dies könnte erklären, warum hier keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden konnten.

5.4 Klinische Relevanz der Arbeit

Der pulmonale Surfactant und seine Proteine haben vielfältige Funktionen in der Regulation der alveolären Oberflächenspannung und der Immunabwehr. Speziell SP-D kommt hierbei eine Schlüsselposition in der Vermittlung von Erregerabwehr, Regulation des Immunsystems, Infektiosität von Pathogenen, Entzündung und allergischen Reaktionen zu (Kingma und Whitsett 2006; Kishore et al. 2006; Takahashi et al. 2006).

Die molekularen Mechanismen der chronischen Atemwegserkrankungen sind noch immer nicht vollständig geklärt, jedoch hat sich gezeigt, dass SP-D in der Pathogenese des Emphysems, bzw. der COPD und des Asthma Bronchiale eine Rolle spielen kann. SP-D greift in den Entstehungsweg des Emphysems ein, indem es sowohl die chronische Entzündung reduziert, als auch Einfluss auf die Entstehung von oxidativem Stress und den Proteasen- / Antiproteasenhaushalt hat (Stahlman et al. 2002). Die in verschiedenen Studien mit SP-D knockout Mäusen bestätigten pathologischen Veränderungen der Lunge wie makrophagenvermittelte, chronische Entzündung, sowie Hypertrophie und Hyperplasie der PN II, verminderte und vergrößerte Alveolen und verringerte Alveolaroberfläche entsprechen in etwa denen der COPD. Lipidbeladene, vergrößerte Makrophagen finden sich ebenfalls bei COPD und in frühen Stadien artherosclerotischer Läsionen.

COPD galt lange als Krankheitsbild, von dem hauptsächlich Männer betroffen waren, die im Vergleich zu Frauen einen höheren Zigarettenkonsum hatten. Rauchen ist bekanntlich eine der Hauptursachen für die Entstehung von COPD und 90% aller Patienten mit chronischer Bronchitis sind Raucher oder Exraucher (Renz-Polster et al. 2004). Bemerkenswerterweise ist schon in der BAL von gesunden Rauchern der Gehalt an SP-D vermindert (Hirama et al. 2007).

In den letzten Jahrzehnten stieg mit der steigenden Zahl der Raucherinnen auch die Zahl der von Lungenerkrankungen betroffenen Frauen. Man weiß inzwischen, dass Frauen, obwohl sie weniger geraucht haben als Männer, häufiger an „severe early-onset“ COPD erkranken und schneller an den Folgen der Krankheit sterben. Bis zu 70% der aller early-onset COPD Patienten und 85% derer, die nie geraucht haben, sind Frauen (Silverman et al. 2000; Massaro und Massaro 2004). In den letzten Jahren hat sich außerdem in mehreren Studien gezeigt, dass die Serum SP-D Level durch das Geschlecht beeinflusst werden und bereits bei gesunden Frauen im Vergleich zu Männern erniedrigt sind (Heidinger et al. 2005; Sorensen et al. 2006). Die Vermutung, dass unterschiedliche SP-D Serum Level die Entstehung von Lungenerkrankungen wie dem Emphysem beeinflussen, liegt also nahe. Es hat sich weiterhin gezeigt, dass Frauen nicht nur früher an COPD, sondern auch an Lungenkrebs, besonders dem Adenokarzinom, erkranken als Männer und mehr potenziell karzinogene Metabolite aus exogenen Noxen wie Zigarettenrauch oder Dieselabgasen bilden (Stelck et al. 2005). Es scheint klar, dass das Geschlecht einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese vieler Krankheiten hat, deren zugrunde liegende Mechanismen auch heute noch nicht in allen Einzelheiten geklärt sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines Mangels von SP-D auf den weiblichen und männlichen Organismus genauer zu beleuchten. Unsere Hypothese war, schlussfolgernd aus den bisher vorhandenen Arbeiten zu geschlechtlichen Unterschieden bei der Entstehung von Lungenerkrankungen, dass unsere weiblichen Versuchstiere deutlicher und früher auf den SP-D knockout reagieren, als die Männchen. Die dargestellten Ergebnisse können auf der Suche nach den Ursachen für Unterschiede bei der Entwicklung emphysemähnlicher Prozesse zwischen den Geschlechtern und der Erforschung entsprechender Therapiegrundlagen helfen.

