

Aus der Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Pneumologie

Direktor Prof. Dr. Claus Vogelmeier

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



## **Altersbedingte Veränderungen der Ultrastruktur der Alveolarsepten männlicher SP-D knockout Mäuse**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Judith Hörster aus Mönchengladbach

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
25.04.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. H. Fehrenbach

1.Korreferent: PD Dr. E. Heinmöller

## **Meiner Familie**

# 1. Inhaltsverzeichnis

---

	Seite
<b>1. Inhaltsverzeichnis</b>	4
<b>2. Einleitung</b>	7
2.1 Einführung in die Thematik und Zielsetzung	7
2.2 Aufbau und Funktion der Lunge	8
2.2.1 Die Ultrastruktur der humanen Lunge	8
2.2.2 Der Gasaustausch	12
2.3 Die Lunge der Maus	14
2.3.1 Unterschiede in der Anatomie der Lunge von Mensch und Maus	14
2.4 Altersbedingte Veränderungen der Struktur der Lunge	15
2.4.1 Entwicklung der Lunge	15
2.4.2 Die Postnatale Lungenentwicklung	15
2.4.3 Wachstum und Altern der Lunge	16
2.5 Die Bedeutung von Surfactant	17
2.5.1 Sekretion des Surfactant	18
2.5.2 Die Surfactantlipide	19
2.5.3 Die Surfactantproteine	19
2.5.3.1 Die Surfactantproteine B und C	20
2.5.3.2 Die Surfactantproteine A und D	20
2.5.3.2.1 Aufbau der Surfactantproteine A und D	21
2.5.3.3 Funktionen der Surfactantproteine A und D	22
2.5.3.3.1 Interaktion mit körperfremden Zellen	23
2.5.3.3.2 Interaktion mit den körpereigenen Zellen	24
2.5.4 Surfactant und Lungenemphysem	26
2.5.4.1 Definition und Morphologie des Lungenemphysems	26
2.5.4.2 Pathogenese des Lungenemphysems	27
2.6 Mäuse als Tiermodell in der Emphysemforschung	30
2.7 Zielsetzung	31
<b>3. Material und Methoden</b>	33
3.1. SP- D Knockout Mäuse	33
3.2 DNA-Purifikation und Polymerase Kettenreaktion	34
3.2.1 Material	34
3.2.2 DNA-Purifikation	35
	4

3.2.3 Polymerase Kettenreaktion	36
3.2.4 Gelelektrophorese	38
3.3. Materialgewinnung und Instillationsfixierung der Mäuselungen	38
3.3.1 Chemikalien und Ansätze der verwendeten Lösungen	38
3.3.2 Materialgewinnung und Instillierung der Mäuselungen	40
3.3.3 Volumenbestimmung und Einbettung	41
3.3.4 Probengewinnung	41
3.3.4.1 Aufarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie	42
3.4 Experimentelles Vorgehen	44
3.4.1 Transmissionselektronenmikroskopie	44
3.4.2 Versuchstiere	44
3.4.3 Stereologische Verfahren	45
3.4.3.1 Auswertungsschema	46
3.4.3.1.1 Untersuchte Parameter	46
3.4.3.1.2 Formeln	47
3.4.4 Elektronenmikroskopische Auswertung	47
3.4.5 Berechnung der Volumina der septalen Strukturen	48
3.4.6 Beispielbilder	49
3.4.7 Statistik und Darstellung der Ergebnisse	50
<b>4. Ergebnisse</b>	51
4.1 Körpergewicht und Lungenvolumina der Versuchsmäuse	51
4.2 Prozentuale Gewebeanteile der einzelnen Gewebekomponenten	52
4.2.1 Alveolarpithelzellen Typ I	53
4.2.2 Alveolarepithelzellen Typ II	54
4.2.3 Kapillarendothel	54
4.2.4 Restliche Matrix	55
4.2.5 Fibrozyten	56
4.2.6 Elastin	57
4.2.7 Kollagen	57
4.2.8 Kapillarlumen	58
4.2.9 Kollagen/Elastin	58
4.3 Absolute Volumina der einzelnen Gewebekomponenten	59
4.3.1 Alveolarpithelzellen Typ I	59
4.3.2 Alveolarepithelzellen Typ II	61

4.3.3 Kapillarendothel	64
4.3.4 Restliche Matrix	66
4.3.5 Fibrozyten	67
4.3.6 Kollagen	69
4.3.7 Elastin	71
4.4 Darstellungen aller Ergebnisse im Überblick	72
<b>5. Diskussion</b>	<b>76</b>
5.1 Methodenkritik	76
5.1.1 Präparatherstellung	76
5.1.2 Ultrastruktureller Untersuchungsansatz	77
5.1.3 Mäuse als Versuchstiere	78
5.2 Ultrastrukturelle Veränderungen bei Lungenemphysem und Alterungsprozessen im der Lunge im Überblick	80
5.2.1 Emphysem	80
5.2.2 Alterungsprozess	81
5.3 Ergebnisse der untersuchten Parameter in der Diskussion	82
5.3.1 Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II	82
5.3.2 Fibrozyten, Elastin, Kollagen	86
5.3.3 Kapillarendothelzellen	89
5.4 Klinisch relevante Aspekte	90
5.4.1 Möglichkeiten weiterer Untersuchungen	91
5.4.1.1 Morphologie	91
5.4.1.2 Makrophagen	92
5.4.1.3 SP-A	94
5.5 Zusammenfassung	96
5.5.1 Ergebnisse	97
5.5.2 Schlusswort	98
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>107</b>

## **2. Einleitung**

---

### **2.1 Einführung in die Thematik und Zielsetzung**

Pulmonales Surfactant und seine Proteine übernehmen vielfältige Funktionen. Neben der schon lange bekannten Regulation der alveolären Oberflächenspannung gibt es seit einigen Jahren die Erkenntnis, dass vor allem den Surfactant Proteinen A und D ( SP-A und SP-D) eine Schlüsselposition bei der Surfactant Homöostase und der Abwehr viraler und bakterieller Pathogene zukommt (Kingma et al 2006).

Des Weiteren konnten bisherige Studien der postnatalen Entwicklung bei SP-D defizienten Versuchstieren pathologische Veränderungen der pulmonalen Struktur feststellen, die eine Ähnlichkeit zu denen einiger Krankheitsbilder, die mit entzündlichen und parenchymdestruktiven Prozessen der Lunge einhergehen, aufwiesen. Diese nachgewiesenen pulmonalen Veränderungen sind insbesondere bei Krankheiten, wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, (chronic obstructiv Pulmonary Disease = COPD), cystischer Fibrose und dem akutem Atemwegsversagen (acute respiratory distress syndrom = ARDS) zu finden.

Außerdem zeigten andere Studien eine gestörte SP-D Homöostase bei chronischen Atemwegserkrankungen (Hirama et al 2007). So fanden sich zum Teil reduzierte SP-D Level in den Bronchien und Alveolen (Hartl, Griese 2006) bei Patienten mit COPD, cystischer Fibrose oder ARDS. Nach neusten Studien ist das SP-D möglicherweise an der Pathogenese der COPD beteiligt, so dass über die Option einer therapeutische Anwendung des SP-D nachzudenken ist.

Leider fehlen bisher noch weiterführende Studien, die die genauen Mechanismen seiner Funktion untersuchen, so dass eine derartige Behandlung der chronischen Atemwegserkrankungen bislang nicht möglich ist (Clark, Reid 2003, Kingma et al 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch die ultrastrukturelle Analyse der Alveolarsepten von SP-D knockout Mäusen deren Eignung als ein Tiermodell chronischer Lungenerkrankungen vor allem des Lungenemphysems zu klären. Zu diesem Zweck wurden die Lungen von 22 Versuchstieren, jeweils Männchen im Alter von 28 Tagen, 3, 6 und 12 Monaten, mit quantitativ-histologischen Verfahren

transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden die relativen und absoluten Anteile verschiedener Zellarten und des interstitiellen Gewebes an den Alveolarsepten ermittelt, so dass im Hinblick auf Veränderungen und Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen und innerhalb einer Altersgruppe ausgewertet werden konnte und diskutiert werden konnte, ob es Hinweise auf eine chronische Atemwegserkrankung geben könnte oder ob diese als Alterungsprozess zu werten sind.

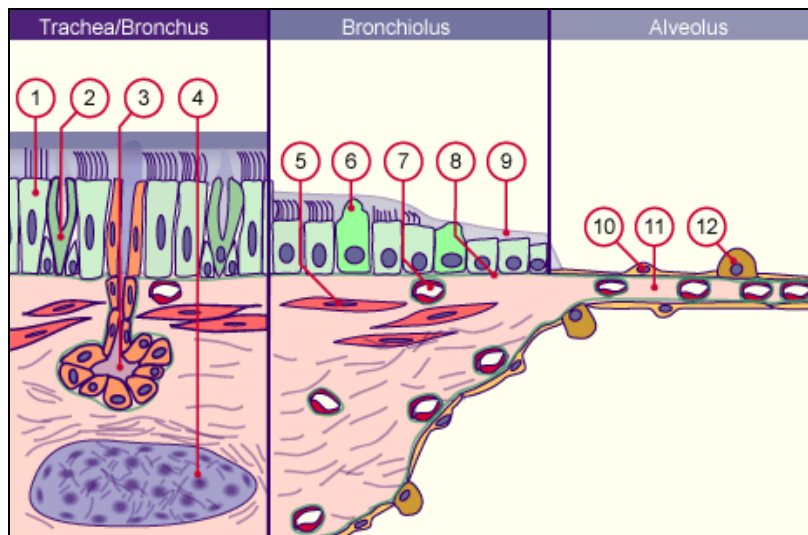
## **2.2 Aufbau und Funktion der Lunge**

Um ihre Grundfunktion, die Versorgung des Organismus mit sauerstoffreichem Blut, wahrnehmen zu können, findet in der Lunge ein Gasaustausch zwischen Blut und Luft statt. 80-90 % des totalen Lungenvolumens sind daran beteiligt. Die funktionell kleinste Einheit des Gasaustausches sind die Alveolen, hier geschieht der Austausch von Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>).

Um einen optimalen Gasaustausch zwischen Blut und Luft zu ermöglichen, muss die trennende Barriere möglichst dünn bei möglichst großer Oberfläche sein (Weibel ER 1984) und die Ventilation sollte so erfolgen, dass bei jedem Atemzug die gesamte am Gasaustausch teilnehmende Oberfläche gleichmäßig mit Frischluft versorgt wird (Duncker HR 1994). Diese Anforderungen bedingen den speziellen Aufbau der Lunge. 300 Millionen zusammenhängende, dem Gasaustausch dienende Alveolen und Lungenkapillaren bilden ein Netzwerk in dem Billionen Zellen eine stabile, gut durchblutete Luft-Gewebe Grenze bilden, mit einer Oberfläche, die 25-mal größer ist als die äußere Oberfläche des Körpers.. Die Lunge ist durch dieses Hauptprinzip der minimale Barrierendicke und deren maximale Ausdehnung. (Weibel 1984), beim Menschen etwa 120-140m<sup>2</sup>, optimal für den Gasaustausch geeignet.

### **2.2.1 Die Ultrastruktur der humanen Lunge**

Der Wandaufbau der oberen und unteren Luftwege verändert sich im Verlauf von proximal nach distal (Welsch et al.2010 ) wie in Abbildung 1 dargestellt ist. .



**Abbildung 1** Strukturelle Unterschiede des Epithels entlang des Atemwegstraktes

1: Flimmerepithel, 2: Becherzelle, 3: Drüse, 4: Knorpel, 5: glatte Muskulatur, 6: Clara Zelle, 7: Kapillaren, 8: Basalmembran, 9: Surfactant, 10: PN I, 11: Alveolarsepten, 12: PN II oder AE II

( Welsch, Lehrbuch Histologie 3.Auflage 2010)

Weiter distal im Atemwegstrakt folgen die Bronchioli respiratorii und die Ducti alveolares, die durch die vielen Alveolenmündungen kaum über eigene Wandabschnitte verfügen.

Durch immer feinere Aufzweigung des Atemwegstraktes bis zu den Alveolen, in denen der Gasaustausch stattfindet, wird die Gasaustauschoberfläche der Lunge auf ca. 120-150 m<sup>2</sup> vergrößert. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht die circa 1.000- bis 100.000fach vergrößerte Darstellung von Objekten. Mit diesen hohen Vergrößerungen sind die Alveolarsepten detailliert beurteilbar. Sie setzen sich aus verschiedenen Zelltypen und einem interstitiellen Raum zusammen. Die Alveolen der menschlichen Lunge sind zwischen 200 und 300µm große Bläschen. Sie sind durch die Septa interalveolaria voneinander getrennt, die aus kollagenen und elastischen Bindegewebsfasern, den Endothelzellen der Kapillaren, sowie Alveolarepithelzellen bestehen. Kleine Poren in den Alveolarsepten, sogenannte Kohnsche Poren mit etwa 10-15 µm Durchmesser ermöglichen eine direkte Kommunikation zwischen den Alveolen und erleichtern Zellen wie Makrophagen die Migration von Alveole zu Alveole (Pinkerton, Green 2004).

Das Epithel der Alveolen unterscheidet sich von dem der luftleitenden Wege. Zwei Zelltypen bilden das Alveolarepithel: Pneumozyten oder Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II, welche miteinander über Zell-Zell-Verbindungen (Cell junctions)

verbunden sind. Die Alveolarepithelzellen Typ I sind flache, 50-150µm große Zellen und werden auch als Deckzellen bezeichnet, da sie beinahe 95% der Alveolaroberfläche auskleiden. Diese Zellen bestehen zum großen Teil aus dünnen, flächig ausgedehnten zytoplasmatischen Ausläufern, welche kaum Organellen enthalten. Aufgrund ihrer geringen Stoffwechselaktivität, und um den Gasaustausch nicht zu behindern, enthalten diese Zellen kaum Organellen (Weibel ER 1984). Sie sind zur Mikropinozytose fähig und können sich nicht mehr teilen. Die Alveolarepithelzellen Typ I sind untereinander durch verschiedene Interzellularkontakte verbunden. Hervorzuheben sind dabei die Tight Junctions, die in Form mehrerer hintereinandergestellter Leisten vorliegen und so den Interzellularraum für diffundierende Moleküle abdichten können (Drenckhahn D.1994).

Damit ist ein Stofftransport ausschließlich durch den Intrazellularraum der Alveolarepithelzellen Typ I möglich. Obwohl Alveolarepithelzellen Typ I einen sehr geringen Gehalt an Organellen aufweisen, haben sie dennoch wichtige vor allem regulatorische Aufgaben, zum Beispiel bei Transportvorgängen, oder bei der Steuerung der Zellteilung (Williams MC. 2003). Die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen die Alveolarepithelzellen Typ I aufgrund ihrer Differenzierung jedoch nicht mehr. Epitheldefekte müssen daher durch eine andere Zellpopulation repariert werden, den Alveolarepithelzellen Typ II.

Die Alveolarepithelzellen Typ II bedecken mit ihrer variablen, meist jedoch kubischen Form ca. 5% der Alveolaroberfläche. Sie finden sich alleine, oder im Rahmen von krankheitsbedingten Proliferationsprozessen auch in Gruppen, und werden auch Nischenzellen genannt. Ihr Zytoplasma enthält zahlreiche Mitochondrien, ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum (RER) und einen umfangreichen Golgi-Apparat. Darüber hinaus verfügen sie über die charakteristischen Lammellenkörperchen (lammellar bodies), mit gespeichertem Surfactantmaterial gefüllte Sekretgranula. Aus diesem Grund wurden sie ursprünglich als granulozytäre Alveolarepithelzellen bezeichnet. Die Alveolarepithelzellen Typ II können sich bei Bedarf durch mitotische Teilung vermehren und zu Alveolarepithelzellen Typ I differenzieren (Welsch et al 2003, Schiebler et al 2003). Da die Lunge eine außerordentlich große Oberfläche mit Kontakt zur Umwelt besitzt, ist sie sehr vielen schädigenden Substanzen und Mikroorganismen ausgesetzt. Sie benötigt daher ein gut funktionierendes Abwehr- und Reparatursystem.

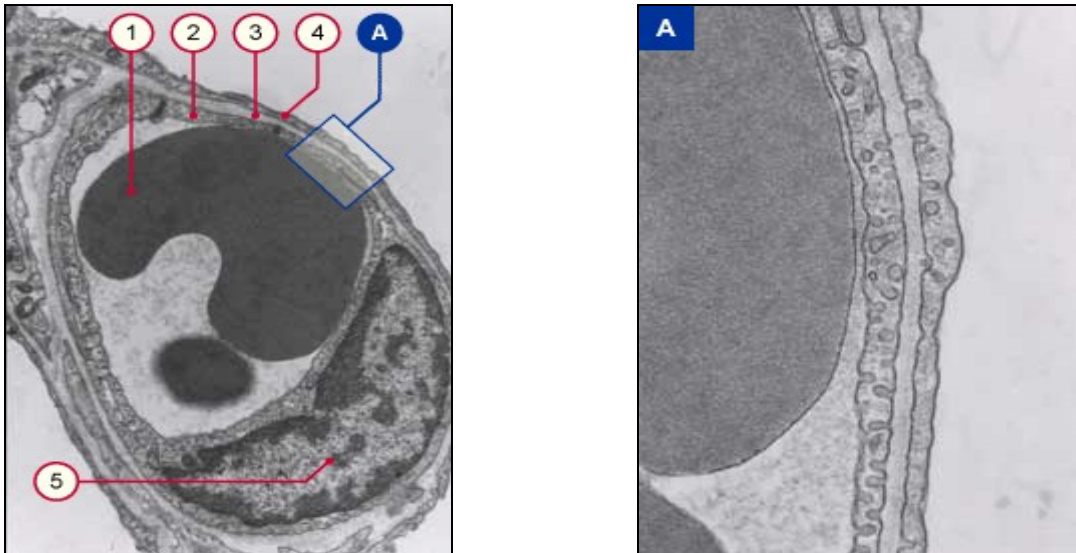
Die Wand der alveolären Kapillaren bildet ebenso wie das Oberflächenepithel einen Teil der Diffusionsbarriere für den Gasaustausch; aufgrund der daraus resultierenden Anforderungen sind die Endothelzellen ähnlich wie die Alveolarepithelzellen Typ I aufgebaut. Eine relativ flache Zytoplasmaschicht, die wenige Organellen enthält, breitet sich vom

Zellkern her aus. Untereinander sind die Endothelzellen ebenso wie die Alveolarepithelzellen durch Interzellularkontakte miteinander verbunden. Die Tight Junctions sind hier jedoch durchlässiger und erlauben einen relativ ungehinderten Austausch von Wasser und darin gelösten Substanzen zwischen Blutplasma und interzellulärer Flüssigkeit (Weibel ER 1984).