6 Zusammenfassung

Die Aufgaben des pulmonalen Surfactant beinhalten neben der Regulation der alveolären Oberflächenspannung auch die Interaktion mit der angeborenen sowie adaptiven Immunabwehr. Surfactant Protein-D gehört zur Familie der Ca^{2+} -abhängigen Lektine, einer Gruppe von Proteinen, die virale und bakterielle Pathogene erkennen, über spezielle Rezeptoren mit Effektorzellen des Immunsystems interagieren und so zum Infektionsschutz der Lunge beitragen können.

Seit den ersten Berichten über die immunologische Bedeutung von Surfactant Protein-D in den 1990er Jahren sind seine immunmodulatorischen Eigenschaften und die Rolle, die Alterationen für die Entstehung chronischer Atemwegserkrankungen spielen könnten, immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. So werden SP-D Defizite beim Menschen unter anderem bei der COPD, bei cystischer Fibrose und ARDS beobachtet. Es hat sich darüber hinaus gezeigt, dass die parenchymdestruktiven Veränderungen in den Lungen SP-D defizienter Mäuse der Pathologie des Emphysems ähnlich sind. Das Geschlecht scheint ebenfalls ein, für Anfälligkeit und Progredienz emphysematöser und karzinogener Lungenerkrankungen determinierender Faktor zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es, das postnatale Lungenwachstum Surfactant Protein-D defizienter Mäuse auf geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Entwicklung emphysemartiger Pathologie zu untersuchen.

Die Lungen von insgesamt 45 SP-D^{-/-} Mäusen des Stammes C57/BL6, jeweils Männchen und Weibchen, wurden zu diesem Zweck im Alter von 28 Tagen, 3 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten mit Design-basierten stereologischen Methoden untersucht, welche es ermöglichen, Veränderungen für emphysematöse Prozesse relevanter Lungenstrukturen zu quantifizieren.

So konnten wir beurteilen ob, und wenn ja inwiefern, sich diese bei Männchen und Weibchen unterscheiden und in welcher Weise der Faktor Alter hierbei eine Rolle spielen könnte.

Unsere Beobachtung der Gasaustauschflächen von SP-D^{-/-} Mäusen zeigen vor allem Veränderungen zweier Indikatoren für emphysematöse Prozesse: chronisch vergrößerte Alveolen und abnehmende alveoläre Oberflächendichte. Diese Veränderungen waren bei den Weibchen wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei den Männchen, weswegen wir unsere Hypothese, dass die weiblichen Mäuse empfindlicher auf einen Mangel an SP-D reagieren als ihre männlichen Artgenossen, bestätigt sehen. Die Auswertung der Alveolarseptendicke gibt Anlass zu der Annahme, dass fibrotische Umwandlungen, jedoch unabhängig von Alter oder Geschlecht, ebenfalls statt finden.

Auf der Ebene der Volumendichten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die emphysematösen Veränderungen des Lungengewebes, die sich anhand der Gasaustauschflächen darstellen ließen, scheinen sich demnach nicht messbar auf die Gewebeanteile auszuwirken. Die Quantifizierung der Alveolarmakrophagen bekräftigt die durch eine andere Studie beschriebene Vermutung, dass die emphysemähnlichen Prozesse in den Lungen SP-D defizienter Mäuse unabhängig von Makrophagenaktivierung sein könnten. Weiterhin unterstützt die Beobachtung der Volumendichten Erkenntnisse vorangegangener Arbeiten, dass sich parenchymdestruktive Prozesse im Zusammenhang mit SP-D Mangel eventuell nicht auf dieser Ebene darstellen lassen. Weiterführende Studien könnten zur detaillierteren Klärung dieser Aspekte beitragen.