Zwischen Epithel und Endothel befindet sich der Bindegewebsraum der Alveolarsepten. Als Anpassung an die Anforderung, ein möglichst geringes Diffusionshindernis für den Gasaustausch darzustellen, ist er sehr schmal. Über die Hälfte der basalen Kontaktfläche zwischen Epithel und Endothel sind lediglich von einer einzigen Basallamina getrennt, die aus der Verschmelzung der Basallaminae der beiden Zellschichten entstanden ist (Weibel ER, Gil J 1977). Trotz seines geringen Volumens erfüllt der Bindegewebsraum wichtige Aufgaben. Mit Hilfe eines weit verzweigten extrazellulären Fasersystems wird die nötige mechanische Festigkeit bei gleichzeitig bestehender Flexibilität erreicht, um den ständig wechselnden Beanspruchungen standzuhalten, die während jedes Atemzuges entstehen.

Der interzelluläre Flüssigkeitsraum steht mit dem Lymphsystem in Verbindung (Weibel ER, Gil J 1977). Die Zellen des Bindegewebsraumes sind die Fibroblasten, welche die extrazellulären Fasern produzieren und mit ihren langen und zum Teil verzweigten Zytoplasmaausläufern in engem Kontakt zu ihnen stehen. Außerdem befinden sich hier migrationsfähige Zellen, wie z. B. Mastzellen, die nach Durchwanderung des Endothels aus den Kapillaren in den interstitiellen Raum gelangt sind. Die Grenze zwischen Blut und Luft ist somit sehr dünn und besteht nur noch aus:

Den Alveolarepithelzellen Typ I, den verschmolzenen Basalmembranen der Kapillarwand und des Epithels, den Endothelzellen, und dem Surfactant auf der Oberfläche der Alveolen (Schiebler et al 2003).



**Abbildung 2** Elektronenmikroskopische Darstellung der Alveolarsepten

1.Erythrozyt 2. Endothel 3. BM 4. Alveolarepithel 5. Nukleus einer Endothelzelle  
(Welsch, Histologie 3.Ausgabe 2010)

### 2.2.2 Der Gasaustausch

Die Alveolarwand teilt Blut- und Luftraum. Sie besteht aus dichtem Kapilarendothel, der dünnen Basalmembran aus Bindegewebe und dem dünnen Alveolarepithel, so dass die alveolokapilläre Membran etwa 0,5-1  $\mu\text{m}$  dick ist. Die Kapillarpassage des Blutes dauert ca. 0,3 s. Diese Kontaktzeit reicht aus, um die Gaspartialdrücke im Blut praktisch denen des Alveolargases anzugleichen. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut verläßt die Kapillaren über das Gefäßsystem der Venae pulmonales und erreicht dann die linke Herzhälfte, welche es erneut in den Körper pumpt. Die Perfusion der Lunge ist etwa identisch mit dem Herzschlagvolumen (5 l/min beim gesunden Erwachsenen). Normalerweise erreicht weniger als 2 % des Blutes die linke Herzkammer unter Umgehung der Alveolen.

Der Vorgang des Gasaustausches beruht auf dem Prinzip der Diffusion. Diese wird sowohl durch den Sauerstoffpartialdruckgradienten, als auch den Kohlendioxidgradienten der zwischen der Atemluft und dem Blut besteht, angetrieben.  $\text{O}_2$  diffundiert ins Kapillarblut,  $\text{CO}_2$  in die Alveolarluft. Venöses Blut erreicht die Kapillaren der Alveole von der aus der rechten Herzhälfte ausgehenden Arteria pulmonalis und ihren Verzweigungen. Dabei sind die typischen Partialdrücke für Sauerstoff 5,3 kPa (= 40 mm Hg) und Kohlendioxid 6,1 kPa (= 46 mm

Hg). Durch die Ventilation der Lungen werden dagegen im Alveolargas Partialdrücke von 13,3 kPa (= 100 mm Hg, 14 Vol.%) für O<sub>2</sub> und 5,3 kPa (= 40 mm Hg, 5,6 Vol.%) für CO<sub>2</sub> aufrechterhalten. Der Unterschied der Partialdruckdifferenzen ist die Ursache für den Gasaustausch durch Diffusion, die nach dem Fickschen Gesetz erfolgt:

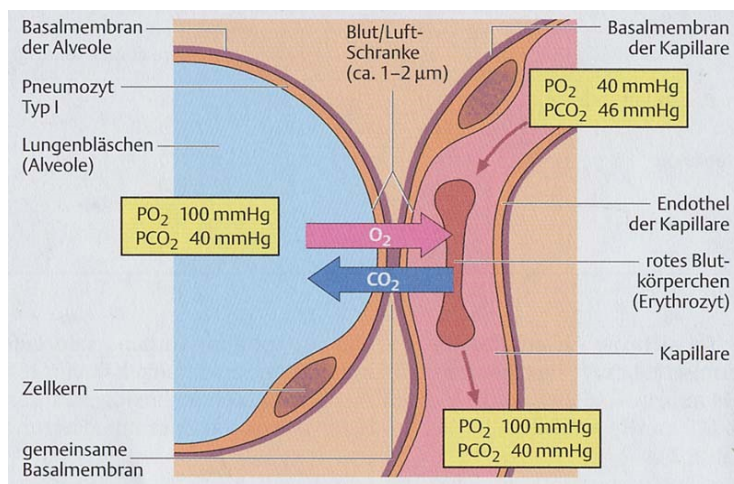
Das pro Kontaktzeit (t) transportierte Volumen (Q) beträgt in Ruhe beim Erwachsenen

$$Q/t = V_{O_2} = 250 \text{ ml O}_2/\text{min und}$$

$$Q/t = V_{CO_2} = 300 \text{ ml CO}_2/\text{min.}$$

( Faller A., Schünke M.1999)

Den Gasaustausch bestimmen zum einen die Diffusionskonstante (D), die die Durchlassfähigkeit der Alveolarwand bestimmt, die Austauschfläche (F) aus ventilierter Alveolaroberfläche im Kontakt mit durchströmten Kapillaren, zum anderen der Diffusionsweg (L) aus der Dicke der Alveolarwand und das Partikeldruckgefälle ( $\Delta p$ ) für O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als treibende Kraft und Anzeiger der Transportrichtung. Die Diffusionskapazität der Lunge  $DL = D:F/L$  erlaubt die klinische Bestimmung der Leistungsfähigkeit der Diffusion nach  $DL = V/\Delta p$  aus transportiertem Volumen pro Zeit Q/t, gemessen als O<sub>2</sub>-Aufnahme der CO<sub>2</sub>-Abgabe V, und mittlerem Partialdruckgefälle zwischen Kapillarblut und Alveolarluft  $\Delta p$ . Die Effizienz des alveolären Gasaustausches hängt von der Perfusion der Lunge mit Blut, der Alveolarinnenfläche, dem Diffusionsweg und von der alveolaren Ventilation ab.



**Abbildung 3:** Treibende Kräfte des raschen Gasaustausches:

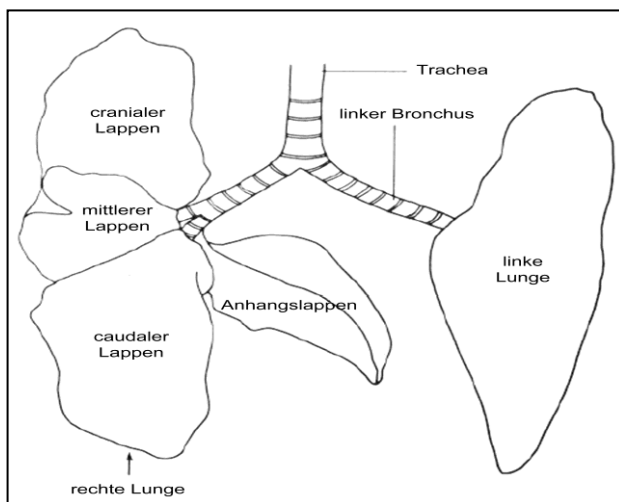
grosse Austauschflächen (= Lungenbläschen, Kapillarnetz [100 m<sup>2</sup>]), kleiner Diffusionsweg (Blut/Luft-Schranke [ca. 1 µm]), genügend lange Kontaktzeit (0,3 s) und als treibende Kraft Partialdruckdifferenzen der Atemgase ( Faller A., Schünke M.1999)

## 2.3 Die Lunge der Maus

### 2.3.1 Unterschiede in der Anatomie der Lunge von Mensch und Maus

Die Lungen der Maus bestehen im Gegensatz zu der Lunge des Menschen aus rechts vier Lungenlappen, dem Lobus cranialis, medialis, caudatus und accessorius, und links dagegen nur aus einem Lungenlappen, dem Lobus sinister.

Diese Aufteilung der Lungenlappen ist bei allen Mausstämmen gleich. Das Volumen der linken Lunge ist geringer als das der rechten.



**Abbildung 4** : Schematische Darstellung der Mäuselunge (aus Cook 1983)

Die Lunge ist aufgeteilt in den luftleitenden Teil und den eigentlichen respiratorischen Trakt. Der respiratorische Teil besteht beim Menschen aus den respiratorischen Bronchiolen, den Alveolargängen und Alveolen, bei der Maus besteht der respiratorische Abschnitt nur aus dem Alveolarbereich. Die Knorpelspangen der Trachea sind auch bei der Maus nicht geschlossen, die der Bronchien hingegen schon (Kaplan et al. 1983). Bei einer etwa 25-30g schweren Maus ist die zugängliche Trachea etwa 3-5 mm lang und hat einen Umfang von 2,5mm (Schwarte et al 2000). Es gibt nur wenige submuköse Drüsen (Irvin, Bates 2003), Clara Zellen kommen schon proximal der Bronchiolen vor (Pinkerton, Green 2004). Die Bronchioli respiratorii sind nicht ausgebildet, die Bronchioli terminales münden also direkt in die Ducti alveolares. Interlobuläres Bindegewebe findet sich kaum (Tyler, Julian 1992). Unterhalb der

primären Bronchien befindet sich kein Knorpel mehr in den Wänden der Atemwege (Kaplan et al 1983)

Eine weitere Besonderheit ist, dass sich die Alveolen erst postnatal entwickeln; am 3. Tag postnatal beginnt diese Entwicklung und endet am 14. Lebenstag (Warner et al. 1998), nach neueren Untersuchung findet jedoch noch bis zum 60. Tag eine langsamer verlaufende Phase der Alveolarisierung statt. (J.Schittny 2010) Die nutritive Blutversorgung der Atemwege der Mäuse erfolgt nicht über Vasa privata, dieses ist, bedingt durch die geringe Dicke der Atemwege, nicht nötig. Bei Atemwegsobstruktion erfolgt die Blutversorgung aus den Interkostalgefäßen über die Pleura (Mitzner et al. 2000).

Die Gefäße wandeln sich ebenso wie in der humanen Lunge in ihrem Verlauf nach distal vom elastischen in den muskulären Typ um, die Tunica media enthält aber mehr glatte Muskelzellen. Auch die Pulmonalvenen und sogar die kleinen Venen weisen eine dicke Schicht quergestreifter Muskelzellen in der Media auf. Sie verlaufen parallel zum Bronchialbaum und nicht interlobulär (Kay 1992).

## **2.4 Altersbedingte Veränderungen der Struktur der Lunge**

### **2.4.1 Die Entwicklung der Lungen**

Die mittlere Lebenserwartung von Labormäusen wie des Stammes C57/BL6 beträgt ungefähr 24-30 Monate. Zwischen ein bis circa neun Monaten wachsen die Mäuse; Körpergewicht, Lungenvolumen und Alveolargröße nehmen weiterhin zu während die postnatale Alveolarisierung vorher mit bis zu 60 Tagen abgeschlossen ist. (Kawakami et al 1984, J Schittny 2011). Gilbert et al 1999 gehen davon aus, dass die postnatale Alveolarisierung der Lunge beim Menschen bis zum Ende des zweiten Lebensjahres nahezu abgeschlossen ist und bis zum 8. Lebensjahr nur noch in geringem Ausmaß abläuft (Burri PH et al 1997).

### **2.4.2 Die Postnatale Lungenentwicklung**

Während dieser Alveolarformation verzweigen sich die distalen Atemwege immer weiter, so dass neue Acini und damit eine möglichst große Oberfläche entstehen, und der Gasaustausch in den Endverzweigungen stattfinden kann.

Die Alveolarisierung beginnt mit dem Auftreten schmaler Grate auf beiden Seiten der sakkulären Wände. Diese neu gebildeten interalveolären Grate unterteilen die vorliegenden Einheiten unvollständig in kleinere Alveolen und werden als Sekundärsepten bezeichnet, sie entstehen aus den intersakkulären, primären Septen.

An dem freien Ende des sekundären Septums finden sich Elastinfasern. Die Ablagerung von Elastinfasern ist eng verbunden mit der alveolären Formation, da die Auffaltungen der interalveolären Wände entlang der Elastinfasern entstehen (Rannels SR, Rannel DE. 1988).

Während des Prozesses der Alveolarisierung kommt es ebenfalls zu einer Verzweigung des mikrovaskulären Systems, der arteriellen und venösen Gefäße.

Die aufgefalteten sekundären Alveolarsepten enthalten initial ein doppeltes Kapillarbett, da sich das Mesenchym der Primärsepten reduziert und sich die Caliculi mit den Alveolen enger aneinanderlagern.

Diese unreife Struktur unterscheidet sich von der adulten Morphologie, in der nur ein Kapillarbett vorliegt. Burri et al postulieren, dass Alveolen nur in Bereichen entstehen können, die wie die unreifen Septen ein doppeltes Kapillarbett besitzen. Diese finden sich in der adulten Lunge nur noch an den Grenzflächen der Alveolen zu den peripheren Luftwegen, der Pleura oder der Adventitia der Bronchien oder größerer Gefäße (Burri PH. 1974).

### **2.4.3 Wachstum und Altern der Lunge**

In der zweiten Entwicklungsphase beginnt der Alterungsprozess, es kommt zu einer weiteren Zunahme von Lungenvolumen, Körpergewicht und alveolarer Oberfläche. Allerdings bleiben die Alveolen in ihrer Größe relativ konstant, gleichzeitig kommt es zu einer Ausdünnung der Septen und Fensterung der Alveolarwände durch Poren.

Im weiteren Alterungsprozess vergrößern sich diese interalveolären Poren und der Gehalt an elastischen Fasern wird kleiner. Dies bedingt einen Verlust der Elastizität, die Compliance steigt an und es besteht eine Neigung zur Hyperinflation.

Insgesamt wird die Zahl der Alveolen weniger, und es kommt zu einer Neuordnung von extrazellulärer Matrix wie Kollagen und Elastin, ein Prozess der zu Streckung und Verflachung der Alveolen führt sowie zu einer Blähung der Ducti alveolares (Pinkerton, Green 2004). Die Gasaustauschfläche verkleinert sich, und ebenso die Diffusionskapazität.

Zudem kommt es zu einer Zunahme an phagozytierenden Zellen in der bronchoalveolären Lavage (BAL), die ausserdem eine eingeschränkte Sekretion an proinflammatorische Substanzen aufweisen, so dass es zu einer Dysregulation in der Immunabwehr kommt.

Der Verlust an Elastizität der Alveolarsepten, veränderte proinflammatorische Reaktion, die Neigung zur Hyperinflation, und die Veränderung der Alveolen und Ductuli alveolares begünstigen mit zunehmendem Alter eine Emphysementwicklung (Pinkerton und Grenn 2004).

## **2.5 Die Bedeutung von Surfactant**

Da die Alveolaroberfläche eine Grenzfläche darstellt, zwischen Flüssigkeitsphase und Gasphase, entsteht eine Oberflächenspannung mit der Tendenz, die gekrümmte Oberfläche also den Alveolendurchmesser zu verkleinern

Diese Oberflächenspannung ist neben elastischen Fasern für die Retraktionskräfte der Lunge verantwortlich. Daher sind die Alveolarräume mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt, der zum größten Teil aus einer wässrigen Hypophase, die das pulmonale Surfactant enthält, besteht.

Während der Atmung kommt es zu druckbedingten Spannung und Retraktion der Alveolen, die durch diesen gleichmäßig verteilten Surfactantfilm reguliert wird. So wird die Atmung so erleichtert und mechanisch stabilisiert (Kishore et al 2005).

1929 postulierte von Neegard erstmals das Vorhandensein einer oberflächenaktiven Substanz, die eine niedrige Oberflächenspannung während der Atmung gewährleistet und so die Ventilation sichert. J.A. Clements und R.E. Pattle wiesen diese, später als Surfactant bezeichnete Substanz 1957 nach und konnten dessen physikalische Eigenschaften entschlüsseln. Surfactant als „surface active agent“ reguliert die Oberflächenspannung der Alveolen unter variierenden Volumina. Er verhindert somit, dass die Alveolarwände während der Expiration kollabieren und die große Oberflächenspannung der Alveolaroberflächen die Inspiration behindert (Harding et al 2004).

Zusammengesetzt ist das Surfactant zu 90 % aus Lipiden (Phospholipide) und zu etwa 10 % aus Surfactant-Proteinen, und bildet so eine phospholipid-reiche Membran (Sano et al 2005).

Erst Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden die genaueren Funktionen der Surfactant Proteine untersucht. 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, Reid 2003). Kuan et al konnten 1992 erstmals darstellen, dass Surfactant Protein-D zur Effektivität des Immunsystems beiträgt, indem es bakterielle Pathogene bindet. Seitdem rücken die immunmodulatorischen Eigenschaften der Surfactant Proteine immer mehr in das Interesse der modernen Wissenschaft. Inzwischen weiß man, dass SP-A und SP-D in der Lage sind, über verschiedene Erkennungsmechanismen diverse Pathogene zu binden und zu opsonisieren, was die 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 (Korfhagen et al 1998, Crouch EC 1998, 2000, Kishore et al 2005,2006).

### **2.5.1 Sekretion des Surfactant**

Ursprünglich wurde angenommen, dass alle Surfactantbestandteile im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und zusammengesetzt, und zum Golgi-Apparat transportiert, und schließlich in Einschlußkörperchen, den Lamellenkörpern, lamellar bodies, im Zytoplasma gespeichert werden (Haagsmann und van Golde 1991).

Durch Exozytose gelangen die reifen Lamellenkörperchen dann in den Alveolarraum auskleidenden Flüssigkeitsfilm, und wandeln sich hier in das gitterförmige tubuläre Myelin um und bilden an der alveolären Oberfläche eine monomolekulare Grenzschicht zwischen der wässrigen Phase und der Luft im Alveolus. Die Formation in das tubuläre Myelin erfolgt in Anwesenheit von Calcium; SP-A und SP-B dienen hierbei der Adsorption von Surfactantkomponenten in den Surfactantfilm (Novick et al 1991).

Clara Zellen können zwar Surfactantbestandteile synthetisieren, jedoch können nur die Alveolarepithelzellen Typ II alle Bestandteile des Surfactant produzieren. 2006 konnte jedoch gezeigt werden, dass es für einzelne Anteile des Surfactant unterschiedliche Sekretionswege gibt. Es konnte durch Untersuchung und Darstellung der einzelnen Synthesewege des SP-A, SP-C und Phosphatidycholin (PC) nachgewiesen werden, dass

nur die Synthese und Sekretion des SP-B wie oben beschrieben geschieht. PC wird am Golgi-Apparat vorbei direkt in den Lamellenkörperchen gespeichert und SP-A kontinuierlich sezerniert und nach Wiederaufnahme in den Lamellenkörperchen gespeichert (Osonai et al 2006).

Die Regulierung des Surfactant-Pools erfolgt durch Alveolarepithel Typ II Zellen. Hierzu gehören neben Synthese und Sekretion auch Wiederaufnahme und lysosomatischer Abbau aber auch Recycling, sowohl der Lipide als auch der Surfactantproteine (Young et al 1989, Herbein et al 2000, Ikegami 2006).

Bis zu 90 % des Surfactant werden wieder aufgenommen, metabolisiert und erneut in den Alveolarraum abgegeben, ein Teil wird durch Makrophagen abgebaut.

Nach Wiederaufnahme des verbrauchten Surfactant erfolgt zunächst eine Umwandlung in unilamelläre Vesikel, die keine Aktivität mehr aufweisen. Sie können als so genannte small aggregates (SA) aus der BAL isoliert werden (Williams 1992).

### **2.5.2 Surfactantlipide**

Die Phospholipide bestehen zu etwa 80 % aus Phosphatidylcholin (PC), das vorwiegend als gesättigtes hydrophiles und lipophiles Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegt, und zu etwa 10 % aus Phosphatidylglycerol (Keough 1998).

DPPC hat sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften, so ist es hauptsächlich für die Reduktion der Oberflächenspannung verantwortlich.

Außerdem enthält das Surfactant Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol als saure Phospholipide. Ihr Anteil beträgt etwa 10 bis 15 %. Desweiteren liegen neutrale Lipide als Cholesterol und Acylglycerol vor (Rooney 1998).

### **2.5.3 Die Surfactantproteine**

Man unterteilt die Surfactant Proteine seit 1990 in Surfactant Protein (SP) A bis D. Sie 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 unterteilt sie weiter in die kleinen, hydrophoben Proteine SP-B und SP-C, und in die größeren, hydrophileren SP-A und SP-D (Kishore et al 2005).

Die Surfactantproteine sind Glykoproteine, SP-D gehört zum kollagenen Typ der Calcium abhängigen Collectine, zu denen auch SP-A und das Serum-Mannose-bindende Lectin gehören (Crouch 1998).

SP-A und SP-D werden von Alveolarepithelzellen Typ II und nicht-zilientragenden bronchialen Epithelzellen, den Clara Zellen synthetisiert. Für SP-C ist der einzige Syntheseort der Alveolarepithelzellen Typ II

Die Proteine befinden sich zunächst in intrazellulären Organellen, den Lamellar Bodies und später im tubulärem Myelin. Sie werden in den, den Alveolarraum auskleidenden Flüssigkeitsfilm sezerniert.

### **2.5.3.1 Die Surfactantproteine B und C**

SP-B und SP-C sind mit 14 und 6 kDa kleine stark hydrophobe Proteine und werden deswegen auch Proteolipide genannt. So können sie mit den Surfactant-Lipiden in der Luft-Flüssigkeits-Schranke interagieren. Durch eine Adsorption von Phospholipiden in die Membran verstärken sie die Formation des Oberflächenfilmes und setzen die Oberflächenspannung vor allem in der Luft-Flüssigkeitsgrenze der Alveolen (Sano, Kuroki 2006) der peripheren Atemwegen (Kishore et al 2005) herab. SP-C hat in dieser Hinsicht eine schwächere Wirkung als das SP-B (Possmayer 1988); ihr Einfluss ist zwar additiv, sie können sich gegenseitig jedoch nicht ersetzen.

### **2.5.3.2 Die Surfactantproteine A und D**

SP-A (26-38kDa) stellt mit ca. 6% 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 Alveolarepithelzellen Typ II über feedback-Mechanismen dazu bewegen kann, die Sekretion von Phosphatidylcholin zu drosseln, bzw. den Re-uptake der Surfactantlipide zu steigern (Hohlfeld et al 2002). Zudem ist es sowohl an der angeborenen, als auch an der erworbenen Immunabwehr beteiligt. Es interagiert mit Zellen des Immunsystems und verstärkt 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, einer extrazellulären Form des Surfactant; bei vollständigem Mangel an SP-A wird daher kein tubuläres Myelin gebildet (Kishore et al 2005, Sano et al 2005).

SP-A  $-/-$  Mäuse sezernieren vor allem in der Oberflächenaktivität minderwertigen Surfactant, was jedoch keine Auswirkungen auf die normale Lungenfunktion zu haben scheint (Hohlfeld et al 2002 und 2003). Darüber hinaus zeigen SP-A  $-/-$  Mäuse deutliche Defekte in der Immunantwort und der bakteriellen sowie viralen Clearance. (Sano et al 2005). SP-A knock-out Mäuse weisen Defizite bei der Pathogenabwehr und der bakteriellen und viralen Clearance auf (Sano, Kuroki 2002).

SP-A unterscheidet sich von SP-D unter anderem in seiner Affinität zu den Liganden. 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.

#### **2.5.3.2.1 Aufbau der Surfactantproteine A und D**

Wie andere Collectine bestehen das SP-D und das SP-A aus vier Strukturdomänen: dem kurzen Amino-terminale Ende, das eine kurze Disulfid-Brücke als Untereinheit besitzt (Sano, Kuroki 2006), einer relativ langen kollagenen Domäne, bestehend aus Gly-X-Y Wiederholungen (Sano et al 2006) einem kurzen Verbindungspeptid, Neck Region genannt, und dem Carboxy-Ende, die C-Typ Collectin Kohlenhydrat-Erkennungs Domäne oder CRD.

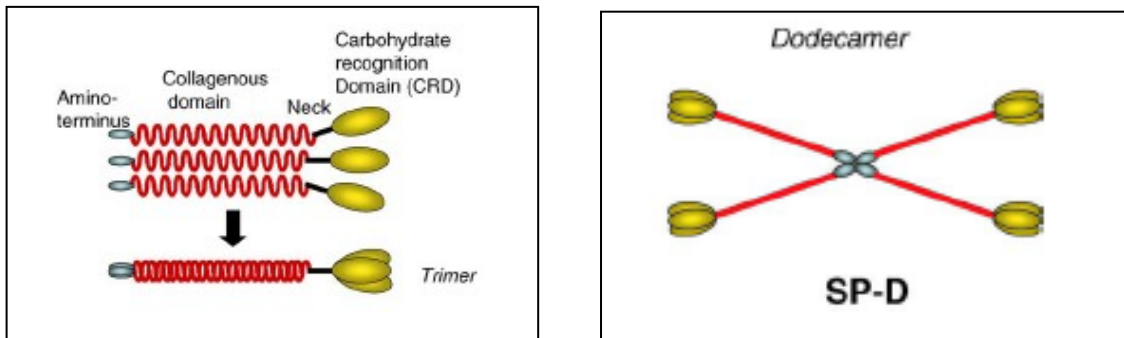
Der kollagene Teil des SP-D (Crouch 1998) enthält Hydroxylysine und Hydroxylysyl-Glycoside. Die CRD enthält vier Cystein-Reste, die zur Stabilisierung der Calcium- und Liganden- bindenden Strukturen beitragen. Drei dieser 43kDa SP-D Ketten bilden ein Trimer, indem sie untereinander mit ihrem Amino-Ende assoziieren, durch Disulfidbrücken stabilisiert. Außerdem ist hierfür eine Anordnung der Kollagenen-Domäne in einer Triple-Helix und Bündelung in der Neck-Region wichtig.

SP-D ist codiert durch ein einzelnes Gen auf Chromosom 10, neben SP-A und anderen Collectinen. Alle Collectine formen Multimere; dies erhöht die Affinität zu Abwehrzellen und Pathogenen. So können als predominanten Form des molekularen SP-D Dodecamere (4x3 Ketten) isoliert werden. Neben diesen kommen jedoch auch individuelle Trimere, Einzelarm oder andere multimere Formen vor (Crouch 1998).

An ihrem Amino-Ende können die SP-D Dodecamere (560 kDa) (Hartl 2006) assoziieren und Multimere bilden. Diese zeigen eine höhere Bindungsaffinität zu

Liganden und sind potenter in der Aggregation von Mikroorganismen und aggregationsabhängigen Interaktion mit Leukozyten (Crouch 1998).

Die oligomere Form des SP-A besteht aus einem Octadecamer, zusammengesetzt aus sechs trimeren Untereinheiten, davon jede aus 26-35 kDa Monomeren. SP-A bildet eine Blumenstrauß-ähnliche Form.



**Abbildung 5 a und b:** strukturelle Bestandteile des SP-D und Molekülstruktur des SP-D (Sano und Kuroki 2005)

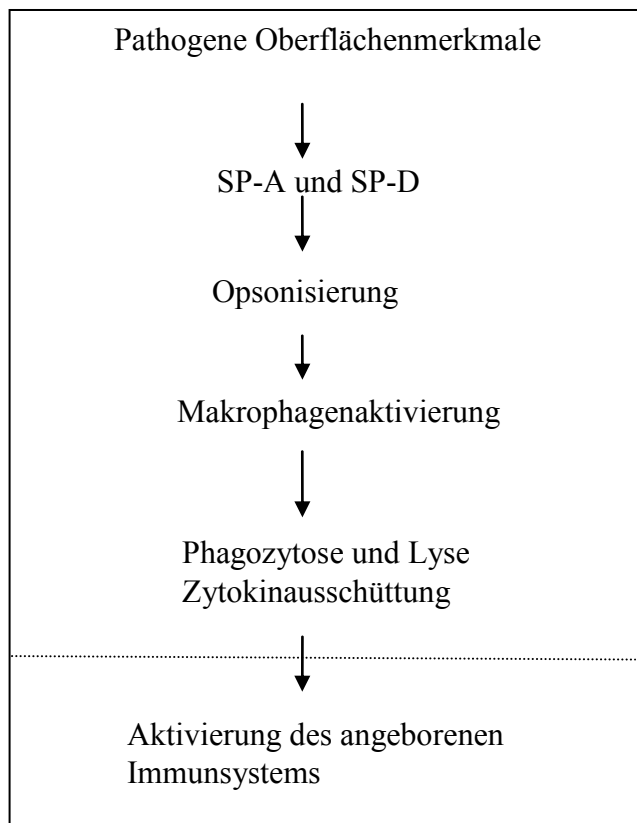
### 2.5.3.3 Funktionen der Surfactantproteine A und D

Beide SP-A und SP-D übernehmen in der Immunabwehr zahlreiche Funktionen.

Beide gehören zusammen mit den Serumlektinen, den Mannose bindenden Proteinen und den bovinen Conglutininen zur Familie der  $Ca^{2+}$  abhängigen Lektine (C-Typ Lektine) (Clark et al 2002). Diese können mit einer oder mehreren ihrer Domänen Kohlenhydratreste erkennen und binden.

So können sie an ein breites Spektrum von Mikroorganismen, gram-positive und gram-negative Bakterien, Pilze und Viren binden (Sano, Kuroki 2005).

Außerdem können sie über C-Typ Lektin-Rezeptoren an Effektorzellen des Immunsystems binden und deren Funktion modulieren (Kishore et al 2006).



**Abbildung 6:** Schemazeichnung zu den Immunfunktionen des SP-D und SP-A

### 2.5.3.3.1 Interaktion mit körperfremden Zellen

Durch die oben beschriebene Fähigkeit Kohlenhydratreste zu binden erkennt SP-D sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien. Die Erkennung erfolgt durch Bindung der CRDs an terminale Monosaccharide, meistens Mannose und Glukose, die auf der Oberfläche vieler Mikroorganismen, also Bakterien, Viren aber auch Hefen, Pilzen und Hausstaubmilben zu finden sind (Kishore et al 2005).

Die Bindung an Pathogene führt zu Hemmung des Wachstums, Opsonisierung, Agglutination und Neutralisation (Sano und Kuroki 2005). Bei Bakterien erfolgt die Bindung über die CRD an Komponenten der Zellwand (Hartl 2006) und der Lipopolysaccharidhülle (Crouch 2000). So können Keime durch SP-D gebunden werden und im Wachstum gehindert werden (Crouch 2000).

SP-D und SP-A binden und opsonisieren eine Vielzahl an Pilzen und verhindert das Pilzwachstum und die weitere Entstehung von Hyphen. Die Bindungen der Pilz-

Pathogenen, durch SP-A und SP-D, führen zu einer Agglutination und verstärkten Phagozytose durch Neutrophile und Makrophagen (Hartl et al 2006).

SP-D behindert außerdem die Neuraminidase Aktivität zahlreicher Influenza A-Virus (IAV-Stämme) (E.Crouch 2000), indem es an die virale Mannose-Oligosaccharide der Hämagglutininregion bindet und deren Aktivität hemmt kommt es zum Verlust der Infektiosität des IAV(Kishore et al 2005). Desweiteren verstärkt es die Phagozytose und die mukoziliären Reinigung von zahlreichen respiratorischen Viren (Hartl et al 2005).

SP-D ist in der Lage mit seiner CRD-Region Allergene zu binden, so dass die Bindung des Immunglobulin E an die Allergene und die darauffolgende Ausschüttung von Histamin und IL-2 (Interleukin 2) verhindert wird. Außerdem ist SP-D in der Lage, durch Beeinflussung der Makrophagenfunktion, die Th-2-Antwort zu verhindern (Kishore et al 2005). Die so gesteigerten IL- 10 und IL-12 Level führen zu einer stärkeren Th-1 Wirkung, die Entzündungsprozesse reguliert und die Differenzierung der B-Lymphozyten moduliert. Th1 Zellen sind außerdem für die Produktion von antibakteriellen und toxischen Substanzen (Sauerstoffradikale, Stickoxid (NO) oder TNF-alpha) durch Makrophagen verantwortlich, des Weiteren für eine chemotaktische Leukozytenimmigration und vermehrte Apoptose.

Alle diese Prozesse wirken proinflammatorisch, auf lange Sicht kommt es allerdings zu einer Milderung chronischer Entzündungsprozesse, bedingt durch eine verminderte Ausbildung von B-Gedächtniszellen.

#### **2.5.3.3.2 Interaktion mit körpereigenen Zellen**

SP-D kann auf mindestens zwei verschiedene Arten mit körpereigenen Zellen interagieren: CRD-abhängig und CRD-unabhängig. CRD-abhängig kann zum Beispiel das CD14, das von vielen Körperzellen exprimiert wird , als membranständiger Rezeptor für SP-D chemotaktische Signale an Neutrophile und Monozyten vermitteln, ebenso lektinabhängig bindet SP-D an Lymphozyten und über Phosphoinositol an Alveolarmakrophagen (Crouch EC 2000). Lektinunabhängig kann SP-D, wahrscheinlich vermittelt über Glykoprotein 340 (gp-340) an Alveolarmakrophagen gebunden werden.