7 Literaturverzeichnis

- Atochina, E. N., A. J. Gow, J. M. Beck, A. Haczku, A. Inch, H. Kadire, Y. Tomer, C. Davis, A. M. Preston, F. Poulain, S. Hawgood und M. F. Beers (2004). "Delayed clearance of pneumocystis carinii infection, increased inflammation, and altered nitric oxide metabolism in lungs of surfactant protein-D knockout mice." J Infect Dis **189**(8): 1528-39.
- Barnes, P. J., S. D. Shapiro und R. A. Pauwels (2003). "Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms." Eur Respir J **22**(4): 672-88.
- Botas, C., F. Poulain, J. Akiyama, C. Brown, L. Allen, J. Goerke, J. Clements, E. Carlson, A. M. Gillespie, C. Epstein und S. Hawgood (1998). "Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11869-74.
- Chiba, H., S. Piboonpocanun, H. Mitsuzawa, K. Kuroshima, R. C. Murphy und D. R. Voelker (2006). "Pulmonary surfactant proteins and lipids as modulators of inflammation and innate immunity." Respirology **11 Suppl**: S2-6.
- Clark, H., N. Palaniyar, P. Strong, J. Edmondson, S. Hawgood und K. B. Reid (2002). "Surfactant protein D reduces alveolar macrophage apoptosis in vivo." J Immunol **169**(6): 2892-9.
- Clark, H. und K. Reid (2003). "The potential of recombinant surfactant protein D therapy to reduce inflammation in neonatal chronic lung disease, cystic fibrosis, and emphysema." Arch Dis Child **88**(11): 981-4.
- Cook, M. J. (1976). "The anatomy of the laboratory mouse." Academic Press, London.
- Crouch, E. C. (1998). "Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D)." Biochim Biophys Acta **1408**(2-3): 278-89.
- Crouch, E. C. (2000). "Surfactant protein-D and pulmonary host defense." Respir Res **1**(2): 93-108.

- Cruz-Orive, L. M. und E. R. Weibel (1981). "Sampling designs for stereology." J Microsc **122**(Pt 3): 235-57.
- Fehrenbach, H. (2000). "Die Rolle des Pneumozyten Typ II als Wächter des Alveolus: Funktionsmorphologische Aspekte." Biol. Habilitationsschrift, Dresden.
- Fehrenbach, H. (2001). "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." Respir Res **2**(1): 33-46.
- Fehrenbach, H. und M. Ochs (1998). "Studying Lung Ultrastructure." In Methods in Pulmonary Research, Uhlig & Taylor; Birkhäuser, Basel: 429-54.
- Glasser, S. W. und L. M. Noguee (2006). "Genetically engineered mice in understanding the basis of neonatal lung disease." Semin Perinatol **30**(6): 341-9.
- Griffiths, G. (1993). "Fine Structure Immunocytochemistry." Springer, Berlin
- Guerassimov, A., Y. Hoshino, Y. Takubo, A. Turcotte, M. Yamamoto, H. Ghezzi, A. Triantafillopoulos, K. Whittaker, J. R. Hoidal und M. G. Cosio (2004). "The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent." Am J Respir Crit Care Med **170**(9): 974-80.
- Haczku, A., G. Vass und S. Kierstein (2004). "Surfactant protein D and asthma." Clin Exp Allergy **34**(12): 1815-8.
- Han, W., B. T. Pentecost, R. L. Pietropaolo, M. J. Fasco und S. D. Spivack (2005). "Estrogen receptor alpha increases basal and cigarette smoke extract-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1, but not GSTP1, in normal human bronchial epithelial cells." Mol Carcinog **44**(3): 202-11.
- Harding, R., K. E. Pinkerton, C. G. Plopper et al (2004). "The Lung. Development, Aging and the Environment " Elsevier Academic Press, London.
- Harms, C. (2006). "Does gender affect pulmonary function and exercise capacity?" Respir Physiol Neurobiol **151**: 7.
- Hartl, D. und M. Giese (2006). "Surfactant protein D in human lung diseases." Eur J Clin Invest **36**(6): 423-35.