Auch eine Bindung am Alveolartyp II Zellen wird beobachtet, wobei man zunächst davon ausging, dass es im Gegensatz zu SP-A zwar aufgenommen und abgebaut wird, den Surfactant Lipid Pool jedoch nicht beeinflusst (Crouch EC 2000). Später fand man

heraus, dass SP-D den Metabolismus der Surfactant Lipide und vor allem von PC ebenfalls reguliert (Whitsett 2005).

In einer Studie von Clark et al wirkt SP-D als Opsonin apoptotischer Neutrophiler, wodurch es deren Phagozytose durch Makrophagen beschleunigt, wodurch ebenso die Apoptoserate der Alveolarmakrophagen selbst sank (Clark et al 2002, Palaniyar et al 2005, Hartshorn et al 2007). Aufgrund der schnelleren Clearance der sterbenden 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. SP-D erkennt die Fragmente der DNA apoptotischer Zellen jedoch auch direkt, wonach diese phagozytiert und abgebaut werden. So verhindert es die Akkumulation nekrotischer Zellen, wodurch wiederum entzündliche Reaktionen und Auto-Antikörperbildung auf frei gewordenen DNA aus diesen Zellen gebremst werden (Clark et al 2002, Palaniyar et al 2005, Hartshorn et al 2007). In einigen Studien zeigte sich, dass SP-D auch ohne Zusammenhang mit Pathogenkontakt die Makrophagenfunktion moduliert und durch Regulation der Oxidantien-, Zytokin- und Metalloproteinasenaktivierung als Antioxidans in der Lunge wirkt (Stahlman et al 2002).

Obwohl die Lunge ständigen Pathogenkontakt hat, entzündet sie sich normalerweise nicht. Dies ist auch 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 et al haben gezeigt, dass SP-A und SP-D abhängig vom Charakter der Bindungen an der CRD und ihrer Interaktion mit Makrophagen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Signale vermitteln können. Die Bindung an die Makrophagen erfolgt entweder am „globular head“ oder „collagen tail“ der CRD und bestimmt so den Charakter der Makrophagenaktivität (Haczku et al 2004).

## 2.5.4 Surfactant und Lungenemphysem

### 2.5.4.1 Definition und Morphologie des Lungenemphysems

Das Lungenemphysem ist eine irreversible und anhaltende Erweiterung distal der Bronchioli terminales infolge einer Destruktion der Alveolarwände. Alle Emphysemtypen gehen direkt oder indirekt mit einer Abbaustörung und/oder Synthesestörung des alveolären Stützgerüsts einher, so dass das Emphysem in die Gruppe der metabolischen Lungenerkrankungen eingegliedert werden kann. Man unterscheidet in der Pathologie zwischen dem primären Emphysem und dem sekundären Emphysem, das als Komplikation der COPD, durch angeborenen Alpha-1-Antitrypsin (AAT-Mangel), als Narben- oder Überdehnungsemphysem entstehen kann. Das Lungenemphysem ist morphologisch definiert, daher ist es sinnvoll, die verschiedenen Lungenemphysemtypen auch nach morphologischen Kriterien zu klassifizieren. Das zentroazinäre Emphysem liegt in den Oberlappen und führt zu keiner nennenswerten Volumenvergrößerung der Lunge. Die respiratorischen Bronchiolen sind geweitet und von einem peribronchiolären, granulozyten- oder lymphozytenhaltigen Infiltrat umgeben. In den benachbarten Alveolen findet sich oft eine chronische Entzündungsreaktion. Das panazinäre Emphysem ist seltener, betrifft alle Azinusteile und tritt oft bei AAT-Mangel auf. Histologisch finden sich hier abnorm große Alveolarräume, die durch Einrisse benachbarter alveolärer Trennwände entstanden sind und sich blasenförmig zu sogenannten Bullae ausweiten. Teilweise kommt es hier zu einer fibrotischen Verdickung der Alveolarwände, die gefäßärmer sind. Entzündliche Infiltrate liegen nicht vor. Das periazinäre Emphysem ist dadurch gekennzeichnet, dass die distalen Anteile des Azinus befallen sind, die an die Pleura oder Interlobularsepten grenzen. Häufiges Husten im Rahmen einer chronischen Bronchitis wirkt sich mechanisch destruktiv auf die hauchdünnen Alveolarsepten aus. Häufig liegt es begleitend zu anderen Emphysemformen vor. Beim Narbenemphysem greifen entzündliche Prozesse mit ihrer proteolytischen Aktivität auf das angrenzende Lungengewebe über, es bilden sich Riesenalveolarräume, umgeben von kollabierten und vernarbten Alveolarwänden. Von diesen vier sekundären Formen des Lungenemphysems ist das primär-atrophische Emphysem abzugrenzen, das Altersemphysem. Hier sind die Luftwege in einem Azinus gleichförmig ausgeweitet

und die Alveolarwände geringfügig fibrotisch verstärkt. Zeichen der Entzündung oder Destruktion fehlen.

#### **2.5.4.2 Pathogenese des Lungenemphysems**

Die molekularen Mechanismen der Emphysementstehung sind auch heute noch nicht vollständig geklärt. Nach aktueller Vorstellung vergrößern sich die Alveolen auf dem Boden einer chronischen Entzündung und eines Ungleichgewichts im Proteasen/Antiproteasenhaushalt (Herold et al 2005, Vogelmeier et al 2006). Bei einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen mit einem Überwiegen der Proteasen kommt es zur Andauung der Lunge und progredienten Erweiterung und irreversiblen Destruktion der Atemwege.

Ursachen für dieses Ungleichgewicht können zum einen genetische Defekte, aber auch chronische Noxen, wie Zigarettenrauch, Kadmium oder schwefelhaltige Dämpfe, die zu einer gesteigerten Proteasenfreesetzung und deren Überschuss führen, oder auch anhaltend aktivierte Entzündungszellen sein, wie bei chronischen Erkrankungen.

Dies alles sind demnach prädisponierende Faktoren für die Entstehung eines Lungenemphysems.

Bereits bei der Abwehr von Erregern kommt es in der gesunden Lunge zur Freisetzung von Proteasen (besonders Elastase) aus neutrophilen Granulozyten. Diese dienen der Erregerabwehr und werden bei einem Überschuss durch Proteinaseinhibitoren, vorallem Alpha-1-Antitrypsin (AAT) neutralisiert.

Elastolytische Enzyme werden von verschiedenen Abwehrzellen freigesetzt. Eine herausragende Rolle besitzen hier die Alveolarmakrophagen. Sowohl unter normalen Umständen als auch im Rahmen einer chronischen Entzündung sind sie die in der Lunge am häufigsten vorkommenden Abwehrzellen (Shapiro S. 1995). Sie kommen auffallend häufig in den Bronchioli respiratorii von Zigarettenrauchern vor, dem Ort, an dem sich ein Lungenemphysem zuerst manifestiert (Bernard S. et al 1998). Eine weitere wichtige Untergruppe von Enzymen mit proteolytischer Aktivität sind die Metalloproteinasen, die sowohl Elastin als auch die verschiedenen Komponenten der Basalmembran angreifen. Sie besitzen außerdem die Fähigkeiten zur Inaktivierung von AAT und zur Freisetzung von aktivem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  in den Extrazellularraum aus einer inaktiven membrangebundenen Form. Die Forschung hat sich lange Zeit auf Abwehrzellen als die Verursacher einer proteolytischen Zerstörung des Lungengewebes

konzentriert. Daneben spielen aber auch die in den Alveolarsepten sesshaften Zellen eine Rolle. Zum Beispiel konnten Pneumozyten Typ II dazu angeregt werden, verschiedene Metalloproteinasen zu sezernieren (Shapiro Sd. 1995).

Diese Enzyme kommen auch in den Alveolarmakrophagen und Neutrophilen vor, und greifen nur das Elastin, nicht aber das Kollagen an.

Die Abbildung 7 (Seite 29) gibt einen Überblick über das gegenwärtige Verständnis der zellulären Grundlagen. Anfangs liegt eine chronische Exposition einer Noxe vor, die zu einer Schädigung des Alveolarepithels führt und zu einer Erhöhung der Makrophagenzahl. Diese wiederum setzen vermehrt proinflammatorische Zytokine frei, beispielsweise Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , growth-related antigen  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ), macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1) und Interleukine, Leukotrine, Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite. Dies führt zu einer Chemotaxis CD8 positiver T-Lymphozyten, neutrophiler Granulozyten und Monozyten. (Vogelmeier et al 2006) so dass diese in das betroffene Areal einströmen; gleichzeitig werden die Proteaseinhibitoren, wie zum Beispiel  $\alpha_1$ -Antitrypsin und TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3), gehemmt und es kommt zum proteolytischen Verdau der Epithelzellen durch Destruktion von elastischen Fasern. Die Makrophagen schütten vermehrt Metalloproteinasen (MMPs) aus, die die Antiproteasen zusätzlich hemmen.

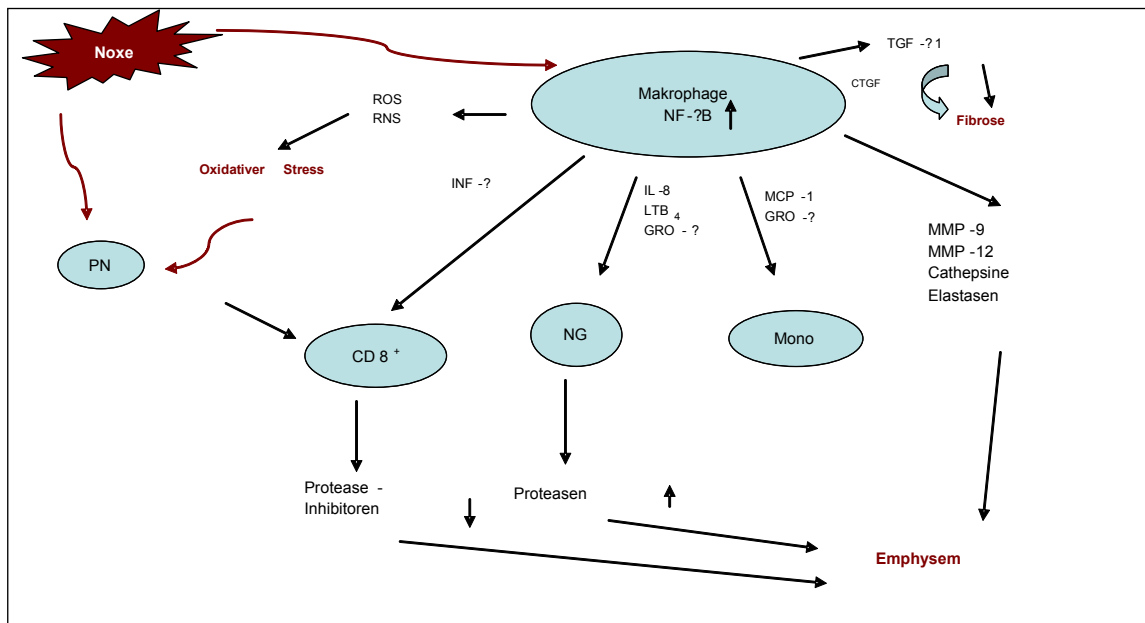
Wahrscheinlich vermittelt durch Caspasen und Mangel an VEGF (vascular endothelial growth factor) kommt es zur Akkumulation von apoptotischen Alveolar- und Bronchiolarepithelzellen sowie Endothelzellen. Sie zeigen erhöhte Apoptoseraten bei verminderter Clearance, was ebenfalls zu chronischer Entzündung und Alveolardestruktion beiträgt (Taraseviciene-Stewart et al 2006). Gesteigerte Produktion von TGF- $\beta_1$  (transforming growth factor - $\beta_1$ ) 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.

(Koczulla und Vogelmeier et al 2008).

Dies wiederum führt zu einer Versteifung der Bronchiolen, und zu einer Behinderung der physiologischen Atemmechanik. Es kommt zu einer Ventilationsstörung mit Zunahme des Residualvolumens, zu nicht belüfteten Alveolen und zu Emphysebullae. Die Abnahme des am Gasaustausch teilnehmenden Lungengewebes muss zu einer Vergrößerung der Atemvolumina führen, um den Sauerstoffbedarf decken zu können.

Dies ist jedoch begrenzt durch die Compliance der Lunge und des Thorax. Es kommt schließlich zu einer respiratorischen Partialinsuffizienz mit Hypoxämie, oder respiratorischen Globalinsuffizienz mit Hyperkapnie. Residualvolumen und Totraumvolumen steigen, die Vitalkapazität sinkt (Vogelmeier et al 2006).

Aufgrund des Euler-Liljestrand-Mechanismus kontrahieren sich die Arteriolen in den hypoxischen Alveolen, so dass der Widerstand im pulmonalen Kreislauf zunimmt. Dies führt letztlich zum pulmonalen Hochdruck, einer erhöhten Rechtsherzbelastung und evtl. zu einer Rechtsherzinsuffizienz.



**Abbildung 7 :** Schematische Darstellung der Pathogenese des Lungenemphysems auf zellulärer Ebene (nach Barnes et al. 2003; Vogelmeier et al. 2006)

PN: Pneumozyten, ROS: Reaktive Sauerstoffmetabolite, RNS: Reaktive Stickstoffmetabolite, NG: Neutrophile Granulozyten, CD8+: T-Lymphozyten, INF- $\gamma$ : Interferon - $\gamma$ , IL-8: Interleukin 8, GRO-  $\alpha$ : growth related oncogene  $\alpha$ , MCP-1: macrophage chemotactic protein 1, MMP: Metalloproteinase, NF- $\kappa$ B: nuclear factor-  $\kappa$ B, TGF-  $\beta$ 1: transforming growth factor - $\beta$ 1, CTGF: connective tissue growth factor

## 2.6 Mäuse als Tiermodell in der Emphysemforschung

Viele der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen stammen aus der Untersuchung von Tiermodellen, dabei sind jedoch sowohl deren Möglichkeiten als auch Grenzen zu beachten.

Tiermodelle spielen bei der Erforschung pathogenetischen Mechanismen und Erprobung neuer Therapien eine Rolle (Dawkins 2001). Als Modelltiere eignen sich kleine Nager wie Mäuse oder Ratten gut, da diese Spezies gut untersucht sind, sie einfach zu halten und zu züchten sind und eine hohe Reproduktionsrate ausweisen. Durch ihre kurze Lebenserwartung können Studien innerhalb weniger Monate abgeschlossen werden (Shapiro Sd 2000). Ein weiterer Vorteil ist, dass ihr Genom sequenziert ist und viele Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen besitzt.

Es besteht die Möglichkeit der Nutzung von Antikörpern beispielsweise in der Signaltransduktionsforschung und der Herstellung transgener Tiere .

Die ersten Tiermodelle zur Erforschung von Lungenerkrankungen wurden durch Exposition mit schädigenden Noxen erzeugt. 1965 beschrieben Gross et al. das erste reproduzierbare Modell eines Emphysems durch Papain-Instillation in die Lungen von Ratten (Gross et al 1965). Bis heute wurden viele ähnliche Versuche mit der Instillation verschiedener Proteasen in die Lungen von Versuchstieren durchgeführt. Hierbei entstehen jedoch nur relativ ungenaue Tiermodelle des Zigarettenrauch-induzierten menschlichen Emphysems, da durch die einmalige massive Schädigung durch Instillation einer Noxe nicht der ständige gering aktive Entzündungsprozess entsteht, den man als Ursache der COPD annimmt (Dawkins 2001). Andere Tiermodelle sind aus der Beobachtung heraus entstanden, dass Mausstämme mit bestimmten Mutationen eine Vergrößerung der Alveolen zeigen, entsprechend dem menschlichen Emphysem (Martorana PA, et al 1993 und 1989). Die Mutationen verursachen eine gestörte Entwicklung der Lunge (Burri PH 1996), so dass diese Modelle eher der Erforschung der Entwicklung der Lunge (Dawkins et al 2001) dienen und weniger zur Klärung der Emphysempathogenese, bei der es zu einer Zerstörung voll entwickelten Lungengewebes kommt, wie es bei der COPD der Fall ist (Wiebe et al 1998),

Die gezielte Ausschaltung von Genen bei Versuchstieren ermöglicht die Erforschung hierdurch entstehender Funktionsverluste des codierten Proteins. Auch hier hat die genetische Veränderung jedoch häufig Auswirkungen auf die Entwicklung der Versuchstiere, so dass Modelle entwickelt wurden, in denen das zu untersuchende Gen

gezielt nach Abschluss der Lungenreifung ausgeschaltet werden kann, sogenannte konditionale „Knock-outs“ (Gu H. 1994). Ein Beispiel hierfür ist die Forschung an SP-D<sup>-/-</sup> Mäusen.

Diese zeigen neben Veränderungen in der Surfactant Lipid Homöostase, eine erhöhte Infektionsrate, vor allem durch eine inadäquate oder fehlerhafte Immunantwort (Atochina et al 2004), und morphologische Veränderungen in der Ultrastruktur der Lunge.

Es konnte bei Untersuchungen der SP-D<sup>-/-</sup> Mäuse gezeigt werden, dass periphere chronische Atemwegserkrankungen vorliegen, die im Alter von etwa drei Wochen beginnen. Die Septen der Alveolen sind dicker, im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen, während die Gasaustauschfläche, also die Oberfläche der Alveolen im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypmäusen kleiner ist (Ochs et al 2004). Die Morphologie der Alveolen zeigt ein zunehmend emphysematöses Bild; sich vergrößernde Alveolen und eine vermehrte Destruktion von interstitiellem Gewebe treten neben folgenden Anzeichen chronischer Entzündung auf (Wert et al 2000):

Die Anzahl der Alveolen insgesamt verringert sich. Alveolartyp II Zellen werden zunehmend hyperplastisch und hypertroph, und enthalten mehr lamellar bodies, speichern also mehr Surfactant-Lipide intrazellulär.

Auffällig im Vergleich zu Wildtypmäusen und heterozygoten SP-D<sup>-/+</sup> Mäusen ist eine zehnfach höhere Anzahl der Makrophagen in der BAL. Diese zeigen sich vergrößert, schaumig, aufgetrieben und enthalten mehr Vesikel im Zytoplasma. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen bei SP-D<sup>-/-</sup> Mäusen mehr reaktive Sauerstoffmetabolite produzieren. Hierzu gehören z.B. Wasserstoffperoxid, und Stickstoffmetabolite. Dies verursacht eine Entzündungsreaktion mit emphysematösen Läsionen und zunehmenden alveolären Umbau (Yoshida und Whitsett 2006). Eine Ähnlichkeit zur Emphysementwicklung wird deutlich.

## **2.6 Zielsetzung**

Die vorgelegte Arbeit hat zum Ziel, die Alveolarsepten männlicher SP-D knockout Mäuse hinsichtlich altersbedingter morphologischer Veränderungen zu analysieren. Im Vergleich zur gesunden Lunge sind beim Emphysem morphologische Veränderungen in Form eines Verlustes von Alveolarsepten und einer Vergrößerung der Lufträume innerhalb der Lunge nachweisbar. Während die Lungen der Versuchstiere im Rahmen

der Promotion von Sarah Liefländer 2008 in Lübeck am Lichtmikroskop quantitativ-morphologisch untersucht wurden, beschäftigt sich diese Arbeit primär mit der quantitativen Analyse dieser Lungen am Transmissionselektronenmikroskop.

Es wurden die Lungen von 22 Versuchstieren, männlichen SP-D knockout Mäusen, im Alter von 28 Tagen, 3, 6 und 12 Monaten mit stereologischen Verfahren (siehe Methoden) auf quantitative Veränderungen der Alveolarsepten untersucht. Durch die Einbeziehung verschiedener Altersgruppen können zu der Analyse der Alveolarmorphologie auch Rückschlüsse auf mögliche emphysematöse Veränderungen oder eine Progression dieser Veränderungen der Lungen mit fortschreitendem Alter der Mäuse gezogen werden.

## **3. Material und Methoden**

---

### **3.1 SP-D Knockout Mäuse**

In der pneumologischen Forschung sind Mäuse mittlerweile ebenfalls die am häufigsten verwendeten Versuchstiere. Neben der guten Handhabbarkeit und Züchtbarkeit ist auch die geringe Größe der Lungen von Vorteil, da Dünnschnitte durch das Organ leicht komplett auf einen Objektträger passen und somit morphologische Studien erleichtern (Faffe D 2002).

Die in dieser Arbeit verwendeten SP-D (-/-) C57BL/6 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 geschieht durch homologe Rekombination. Um das SP-D Gen der Maus zu identifizieren, wird zunächst mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) eine cDNA (complementary DNA) der SP-D RNA, aus Bronchoalveolärer Lavage (BAL) erstellt. Die genomische Bibliothek einer embryonalen 129/SV Stammzelle wird 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 wird in einen Vektor eingebracht, bindet an das 5' Ende von Exon 2 auf Chromosom 14 und unterbindet die Translation von SP-D am Startcodon. Dies wird dann durch Southern Blot bestätigt, das Genkonstrukt in embryonale Stammzellen eingebracht, welche in Eizellen injiziert und in scheinchwangere Weibchen transferiert werden. Die geborenen Tiere werden erneut mit Southern Blot auf die Expressierung 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 Bedingungen gehalten und erhielten Nahrung und Wasser ad libitum.

In dieser Studie wurden in den Altersgruppen 28 Tage, 3, 6 und 12 Monate 23 männliche Mäuse, mit jeweils vier bis sieben Tieren pro Altersgruppe untersucht.

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 1:** Erfassungsnummern der Präparate

## 3.2 DNA-Purifikation und Polymerase Kettenreaktion

### 3.2.1 Materialien

Puregene® DNA Purification Kit: Gentra Systems, Minneapolis, USA

Enthält:

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

Isopropanol 100%

Ethanol 70%

Eppendorf Cups

Pipetten

Thermocycler : RoboCycler® (Stratagene, La Jolla, USA)

#### 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.

Polymerasekettenreaktions-Kit: QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Enthält: TAQ DNA Polymerase  
10 x QIAGEN PCR Puffer  
5 x Q-Solution  
25 mM MgCl<sub>2</sub>  
dNTP Mix, 10 mM pro dNTP

### 3.2.2 DNA Purifikation

Um verifizieren zu können, dass es sich bei den verwendeten Versuchstieren in dieser Studie um SP-D knockout Mäuse handelt, wurde die DNA der Tiere mit Wildtyp DNA verglichen. Hierzu wurden die DNA Fragmente von jeweils zwei Tieren pro Versuchsgruppe vervielfältigt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der Fähigkeit von Nukleinsäuren, im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe zu wandern, können so die Unterschiede der jeweiligen DNA- Fragmente von knockout- und Wildtyp-Mäusen im Vergleich dargestellt werden. Im Vorfeld wurde zunächst von jedem verwendeten Tier ein Schwanzspitzenstück zurück behalten und bei -80°C tiefgefroren. Im ersten Schritt der DNA Purifikation werden ca. 5-10 mg der tiefgefrorenen Schwanzspitzen zusammen mit 300 µl Cell Lysis Solution in ein 1,5 ml Eppendorf Cup gegeben. Dann werden 1,5 µl Proteinase K Solution hinzu gegeben, vermischt und bei 55°C über Nacht inkubiert, so dass sich das Gewebe in der Trägerflüssigkeit lösen kann. Am nächsten Tag werden 1,5 µl RNase A Solution hinzugesetzt und das Gemisch 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert.

Nach Herunterkühlung auf Raumtemperatur werden 100 µl Protein Precipitation Solution hinzugefügt. Durch Vortexen vermischen sich die verschiedenen Zusätze vollständig; im nachfolgenden Schritt wird dann die DNA von den Geweberesten getrennt. Hierzu wird das Eppendorf Cup 3 Minuten lang bei 14.000 rpm (rounds per minute) zentrifugiert, so dass sich die Gewebereste als Pellet am Boden des Cups absetzen und die gelöste DNA als Überstand abpipettiert werden kann.

Sie wird 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

wird die DNA gefällt, der Überstand wird entfernt und 300 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt um das DNA Pellet zu reinigen. Nach wiederholter Zentrifugation wird auch das Ethanol entfernt. Das Eppendorf Cup wird nun für einige Minuten auf einem absorbierenden Papier auf den Kopf gestellt, damit die enthaltene DNA vollständig trocknen kann.

Zur Hydratation wird im letzten Arbeitsschritt 50 µl DNA Hydratation Solution hinzugegeben und 1 Stunde bei 65°C inkubiert. Die erhaltene DNA Lösung mit einer Konzentration von ca. 500 µg/ml wird bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### 3.2.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion 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. Entsprechend dem nachfolgenden Schema wurden unseren Proben unter anderem drei Primer zugesetzt, 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)
DANN-Template	1,0
H <sub>2</sub> O	18,0
10x PCR Puffer	2,5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,01
10 mM dNTP Mix	0,75
Primer I (5') 10 µM	0,751
Primer II (3' WT) 10 µM	0,75
Primer III (3' KO) 10µM	0,75
TAQ-Polymerase (5U/µl)	0,25
<b>Endvolumen</b>	<b>25,75</b>

**Tabelle 2** : PCR Protokoll

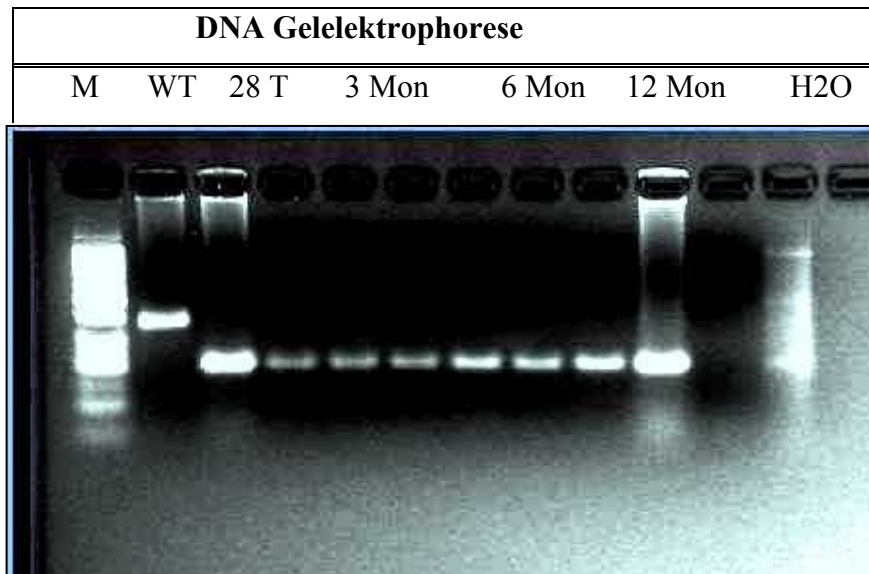
## [Material und Methoden]

Die Proben werden nun in einen Thermocycler gegeben, in dem sie einem definierten Temperaturwechsel unterliegen (siehe Tabelle 3). Erhitzen auf 94°C führt hierbei 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. Essentiell ist, dass die TAQ Polymerase so temperaturstabil ist, dass sie durch die zur Denaturierung der DNA benötigte Temperatur von 94°C nicht beeinträchtigt wird. Der Thermozyklus wird 30 Mal wiederholt, so dass die Zielsequenz zum Schluss mehr als 10<sup>6</sup> Mal amplifiziert war.

Aufgrund eines Neomycin Resistenz-Gens wird die Amplifikation der SP-D knock out DNA unweit der 3' Startsequenz gestoppt und man erhält eine DNA-Sequenz von 350 bp (Basenpaaren). Die DNA-Sequenz der Wildtyp Mäuse enthält hingegen 520 bp.

Thermocycler- Programm (°C)	Zeit (min)	Effekt	Wiederholungen
94			
9	1	DNA-Denaturierung	30 Mal
60	1	Anlagerung der Primer	
72	1	Transkription	
72	5		
4	Unbegrenzt		

**Tabelle 3:** Thermocycler Zyklen



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

### 3.2.4 Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladungseigenschaften wandern Nukleinsäuren, wie also zum Beispiel DNA-Fragmente, im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist hierbei abhängig von der Größe der Nukleinsäuren, der angelegten Stromspannung und der Konzentration des verwendeten Gels. Es wurde ein 2,5%iges Agarose-Gel verwendet. Die DNA-Proben werden mit einem Farbindikator vermischt, jeweils 12  $\mu$ l in eine Tasche des Agarose-Gels gegeben und mit einer Spannung von 100 V/cm<sup>2</sup> Gelfläche elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss kann die Größe der einzelnen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit unter UV Licht bestimmt werden.

### 3.3 Materialgewinnung und Fixierung

#### 3.3.1 Chemikalien und Ansätze der verwendeten Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern in höchstmöglicher Qualität bezogen:

Merck AG (Darmstadt, Deutschland) Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)  
Heraeus Kulzer GmbH (Wehrheim, Deutschland) Carl Roth GmbH (Karlsruhe,  
Deutschland) Chempur GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Serva Electrophoresis  
(Heidelberg, Deutschland) Agar Scientific LTD (Stansted, UK)

10 % Paraformaldehydlösung (PFA)

10 g Paraformaldehyd (Merck)

100ml Ampuwa (Aqua ad iniectabilia Braun)

→ zusammen geben, zweimal auf einer Heizplatte mit Magnetrührer auf  
maximal 60°C erwärmen und mit 1 N Natronlauge (NaOH) klären

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

1000 ml Ampuwa (Aqua ad iniectabilia Braun)

42,8g Di-Methylarinsäure-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+ 1 Teil Ampuwa)

Fixans

10 ml 10 % PFA (EV 1%)

4ml 25% Glutaraldehyd (EV 1%) (Serva)

50 ml 0,2 M Na-CP( EV 0,1 M)

→ auf 100 ml Ampuwa auffüllen, der ph-Wert sollte zwischen 7,35 und 7,4 liegen  
und wird meistens mit NaOH eingestellt

2% Agar-Agar

2g Agar-Agar-Granulat (Merck)

100 ml Leitungswasser

→ zusammen geben und einmal in der Mikrowelle bei 450 Watt aufkochen

1% Paraformaldehydlösung

1 g Paraformaldehyd (Merck)

100 ml Ampuwa (Aqua ad iniectabilia 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 <sub>4</sub> ) (ChemPur) Aqua bidest
3%	Acidum tannicum (Tannin) Uranylacetat (Agar Scientific)
100%	Aceton (Merck)
90%	Aceton
70%	Aceton

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

Härter I und Härter II (Kulzer)

### 3.3.2 Materialgewinnung und Instillierung der Mäuselungen

Zunächst wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Ihr Körpergewicht wurde bestimmt und anschließend wurden sie auf dem Rücken liegend auf der Arbeitsfläche fixiert. Im nächsten Schritt wurde der Thorax mit einer Schere eröffnet und die Trachea frei präpariert. In der Nähe des Larynx wurde ein Loch geschnitten, durch das eine Kanüle eingeführt wurde. Diese wurde mit einem Seidenfaden fixiert. Anschließend wurde das Diaphragma eingeschnitten, so dass die Lungen kollabierten. Der Thorax wurde vollständig mit einer Olivenschere eröffnet und die beiden Hälften auf der Arbeitsfläche fixiert.

Nun folgte die Freipräparation der Lungenflügel. Zunächst wurde der apikal liegende Thymus stumpf entfernt, anschließend das Bindegewebe zwischen Lunge und der Thoraxwand. Auch der Ösophagus wurde durchtrennt, so dass die Lunge nun durch einen Schnitt durch die Trachea oberhalb der eingeführten Kanüle vollständig aus der Pleurahöhle gelöst werden konnte. Im Anschluss erfolgte die Instillation über die Kanüle mit Fixans unter einem Druck von 20cmH<sub>2</sub>O über 20 Minuten.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Lunge unterhalb der Kanüle abgebunden, oberhalb dieser Ligatur abgetrennt und in ein Gläschen mit Fixans eingelegt und bei 4°C im Kühlschrank für 24 Stunden gelagert.

Die Fixierung durch das PFA erfolgt durch eine Vernetzung von Gewebsproteinen durch Ausbildung von Methylenbrücken.



**Abbildung 9:** Instillationsapparat

### 3.3.3 Volumenbestimmung und Einbettung

Im Anschluss an die 24 Stunden in dem 4 % PFA wurden zunächst die Lungenflügel voneinander getrennt. Dies geschah hilusnah mit einer Schere, bei der rechten Lungenhälfte wurden das bislang verbliebene Herz und der rechte Hauptbronchus ebenfalls hilusnah abgetrennt. Blutkoagel, Bindegewebs- und Pleurareste wurden von den Lungenflügeln entfernt. Um absolute Strukturparameter quantifizieren zu können, muss das Volumen des zu untersuchenden Organs bekannt sein. Hierzu wurde die Volumenbestimmung nach dem archimedischen Prinzip durchgeführt. 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 die Gewichtszunahme der Flüssigkeit in dem Gefäß dem durch den Lungenflügel verdrängten Volumen ( $\text{mg} = \text{ml}$ ) (Scherle W1970).

### 3.3.4 Probengewinnung

Wesentliche Voraussetzung für die Repräsentativität der stereologischen Auswertung ist die repräsentative Probenauswahl (engl. Sampling). Diese hat zwei Säulen: das „systematic uniform random sampling“ (SURS) und das „systematic quadrats subsampling“ (SQS) Verfahren

Bei quantitativ-histologischen Studien der Lunge hat sich zur Stichprobennahme das Verfahren des Systematic Uniform Random Sampling (SURS) durchgesetzt (Ochs, 2006). Prinzip des SURS ist es, die Probenauswahl aus einer Menge oder einem Gewebe an einem zufallsbestimmten Punkt zu beginnen und von dort entweder nach einem festgelegten Raster (systematisch) weitere Proben auszuwählen. In diesem Fall wurde beim Schneiden der in Agar-Agar eingelegten Lungen zunächst ein nach Zufallsprinzipien bestimmter Startpunkt gewählt und im Anschluss per Würfel entschieden, welche Schnitte zur elektronenmikroskopischen und welche zur lichtmikroskopischen Untersuchung bestimmt waren. Mit diesem Verfahren wird sichergestellt, dass für jeglichen Bestandteil der Lunge dieselbe Wahrscheinlichkeit besteht in die Analyse einzugehen und alle Organanteile mit gleicher Wahrscheinlichkeit repräsentiert werden (Nyengaard JR 1999, Ochs M 2006).

Nach der Volumenbestimmung wurde jede Lunge mit der lateralen Lungenseite nach unten in ein Becherglas mit warmem, flüssigen 2% Agar-Agar transferiert. Die Härtingszeit betrug etwa 60 bis 90 Minuten im Kühlschrank. Anschließend wurden die agar-eingebetteten Lungenhälften aus dem Becherglas entnommen und mit Hilfe einer Schneidekammer in der Transversalebene in 2 mm dicke Scheiben geschnitten, wobei zwischen 8 und 10 Transversalschnitte entstanden. Der Beginn der ersten Scheibe wurde willkürlich festgelegt. Nach der Entfernung des überstehenden Agar-Agar wurde nach dem Prinzip des SURS per Würfel entschieden, welche Schnitte zur elektronenmikroskopischen und welche zur lichtmikroskopischen Untersuchung bestimmt waren. Für das Lichtmikroskop konnten ganze Transversalschnitte eingebettet werden, die wesentlich kleineren TEM-Proben mit nur 3 mm Kantenlänge wurden mit Hilfe eines über die Schnitte gelegten Punkterasters (11x11 Punkte mit 10mm Abstand) auf einer transparenten Folie gewonnen. An jedem Punkt wurde nun ein 3mm großes Geweblöckchen herausgeschnitten, mit dem Rasterpunkt in der jeweiligen unteren linken Ecke. So erhielt man von jeder Lunge 8-10 Blöckchen für die TEM.