- Hartshorn, K. L., M. R. White, T. Tecle, I. Tornøe, G. L. Sørensen, E. C. Crouch und U. Holmskov (2007). "Reduced influenza viral neutralizing activity of natural human trimers of surfactant protein D." Respir Res **8**: 9.
- Hawgood, S., M. Ochs, A. Jung, J. Akiyama, L. Allen, C. Brown, J. Edmondson, S. Levitt, E. Carlson, A. M. Gillespie, A. Villar, C. J. Epstein und F. R. Poulain (2002). "Sequential targeted deficiency of SP-A and -D leads to progressive alveolar lipoproteinosis and emphysema." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(5): L1002-10.
- Heidinger, K., I. R. König, A. Bohnert, A. Kleinsteinber, A. Hilgendorff, L. Gortner, A. Ziegler, T. Chakraborty und G. Bein (2005). "Polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene: strong evidence that serum levels of surfactant protein-D (SP-D) are genetically influenced." Immunogenetics **57**(1-2): 1-7.
- Herold, G. und Mitarbeiter (2007). "Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung." G. Herold, Köln.
- Hirama, N., Y. Shibata, K. Otake, J. Machiya, T. Wada, S. Inoue, S. Abe, N. Takabatake, M. Sata und I. Kubota (2007). "Increased surfactant protein-D and foamy macrophages in smoking-induced mouse emphysema." Respirology **12**(2): 191-201.
- Hof, H., R. Dörries und G. Geginat (2004). "Medizinische Mikrobiologie." Thieme, Stuttgart.
- Hohlfeld, J. M., V. J. Erpenbeck und N. Krug (2002). "Surfactant proteins SP-A and SP-D as modulators of the allergic inflammation in asthma." Pathobiology **70**(5): 287-92.
- Howard, C. V. und M. Reed (1998). "Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy." Springer Verlag New York, Inc.
- Ikegami, M. (2006). "Surfactant catabolism." Respirology **11 Suppl**: S24-7.
- Inuwa, I. M. und A. S. El Mardi (2005). "Correlation between volume fraction and volume-weighted mean volume, and between total number and total mass of islets in post-weaning and young Wistar rats." J Anat **206**(2): 185-92.

- Irvin, C. G. und J. H. Bates (2003). "Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size." Respir Res **4**: 4.
- Jung, A., L. Allen, J. R. Nyengaard, H. J. Gundersen, J. Richter, S. Hawgood und M. Ochs (2005). "Design-based stereological analysis of the lung parenchymal architecture and alveolar type II cells in surfactant protein A and D double deficient mice." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **286**(2): 885-90.
- Kawakami, M., J. L. Paul und W. M. Thurlbeck (1984). "The effect of age on lung structure in male BALB/cNNia inbred mice." Am J Anat **170**(1): 1-21.
- Kingma, P. S. und J. A. Whitsett (2006). "In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D." Curr Opin Pharmacol **6**(3): 277-83.
- Kishore, U., A. L. Bernal, M. F. Kamran, S. Saxena, M. Singh, P. U. Sarma, T. Madan und T. Chakraborty (2005). "Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **53**(5): 399-417.
- Kishore, U., T. J. Greenhough, P. Waters, A. K. Shrive, R. Ghai, M. F. Kamran, A. L. Bernal, K. B. Reid, T. Madan und T. Chakraborty (2006). "Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors." Mol Immunol **43**(9): 1293-315.
- Koczulla, A. R. und C. Vogelmeier (2008). "[Chronic obstructive pulmonary disease: from pathogenesis to treatment]." Dtsch Med Wochenschr **133**(10): 471-5.
- Korfhagen, T. R., V. Sheftelyevich, M. S. Burhans, M. D. Bruno, G. F. Ross, S. E. Wert, M. T. Stahlman, A. H. Jobe, M. Ikegami, J. A. Whitsett und J. H. Fisher (1998). "Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo." J Biol Chem **273**(43): 28438-43.
- Kwak, I., S. Y. Tsai und F. J. DeMayo (2004). "Genetically engineered mouse models for lung cancer." Annu Rev Physiol **66**: 647-63.
- Lawson, P. R., V. C. Perkins, U. Holmskov und K. B. Reid (1999). "Genomic organization of the mouse gene for lung surfactant protein D." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(5): 953-63.

- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). "Stereological tools in biomedical research." An Acad Bras Cienc **75**(4): 469-86.
- Massaro, D. und G. D. Massaro (2004). "Estrogen regulates pulmonary alveolar formation, loss, and regeneration in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(6): L1154-9.
- Massaro, D. und G. D. Massaro (2006). "Toward therapeutic pulmonary alveolar regeneration in humans." Proc Am Thorac Soc **3**(8): 709-12.
- Massaro, G. D., J. P. Mortola und D. Massaro (1995). "Sexual dimorphism in the architecture of the lung's gas-exchange region." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1105-7.
- McCormack, F. X. (2006). "New concepts in collectin-mediated host defense at the air-liquid interface of the lung." Respirology **11 Suppl**: S7-10.
- Morris, D. G. und D. Sheppard (2006). "Pulmonary emphysema: when more is less." Physiology (Bethesda) **21**: 396-403.
- Motwani, M., R. A. White, N. Guo, L. L. Dowler, A. I. Tauber und K. N. Sastry (1995). "Mouse surfactant protein-D. cDNA cloning, characterization, and gene localization to chromosome 14." J Immunol **155**(12): 5671-7.
- Nyengaard, J. R. (1999). "Stereologic methods and their application in kidney research." J Am Soc Nephrol **10**(5): 1100-23.
- Obladen, M. (2005). "History of surfactant up to 1980." Biol Neonate **87**(4): 308-16.
- Ochs, M. (2006). "A brief update on lung stereology." J Microsc **222**(Pt 3): 188-200.
- Ochs, M., L. Knudsen, L. Allen, A. Stumbaugh, S. Levitt, J. R. Nyengaard und S. Hawgood (2004). "GM-CSF mediates alveolar epithelial type II cell changes, but not emphysema-like pathology, in SP-D-deficient mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(6): L1333-41.
- Osanai, K., C. Tsuchihara, R. Hatta, T. Oikawa, K. Tsuchihara, M. Iguchi, T. Seki, M. Takahashi, J. Huang und H. Toga (2006). "Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells." Respirology **11 Suppl**: S70-3.