#### **3.3.4.1 Aufarbeitung der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie**

Bei der TEM werden zur Fixierung und Kontrastierung Schwermetallatome, wie z.B. Osmium und Uran, enthaltende Lösungen verwendet. Sie wirken kontrastierend und fixierend, da sie die Extraktion von z.B. Lipiden während der Entwässerung und Einbettung verhindern (Fehrenbach H und Ochs 1998). Voraussetzung ist dies für den

Erhalt der Ultrastruktur, z.B. Surfactant, das durch die Verwendung von Uranylacetat erhalten bleibt.

Die Aufarbeitung der Proben für das TEM erfolgte nach dem in der Tabelle 1 dargestellten Schema.

Die dort beschriebene Nachfixierung mit 1%igem Osmiumtetroxid, die Blockkontrastierung mit halbgesättigtem Uranylacetat zu Stabilisierung der Phospholipide und die Entwässerung und Einbettung erfolgte nach Fehrenbach und Ochs (1998). Die Blockkontrastierung mit 4%igem wässrigem Tannin (pH 7) erfolgte über Nacht. Tannin dient zur Kontrastverstärkung durch Anlagerung von Gerbstoffen an elastische Fasern.

Die Gewebeblöcke für das TEM wurden in Araldit eingebettet und angetrimmt (TM 60, Reichert, Wien, Österreich). Anschließend wurden die Proben zur Polymerisation und damit Verfestigung des Araldits auf +60°C erhitzt. Diese wurden nach Richardson gefärbt. Lichtmikroskopisch wurden geeignete Lokalisationen mit viel Lungenparenchym für die elektronenmikroskopische Auswertung identifiziert, von denen dann Ultradünnschnitte mit einer Dicke von circa 90nm angefertigt wurden. Danach wurden die Schnitte mit einem Ultratrainer (Leica GmbH, Bensheim, Deutschland) mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert.

Die Ultradünnschnitte wurden auf Nickelnetze (Durchmesser 3,05mm 300 Mesh) aufgebracht, die dann am Transmissionselektronenmikroskop analysiert.

#### Aufarbeitung der Proben für das TEM

	<b>Arbeitsvorgang</b>	<b>Typ</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Anzahl und Dauer</b>
<b>1.</b>	<b>Waschen</b>	<b>0,1 M Na-Cacodylat</b>	<b>RT</b>	<b>4x5 Minuten</b>
<b>2.</b>	<b>Postfixierung</b>	<b>1% OsO<sub>4</sub> in 0,1 M Na-Cacodylat gepuffert</b>	<b>RT</b>	<b>1x2 Stunden</b>
<b>3.</b>	<b>Waschen</b>	<b>In 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer Aqua bidest (etwa 1 h lagern)</b>	<b>RT</b>	<b>4x5 Minuten 2x5 Minuten</b>
<b>4.</b>	<b>Blockkontrastierung über Nacht (+4°C)</b>	<b>in 3 % wässrig, Tannin ph 7,0</b>	<b>+4°C</b>	<b>über Nacht</b>

5.	Waschen	Aqua bidest (1 h lagern)	RT	4x5 Minuten
6.	Blockkontrastierung über Nacht	Halbgesättigtes wässriges Uranylacetat	+ 4°C	über Nacht
7.	Waschen	Aqua bidest	RT	4x5 Minuten
8.	Entwässerung  Präinfiltration	Steigende Alkoholreihe 70% Ethanol 90% Ethanol 100% Ethanol Aceton/Araldit 1+1 Evtl. entgasen	RT     RT	2x10 Minuten 2x10 Minuten 2x10 Minuten 1x1 Stunde Über Nacht
9.	Infiltration	in Araldit	RT	über Nacht
10.	Polymerisation	in Araldit	60°	3 Tage

**Tabelle 4: Aufarbeitung der Proben für das TEM**

### 3.4 Experimentelles Vorgehen

#### 3.4.1 TEM

Die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden am TEM durchgeführt. (LEO 900, Zeiss, Oberkochen), das mit einer Planfilmkamera ausgestattet ist.

Die Darstellung erfolgte bei 4400facher Vergrößerung am Elektronenmikroskop und einer 60632fachen Vergrößerung am Leuchtmonitor.

#### 3.4.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 23 männliche Mäuse verwendet. Die Versuchstiere wurden nach dem Alter in 4 Gruppen eingeteilt. Die 28 Tage alten, die 3 Monate, 6 Monate und 12 Monate alten Mäuse, mit jeweils fünf bis sieben Tieren pro Altersgruppe.

### 3.4.3 Stereologische Verfahren

Um die Veränderungen der untersuchten Organstruktur im Verlauf der Zeit nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu beschreiben eignet sich ein stereologisches Verfahren. Die Organstruktur ist jedoch sehr groß, der elektronenmikroskopische Ausschnitt sehr klein. Daher müssen die Daten aus sehr kleinen Proben und Aufnahmen ermittelt werden. Das Verfahren der Wahl ist dazu die Stereologie:

Die Stereologie gehört zur stochastischen Geometrie und dient dazu, strukturelle Veränderungen von Zellen oder deren Organellen zu quantifizieren.

Sie erfasst mit Hilfe geometrischer Mittel, z.B. Raster mit Testpunkten, Testlinien etc. Strukturen. Zu ihr gehören eine Anzahl recht einfacher Methoden zur unvoreingenommenen und repräsentativen Schätzung nahezu aller morphometrischer Parameter (Weibel 1990, 1997 Weibel und Cruz Orive)

Der Schwerpunkt meiner Untersuchungen bildeten die Veränderungen in der Gewebezusammensetzung der Alveolarsepten der SP-D-knock out Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu erfassen. Dafür sollten die Volumina der einzelnen Gewebekomponenten bestimmt werden: Typ I und Typ II Pneumozyten, Endothelzellen, Kapillarlumen, Interstitielle Räume, Kollagen, Elastin und Fibrozyten.

Da es sich bei den Präparaten um zweidimensionale Schnitte handelt, wurde eine stereologische Methoden verwendet, die es erlaubt, anhand von Punkterastern Volumen und Oberflächen an zweidimensionalen Schnitten zu bestimmen. Wichtig ist hierbei, dass es sich bei dem Verfahren um ein systematisches, zufälliges und für das ganze Organ repräsentatives handelt. Es wurde hierzu das Prinzip des systematic random samplin angewendet.

Wesentliche Voraussetzung zur Vermeidung systematischer Fehler (Bias) ist eine Probenentnahme, die allen Bereichen des Untersuchungsmateriales die gleiche Chance gibt, für die Auswertung ausgewählt zu werden. (Lucocq 1993, Bolender 1993). Das SURS gewährleistet dies.

So umfasste die Auswahl bei dieser Untersuchung jeweils 5-6 Tiere pro Versuchsgruppe, eingeteilt nach dem Alter der Mäuse, deren Lungen jeweils in 5 Blöcke eingeteilt wurde, aus denen fünf Schnitte entstanden. Bei jedem dieser Präparate ist durch ein Netz zur Stabilisierung des Gewebes eine Kästcheneinteilung vorgegeben. Um auch bei der Auswahl der Testfelder innerhalb eines Schnittes eine zufällige

Verteilung zu gewährleisten wurde auch hier nach dem SURS Verfahren begonnen, und dann jedes zweite dieser, durch die Kästchen vorgegebenen Felder in die Untersuchung aufgenommen. Je nach Größe des Schnittes kann die Zahl der Testfelder also variieren. Durchschnittlich wurden etwa 100 Testfelder pro Schnitt ausgewertet.

Punkte auf dem Vergrößerungsbildschirm ergaben nun die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der Gewebearart, indem die Anzahl der Punkte der jeweils unter dem Raster liegenden Gewebearart gezählt wurde.

Das zugrunde liegende Prinzip ist hierbei, dass, wenn eine bestimmte Zahl an Punkten zufällig in einem Referenzraum, in diesem Fall das Gewebe des Alveolarseptums, verteilt ist, das Verhältnis der Punkte mit geometrischer Wahrscheinlichkeit dem Verhältnis der Volumina entspricht. (Weibel 1990)

### 3.4.3.1 Auswertungsschema für die stereologische Untersuchung

Sampling design	
Organe	5- 6 pro Gruppe
Blöckchen	5-6 pro Organ
Testfelder	ca. 100 /Blöckchen

**Tabelle 5:** Auswertungsschema

#### 3.4.3.1.1 Untersuchte Parameter bei der stereologischen Auswertung

Alveolarepithelzellen Typ I und II

Endothel,

Kapillarlumen,

Fibrozyten,

Elastin,

Kollagen,

Interstitium,

→ absolute Werte, relative Werte, Volumina

### 3.4.3.1.2 Formeln zur Ermittlung der stereologischen Parameter

$\sum P$ total	Summe der gezählten Punkte jeder Gewebeat
% Gewebeat	$\sum P$ Zelltyp/ $\sum P$ total
V Sept	$V(\text{Sept}) = V_v(\text{Sept, Par}) \times V_v(\text{Par, Lunge}) \times V(\text{Lunge})$
Vol des Gewebetyps in mm <sup>3</sup>	% Gewebeat x V Sept

**Tabelle 6:** Formeln zur Ermittlung der stereologischen Parameter

### 3.4.4 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die transmissionselektronenmikroskopische Auswertung wurde an einem Zeiss EM 900 vorgenommen. Bei dieser Auswertung wurden die relativen Volumina der zellulären bzw. extrazellulären Komponenten der alveolären Septen bestimmt. Im Detail waren dies Alveolarepithel, Kapillarendothel und Interstitium gesamt. Innerhalb des Interstitiums wurden die relativen Volumina der extrazellulären Fasern Kollagen und Elastin gesondert bestimmt. Zur quantitativen Auswertung wurden Bildausschnitte aus jedem Präparat herangezogen. Die Netzstruktur der Objektträger bot eine einfache Möglichkeit, Bildausschnitte in fest definierten Abständen auszuwählen. Fiel auf einen so ausgewählten Ausschnitt nicht parenchymatöses Gewebe, wurde dieser übersprungen. Am Mikroskop wurde eine 4400-fache Ausgangsvergrößerung gewählt. Die Endvergrößerung auf dem Monitor wurde mit Hilfe eines Kalibrierungsrasters auf 60632x bestimmt. Auf diesen Monitor wurde ein Punkteraster der Größe A3 mit 10x14 Punkten geklebt. Der Punkteabstand betrug senkrecht sowie waagrecht jeweils 29 mm, dies entspricht 0,48 µm im Originalpräparat. Nun konnte bestimmt werden, wie viele Punkte auf die einzelnen Komponenten der Alveolarsepten entfallen und daraus die relativen Volumina (Volumendichten,  $V_v$ ) berechnet werden.

### 3.4.5 Berechnung der Volumina der septalen Strukturen

Die Volumina der einzelnen Strukturen innerhalb der Alveolarsepten wurden aus den zuvor ermittelten Volumina am Lichtmikroskop und am Elektronenmikroskop ausgezählten Punktmengen mit folgenden Formeln berechnet:

Berechnung des septalen Volumens:

Das Gesamtvolumen der Alveolarsepten  $V(\text{Sept})$  ergibt sich aus dem Produkt der relativen Volumina der Alveolarsepten  $V_v(\text{Sept}, \text{Par})$  sowie des gesamten Lungenparenchyms  $V_v(\text{Par}, \text{Lunge})$  mit dem absoluten Volumen der kompletten Lunge  $V(\text{Lunge})$ . Die Volumendichten errechnen sich aus den am Monitor ausgezählten Testpunkten, die auf das zu untersuchende Gewebe fallen.  $V_v(\text{Sept}, \text{Par})$  ist der Quotient aus den auf die Septen entfallenden Punkten  $P(\text{Sept})_{\text{LiMi}}$  und den Punkten, die über Lungenparenchym jeglicher Art liegen  $P(\text{Par})_{\text{LiMi}}$ . Der Zusatz LiMi kennzeichnet das zugrundeliegende lichtmikroskopische Verfahren.

$$\begin{aligned} V(\text{Sept}) &= V_v(\text{Sept}, \text{Par}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lunge}) \times V(\text{Lunge}) \\ &= [P(\text{Sept})_{\text{LiMi}} : P(\text{Par})_{\text{LiMi}}] \times [P(\text{Par})_{\text{LiMi}} : P(\text{Lunge})_{\text{LiMi}}] \times V(\text{Lunge}) \end{aligned}$$

Berechnung der Volumina von Epithel, Endothel und septalem Interstitium:

Das Gesamtvolumen der Epithelzellen  $V(\text{Epi})$  wird als Produkt aus dem relativen Anteil des Epithels am Septenvolumen,  $V_v(\text{Epi}, \text{Sept})$ , multipliziert mit dem absoluten septalen Volumen,  $V(\text{Sept})$ , ermittelt.  $V_v(\text{Epi}, \text{Sept})$  wurde wiederum über Punktauszählung bestimmt, jedoch am Elektronenmikroskop, daher der Zusatz EIMi.  $P(\text{Sept})$  steht hierbei für alle auf ein Alveolarseptum fallenden Punkte und  $P(\text{Epi})$  für die Punkte auf Epithelzellen.

$$\begin{aligned} V(\text{Epi}) &= V_v(\text{Epi}, \text{Sept}) \times V_v(\text{Sept}, \text{Par}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lunge}) \times V(\text{Lunge}) \\ &= [P(\text{Epi})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times [P(\text{Sept})_{\text{LiMi}} : P(\text{Par})_{\text{LiMi}}] \times \\ & \quad [P(\text{Par})_{\text{LiMi}} : P(\text{Lunge})_{\text{LiMi}}] \times V(\text{Lunge}) \\ &= [P(\text{Epi})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times V(\text{Sept}) \end{aligned}$$

Die Bestimmung des endothelialen Volumens  $V(\text{Endo})$  und des interstitiellen Volumens  $V(\text{Int})$  erfolgte analog.

Berechnung der Volumina von Kollagen und Elastin:

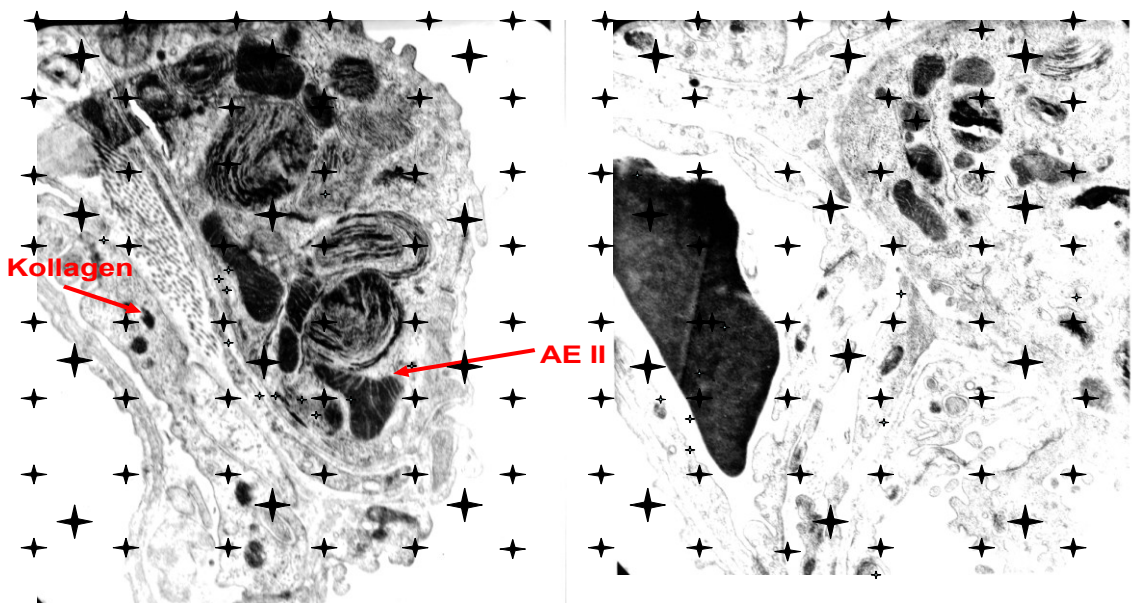
Kollagen ist ein Bestandteil des interstitiellen Raumes. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung des Kollagenvolumens  $V(\text{Koll})$  das Volumen des Interstitiums mit dem relativen Kollagenvolumen  $V_v(\text{Koll}, \text{Int})$  multipliziert. Das Volumen des Interstitiums ist das Produkt aus dessen relativem Volumen  $V_v(\text{Int}, \text{Sept})$  bezogen auf die Alveolarsepten und dem Gesamtvolumen der Alveolarsepten.  $V_v(\text{Koll}, \text{Int})$  wurde

ebenfalls über Punktzählung ermittelt und ergab sich aus dem Quotienten der auf Kollagen entfallenden Punkte  $P(\text{Koll})$  und den auf das gesamte Interstitium entfallenden Punkte  $P(\text{Int})$ .

$$\begin{aligned}
 V(\text{Koll}) &= V_v(\text{Koll}, \text{Int}) \times V_v(\text{Int}, \text{Sept}) \times V_v(\text{Sept}, \text{Par}) \times V_v(\text{Par}, \text{Lunge}) \times \\
 &V(\text{Lunge}) \\
 &= [P(\text{Koll})_{\text{EIMi}} : P(\text{Int})_{\text{EIMi}}] \times [P(\text{Int})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times [P(\text{Sept})_{\text{LIMi}} : \\
 &P(\text{Par})_{\text{LIMi}}] \times V(\text{Lunge}) \\
 &= P(\text{Koll})_{\text{EIMi}} : P(\text{Int})_{\text{EIMi}}] \times [P(\text{Int})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times V(\text{Sept}) \\
 &= [P(\text{Koll})_{\text{EIMi}} : P(\text{Sept})_{\text{EIMi}}] \times V(\text{Sept})
 \end{aligned}$$

Das Elastinvolumen  $V(\text{Elas})$  wurde auf die gleiche Weise berechnet. Auch hier gilt die Voraussetzung, dass das Elastin ein Bestandteil des interstitiellen Raumes ist. Von den elektronenmikroskopischen Präparaten wurden außerdem elektronenoptische Aufnahmen angefertigt, deren Endvergrößerung sich mit Hilfe des Kalibrierungsrasters auf 9287-fach bei einer 4400-fachen Ausgangsvergrößerung bestimmen ließ.