- Palaniyar, N., H. Clark, J. Nadesalingam, M. J. Shih, S. Hawgood und K. B. Reid (2005). "Innate immune collectin surfactant protein D enhances the clearance of DNA by macrophages and minimizes anti-DNA antibody generation." J Immunol **174**(11): 7352-8.
- Pinkerton, K. E. und F. H. Y. Green (2004). "Normal Aging of the Lung." In Harding et al: The Lung: Development, Aging and the Environment. **CH 15**. Elsevier Academic Press, London.
- Renz-Polster, H., S. Krautzig und J. Braun (2004). "Basislehrbuch Innere Medizin." Urban & Fischer, München.
- Restrepo, C. I., Q. Dong, J. Savov, W. I. Mariencheck und J. R. Wright (1999). "Surfactant protein D stimulates phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **21**(5): 576-85.
- Rooney, S. A. (1998). "Lung surfactant: cellular and molecular processing." RG Landes Bioscience, Austin Texas.
- Sano, H. und Y. Kuroki (2005). "The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity." Mol Immunol **42**(3): 279-87.
- Scherle, W. (1970). "A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology." Mikroskopie **26**(1): 57-60.
- Silverman, E. K., S. T. Weiss, J. M. Drazen, H. A. Chapman, V. Carey, E. J. Campbell, P. Denish, R. A. Silverman, J. C. Celedon, J. J. Reilly, L. C. Ginns und F. E. Speizer (2000). "Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **162**(6): 2152-8.
- Sorensen, G. L., J. B. Hjelmberg, K. O. Kyvik, M. Fenger, A. Hoj, C. Bendixen, T. I. Sorensen und U. Holmskov (2006). "Genetic and environmental influences of surfactant protein D serum levels." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(5): L1010-7.
- Soutiere, S. E. und W. Mitzner (2006). "Comparison of postnatal lung growth and development between C3H/HeJ and C57BL/6J mice." J Appl Physiol **100**(5): 1577-83.

- Stahlman, M. T., M. E. Gray, W. M. Hull und J. A. Whitsett (2002). "Immunolocalization of surfactant protein-D (SP-D) in human fetal, newborn, and adult tissues." J Histochem Cytochem **50**(5): 651-60.
- Stelck, R. L., G. L. Baker, K. M. Sutherland und L. S. Van Winkle (2005). "Estrous cycle alters naphthalene metabolism in female mouse airways." Drug Metab Dispos **33**(11): 1597-602.
- Takahashi, H., H. Sano, H. Chiba und Y. Kuroki (2006). "Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases." Curr Pharm Des **12**(5): 589-598.
- Takeda, K., N. Miyahara, Y. H. Rha, C. Taube, E. S. Yang, A. Joetham, T. Kodama, A. M. Balhorn, A. Dakhama, C. Duez, A. J. Evans, D. R. Voelker und E. W. Gelfand (2003). "Surfactant Protein D Regulates Airway Function and Allergic Inflammation through Modulation of Macrophage Function." Am J Respir Crit Care Med **168**(7): 783-9.
- Van Winkle, L. S., A. D. Gunderson, J. A. Shimizu, G. L. Baker und C. D. Brown (2002). "Gender differences in naphthalene metabolism and naphthalene-induced acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(5): L1122-34.
- Vlahovic, G., M. L. Russell, R. R. Mercer und J. D. Crapo (1999). "Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema." Am J Respir Crit Care Med **160**(6): 2086-92.
- Vogelmeier, C., R. Koczulla, H. Fehrenbach und R. Bals (2006). "[Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease]." Internist (Berl) **47**(9): 885-6, 888-90, 892-4.
- Weibel, E. R., C. C. Hsia und M. Ochs (2007). "How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry." J Appl Physiol **102**(1): 459-67.
- Wert, S. E., M. Yoshida, A. M. LeVine, M. Ikegami, T. Jones, G. F. Ross, J. H. Fisher, T. R. Korfhagen und J. A. Whitsett (2000). "Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5972-7.

- Whitsett, J. A. (2005). "Surfactant proteins in innate host defense of the lung." Biol Neonate **88**(3): 175-80.
- Yoshida, M. und J. A. Whitsett (2006). "Alveolar macrophages and emphysema in surfactant protein-D-deficient mice." Respirology **11 Suppl**: S37-40.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AM	Alveolarmakrophage
ANOVA	Analysis of Variance
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AS	Alveolarseptum
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALT	bronchiolar associated lymphoid tissue
°C	Grad Celsius
CAST	Computer-Assisted Stereological Toolbox
cDNA	complementary DNA
CL	Kapillarlumen
cm	Zentimeter
Cm	Mean Chord Length = Weite der Gasaustauschräume
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
CRD	carbohydrate recognition domain
CTGF	connective tissue growth factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid Triphosphat
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ER	Östrogenrezeptor
g	Gramm
GA	Golgiappart
Gp-340	Glykoprotein-340
GRO- α	growth related oncogene- α
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunden
HCl	Salzsäure