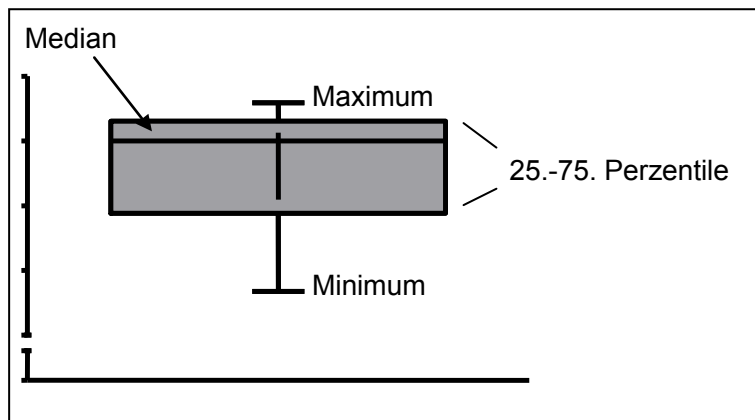
### 3.4.6 Beispielbilder



**Abbildung 10:** Zu sehen ist ein Präparatausschnitt eines Alveolareseptums einer SP-D ko Maus am Elektronenmikroskop. Diese Sicht liegt am Vergrößerungsbildschirm vor, an dem die Punkte, die über einer Gewebeart liegen, in diesem Testfeld gezählt wurden. Das Verhältnis der Punkte, die auf eine Struktur fallen, zur Gesamtzahl der Punkte auf dem Referenzraum ergibt die Volumendichte, oder den prozentualen Anteil einer Struktur an ihrem Referenzraum.

### 3.4.7 Statistik und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Untersuchung der erhobenen Daten erfolgte durch das Software Programm GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) Sie werden im Ergebnisteil anhand ihrer arithmetischen Mittelwerte (MW) sowie der mittleren Standardabweichung ( $\pm$  Stdabw) miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde innerhalb des 95% Konfidenzintervalls mit einem p-Wert  $< 0,05$  bemessen. Die Darstellung der Ergebnisse in Form von „Boxes and Whiskers“ zeigt den Median und beinhaltet die 25.-75. Perzentile der Werteverteilung sowie die minimal und maximal erreichten Werte.



**Abbildung 11:** Beispiel der Ergebnisdarstellung mit Erläuterung der Darstellungsart

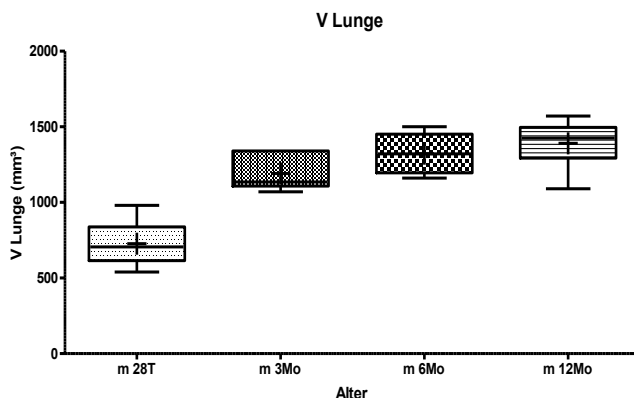
## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der stereologischen Auswertung sind im Folgenden zusammengefasst dargestellt. Zunächst erfolgen eine qualitative Beschreibung, eine Dokumentation mit Bildmaterial und eine tabellarische und grafische Zusammenfassung der einzelnen Gewebeparameter je Altersgruppe.

Das eingefügte Bildmaterial sind Fotos der ausgewerteten Präparate, die jeweils den beschriebenen Gewebeparameter darstellen.

### 4.1 Körpergewicht der Versuchsmäuse

Die Versuchsmäuse zeigten im Versuchsverlauf eine deutliche Gewichtszunahme. Das Gewicht der Tiere betrug im Alter von 28 Tagen  $17,2 \pm 1,75$  g (m), das Körpergewicht der 12 Monate alten Tiere betrug  $47,0 \pm 3,48$  g ( $p < 0,05$ ), und nahm damit signifikant zu. Aus den Untersuchungen vor der Präparation zeigte sich, dass sich das Lungenvolumen im Versuchsverlauf beinahe verdoppelte. Es nahm von  $727 \pm 150$  mm<sup>3</sup> auf  $1390 \pm 163$  mm<sup>3</sup> zu. Im direkten Vergleich der gleichaltrigen Tiere zeigten sich in keiner Altersgruppe signifikante Unterschiede. Eine signifikante Zunahme des Lungenvolumens war jeweils nur zwischen 28 Tagen und 3 Monaten festzustellen ( $p < 0,05$ ), danach erhöhte es sich nur noch geringfügig.

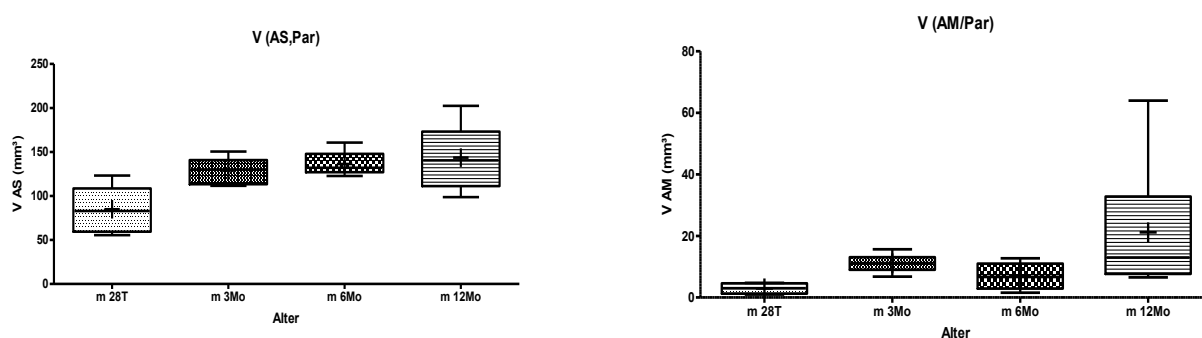


**Abbildung 12:** Lungenvolumina der untersuchten Altersgruppen

Die Volumenberechnungen in der durchgeführten Untersuchung der einzelnen Parameter beziehen die jeweiligen Lungenvolumina mit ein. Bekannt waren die relativen Anteile von Parenchym und die Anteile der Septen am Parenchym, aus der Doktorarbeit von Sarah Liefländer 2008 so dass sich die Volumina der Septen aus den Lungenvolumina berechnen ließen. Die dargestellten Grafiken sind aus der Dissertation von Sarah Liefländer entnommen, die eine lichtmikroskopische Untersuchung der SP-D

Mäuse durchgeführt hat. In der Diskussion wird Bezug auf ihre Ergebnisse zum Volumenanteil der Alveolarsepten und der Alveolarmakrophagen genommen, daher sind die Grafen hier eingefügt,

Die relativen Anteile der untersuchten Gewebetypen am Septum ermöglichte dann die Berechnung ihrer Volumina. Die Formeln hierzu sind in Kapitel 2 zu finden.



**Abbildung 13a** Volumen( $\text{mm}^3$ ) der Alveolarsepten in Bezug auf Alter  
**13b** Volumen ( $\text{mm}^3$ ) der Makrophagen

#### 4.2 Prozentuale Gewebeanteile der einzelnen Parameter, Mittelwerte und Standardabweichung

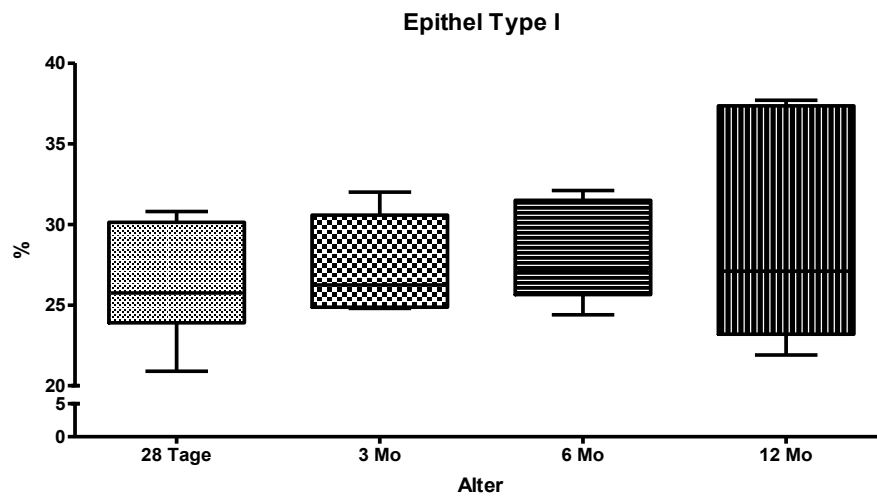
Zur Bewertung der Veränderungen der einzelnen Gewebeanteile wurde zunächst deren relative Volumenanteile am Alveolarseptum ermittelt. Die relativen Volumenanteile von Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II, Endothel zeigten im Verlauf der Zeit im Vergleich der Altersgruppen und zwischen den gleichaltrigen Männchen keine signifikanten Veränderungen.

Lediglich bei der Betrachtung der relativen Werte der Fibrozyten und der extrazellulären Matrix wurden Unterschiede deutlich. Der durchschnittliche Wert der Fibrozyten bei den 28 Tage alten Mäuse lag bei  $27,8 \pm 3,7 \%$ , und fiel dann ab bis auf  $20,7 \pm 2,7 \%$  bei der ältesten Versuchsgruppe. Der Anteil an Elastin, Kollagen und Interstitium unterlag ebenfalls Veränderungen, wobei die Elastinwerte eine sinkende Tendenz zeigten, die des Kollagens sich jedoch leicht steigerten.

Für die Anteile von Kapillarlumen ergaben sich zwischen keiner der Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede, allerdings sank der Anteil an septalem Gewebe im Verlauf leicht.

#### 4.2.1 Alveolarepithelzellen Typ I

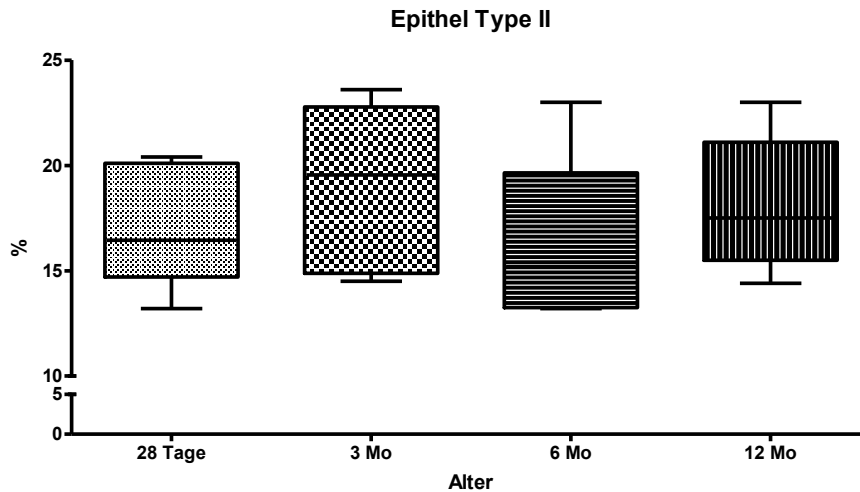
In zunehmendem Alter ist eine leichte Zunahme des prozentualen Anteiles der Epithel Typ I Zellen zu beobachten. Dieser liegt im Alter von 28 Tagen bei einem Mittelwert von 26,3 Prozent und steigt weiter an bis auf einen Wert von 29,6 Prozent. Die ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 14:** prozentualer Anteil der Alveolarepithelzellen Typ I in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.2 Alveolarepithelzellen Typ II

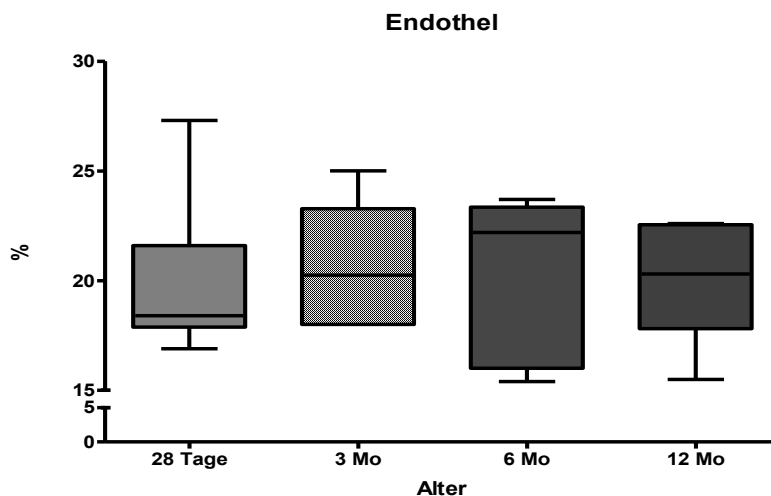
Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen bei dem prozentualen Anteil der Typ II Zellen an den Alveolaresepten.



**Abbildung 15:** prozentualer Anteil der Alveolarepithelzellen Typ II in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.3 Kapillarendothel

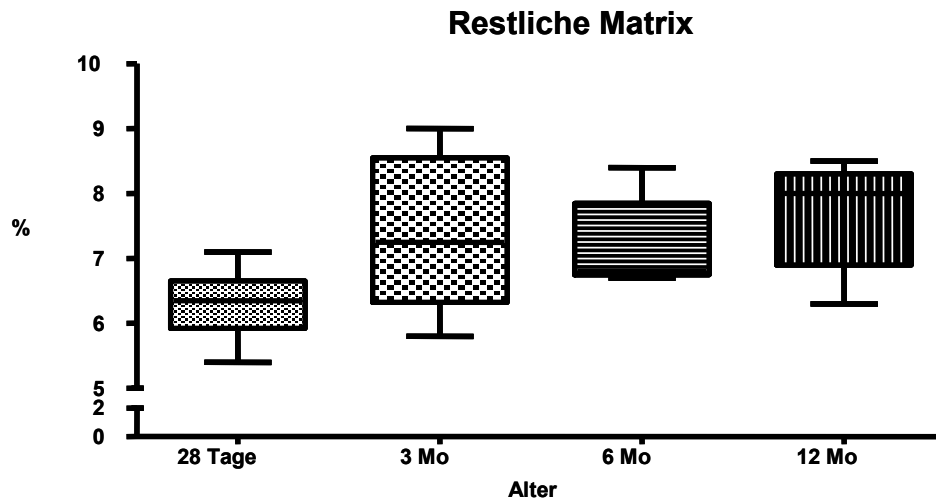
Die prozentualen Anteile des Endothels am Alveolareseptum zeigen keine wesentlichen Veränderungen im Verlauf der Zeit.



**Abbildung 16:** prozentualer Anteil der Endothelzellen in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.4 Restliche Matrix

Es zeigt sich insgesamt ein signifikanter Anstieg zwischen der Versuchsgruppe 28 Tage und 12 Monate ( $p < 0,05$ ), die restliche Matrix liegt im Alter von 28 Tagen bei 6,3% im Alter von 12 Monaten bei 7,6%.

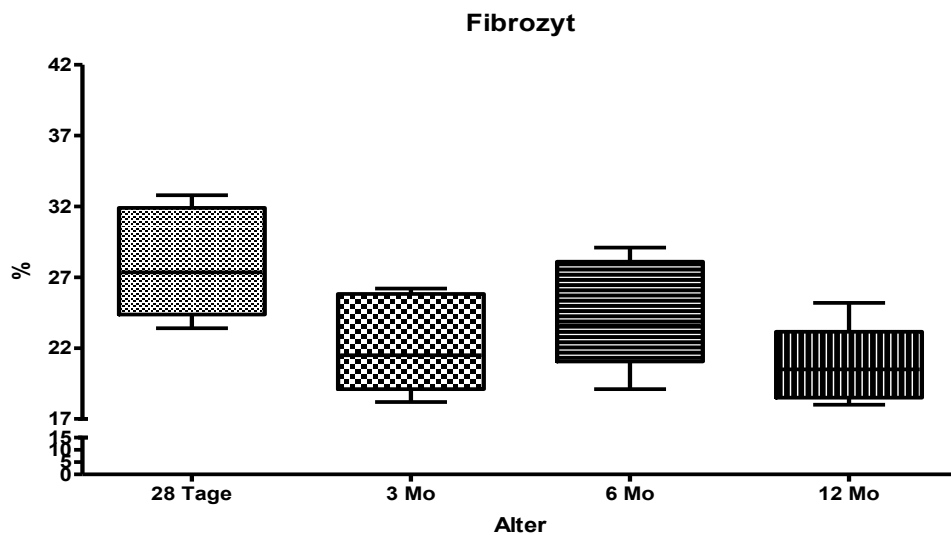


**Abbildung17:** prozentualer Anteil der restlichen Matrix in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.5 Fibrozyten

Der relative Anteil der Fibrozyten zeigt im Lauf der Zeit einen sehr signifikanten Abfall, dieser liegt bei etwa 7 % zwischen der jüngsten Versuchgruppe mit einem Fibrozytenanteil von 27,8% und der 12 Monate alten Versuchgruppe, mit einem Anteil von 20,7 % ( $p=0,004$ ).