HSV	Herpes Simplex Virus
IAV	Influenza A Virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
KL	Kapillarlumen
LK	Lamellenkörperchen
Lp	length per point
m	männlich
M	molar
MCP-1	macrophage chemotactic protein-1
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
MMP	Metalloproteinase
MsS	Massenspezifische alveoläre Oberfläche
MsV	Massenspezifisches Volumen
MV	volumen-gewichtetes mittleres Volumen
mOsm	milliOsmol
Na-CP	Natrium-Cacodylatpuffer
NaOH	Natronlauge
NF- κ B	nuclear factor κ B
NG	neutrophiler Granulozyt
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLung	Nicht-Lungengewebe
NPar	Nicht-Parenchym
O ₂	Sauerstoff
OT	Objektträger
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon
Par	Parenchym

PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PN I	Pneumozyt Typ I
PN II	Pneumozyt Typ II
PSI	Point Sampled Intercept
RER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
Rpm	revolutions per minute
RSV	respiratory syncytial virus
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reactive nitrogen species = reaktive Stickstoffmetabolite
ROS	reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffmetabolite
S	surface area = Gasaustauschoberfläche
SPF	specific pathogen free
StAbw	Standardabweichung
SURS	Systematic Uniform Random Sampling
Sv	alveoläre Oberflächendichte
TGF- β_1	transforming growth factor - β_1
TIMP-3	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF- α	Tumornekrosefaktor
TVP	Total Vertical Projections
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
VO ₂	Sauerstoffaufnahme
VS	Volumen/Oberflächenrelation der Alveolarsepten
Vv	Volumendichte
w	weiblich

8.2 Tierversuche

Für die im Rahmen dieses Promotionsvorhabens an der Philipps Universität Marburg durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen liegt eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vom 30. November 2004 vor (Aktenzeichen V54-19 c 20/15 c MR 20/11).

9 Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Heinz Fehrenbach und meinem Betreuer Dr. Ali Önder Yildirim für Ratschläge, Hilfe und Unterstützung bedanken. Ich hätte mir für meine Promotion keine bessere Betreuung wünschen können.

Ich bin darüber hinaus allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“ der Philipps Universität für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und eine wunderbare Zeit zu Dank verpflichtet. Besonders Tanja Rausch möchte ich für ihre unentbehrliche Arbeit danken.

Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Familie, Philipp, Irmgard und Günther, meinen Freunden, und allen anderen, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützt und aufgebaut haben, immer an mich glauben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sarah Kristina Liefländer
Geburtsdatum: 22.11.1983
Geburtsort: Wickede (Ruhr)
Eltern: Rudolf Liefländer
Elke Liefländer, geb. Zilles
Geschwister: Thomas Liefländer
Lucas Liefländer
Laura Liefländer



Schulausbildung:

1990 – 1994 Josefschule Menden
1994 – 2002 Walburgisgymnasium Menden
06/2002 Abitur (Note 1,7)

Studium:

10/2002 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps Universität Marburg

09/2004 Ärztliche Vorprüfung (Note 2,3)

2006 Beginn der Promotion bei Prof. Dr. Heinz Fehrenbach in der Klinik für Innere Medizin der Philipps Universität Marburg; die experimentellen Untersuchungen konnten im Frühjahr 2007 abgeschlossen werden.

09/2007 Beginn des Studiums „Master of Science in Molecular Neuroscience“ an der University of Bristol (UK)

06/2008 Abschluss “Postgraduate Diploma of Science in Molecular Neuroscience”

08/2008 Beginn des Praktischen Jahres an der Universität zu Lübeck