Auch die 3 Monate alten Mäuse liegen mit etwa 5% Fibrozytenanteil am Septumparenchym signifikant unter dem der jüngsten Gruppe ( $p=0,016$ ) jedoch auch etwa 2 % unter dem der nächstälteren Versuchsgruppe von 6 Monaten. Insgesamt ist der Abfall des Fibrozytenanteiles signifikant.



**Abbildung 18:** prozentualer Anteil der Fibrozyten in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.6 Elastin

Der relative Parenchymanteil von Elastin im Lauf der Zeit hat eine fallende Tendenz von etwa 0,3 %. Dies ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

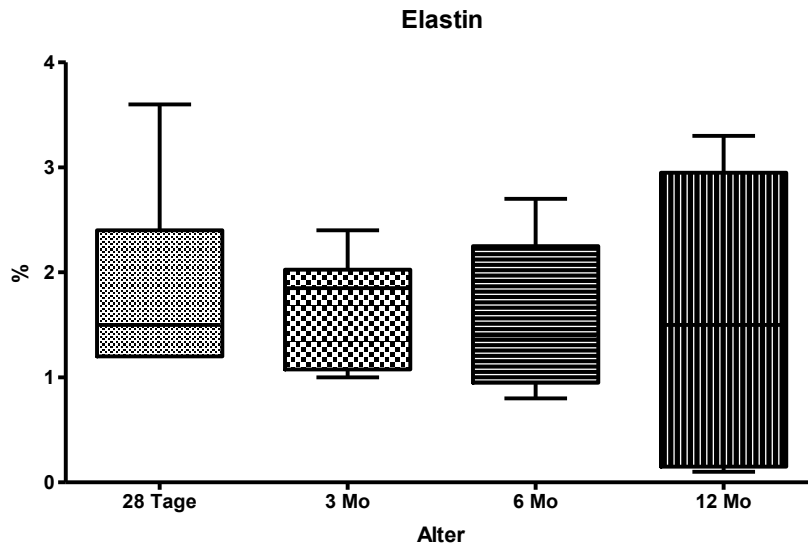


Abbildung 19: prozentualer Anteil des Elastin in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.7 Kollagen

Der relative Kollagengehalt der Alveolarsepten zeigt insgesamt eine signifikante Zunahme, ( $p = 0,048$ ) zwischen der 28 Tage alten Gruppe und der 12 Monate alten Gruppe; zwischen den einzelnen Gruppen ist der Anstieg nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

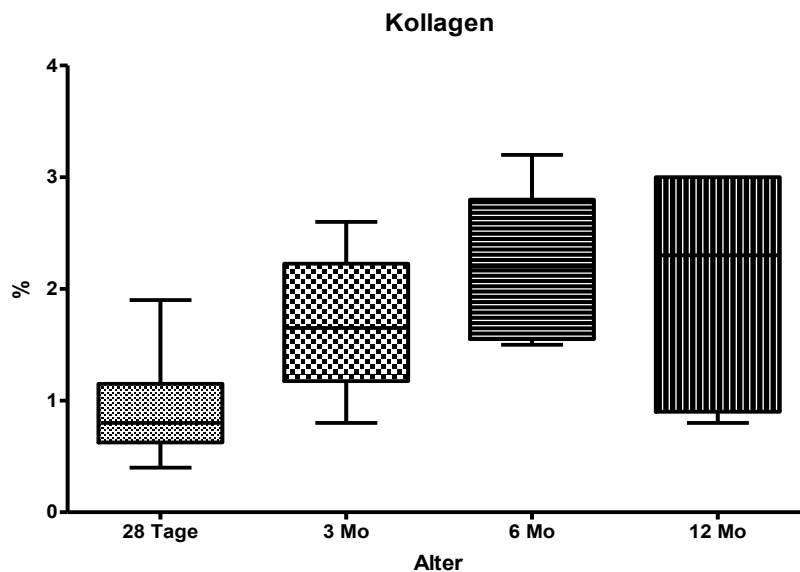


Abbildung 20: prozentualer Anteil des Kollagen in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.8 Kapillarlumen

Das Kapillarlumen wurde aus der Berechnung der Volumina herausgenommen, da es als Lumen nicht zum Lungenparenchym gezählt wird. Beim Punktezählverfahren wurde es jedoch mit ausgerechnet, die Ergebnisse sind hier der Vollständigkeit wegen aufgeführt.

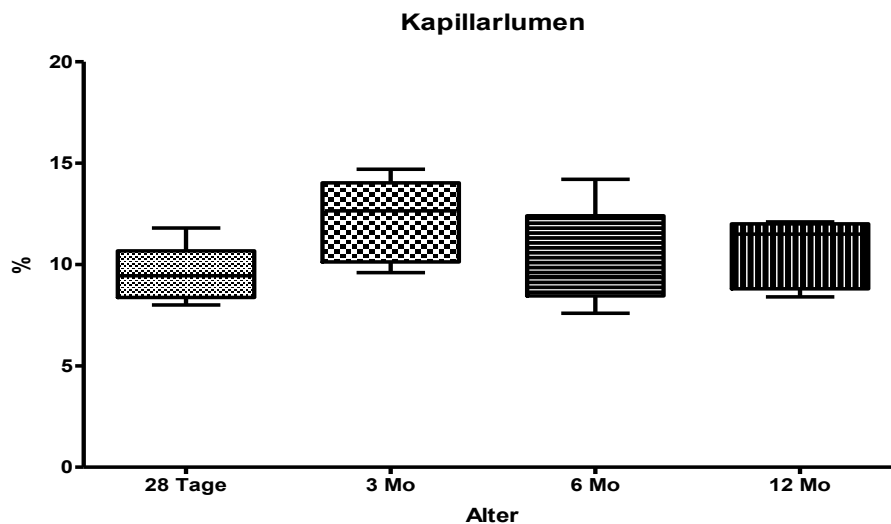


Abbildung 21: prozentualer Anteil des Kapillarlumen in Abhängigkeit vom Lebensalter

#### 4.2.9 Kollagen/ Elastin

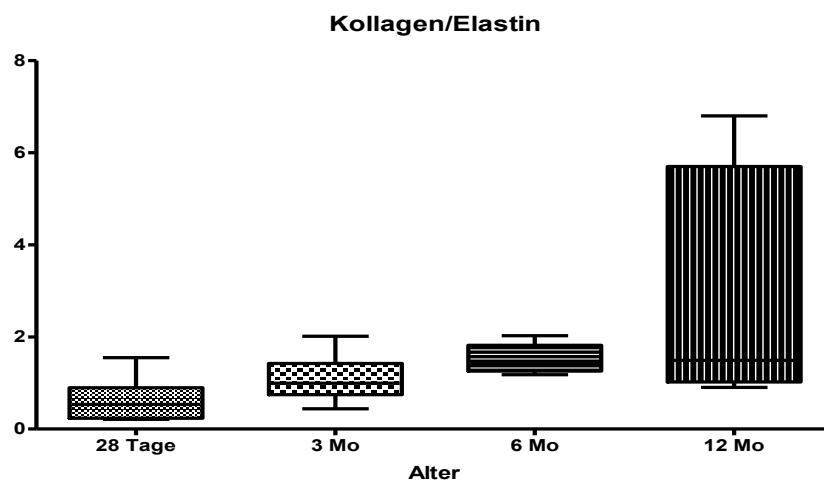


Abbildung 22: Verhältnis Kollagen/Elastin prozentualer Anteil in Abhängigkeit vom Lebensalter

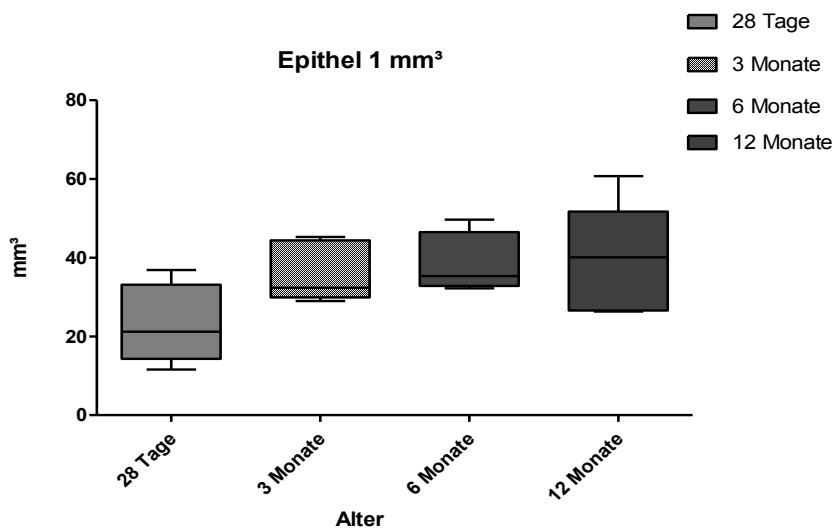
Der Anteil von Kollagen zu Elastin ist interessant für die spätere Auswertung, um sehen zu können, in welchem Verhältnis zueinander sich eventuelle Veränderungen der extrazellulären Matrix ergeben haben.

Wie zu sehen ist, hat sich der Kollagenanteil vergrößert, dieser Anstieg ist zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht signifikant ( $p < 0,05$ ), aber sehr signifikant zwischen der jüngsten Versuchsgruppe und der 3 Monate alten Versuchsgruppe ( $p = 0,005$ ).

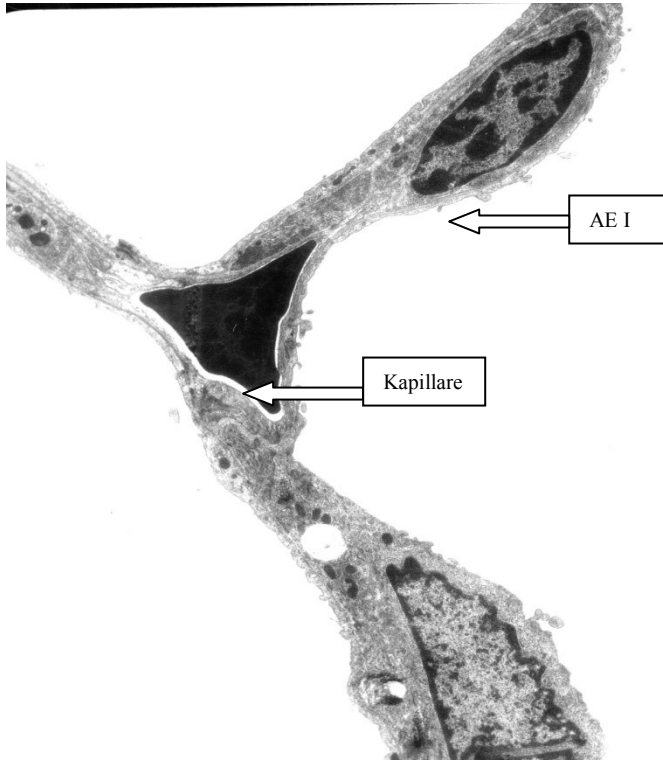
### 4.3 Absolute Volumina der einzelnen Gewebekomponenten

#### 4.3.1 Alveolarpithelzellen Typ I

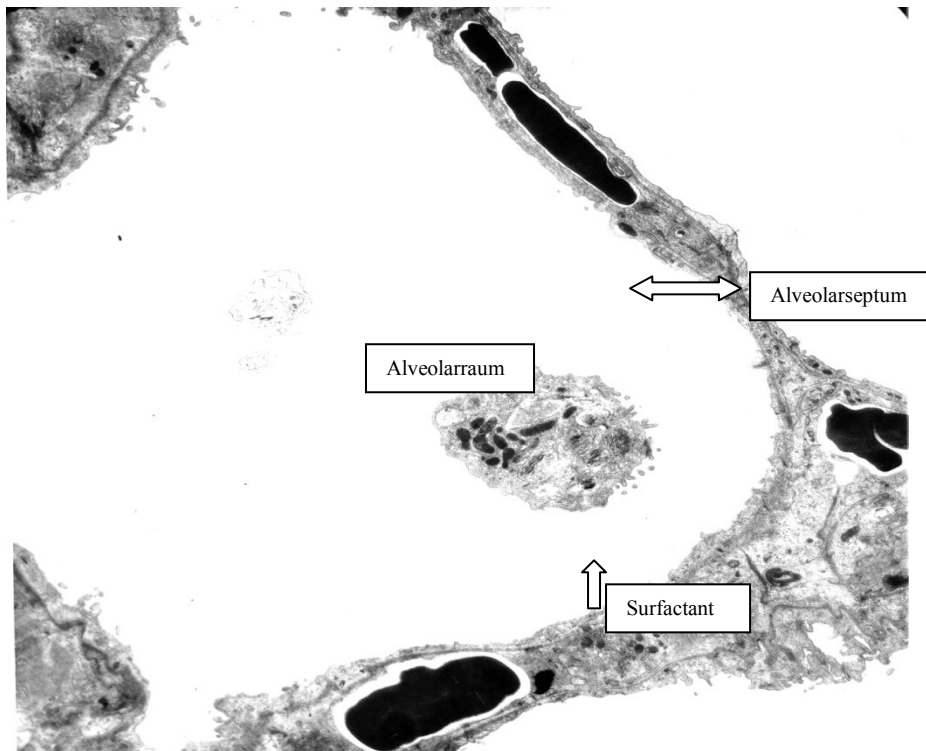
Die Volumenwerte der Alveolarepithel Typ I Zellen in  $\text{mm}^3$  zeigen insgesamt einen Anstieg im Vergleich der 4 Altersgruppen. Dieser ist jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



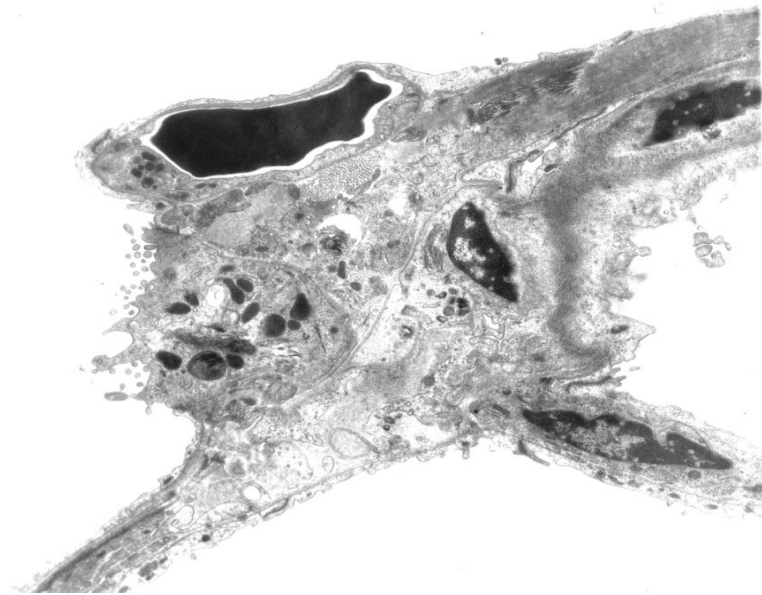
**Abbildung 23:** Volumina der Alveolarepithelzellen Typ 1 in Abhängigkeit vom Lebensalter



**Abbildung 24** Alveolarseptum mit AE I Zelle und Kapillare im Querschnitt  
(Gruppe 93-05)



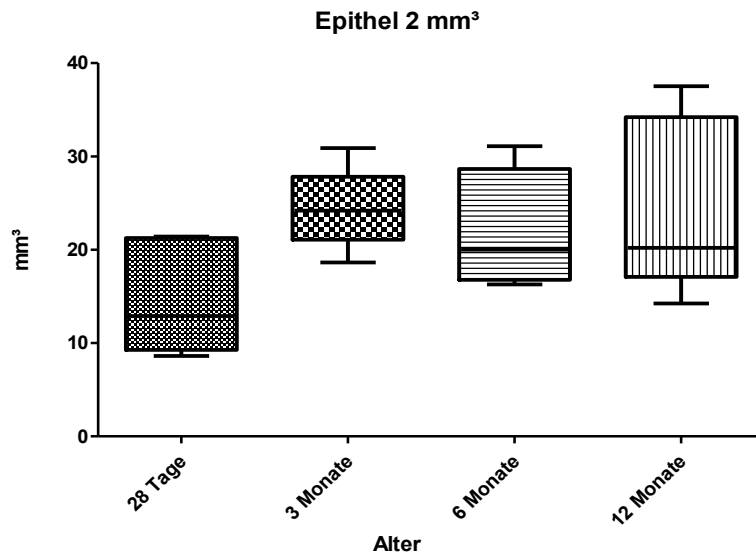
**Abbildung 25:** Alveole im Querschnitt  
(Gruppe 57-05)



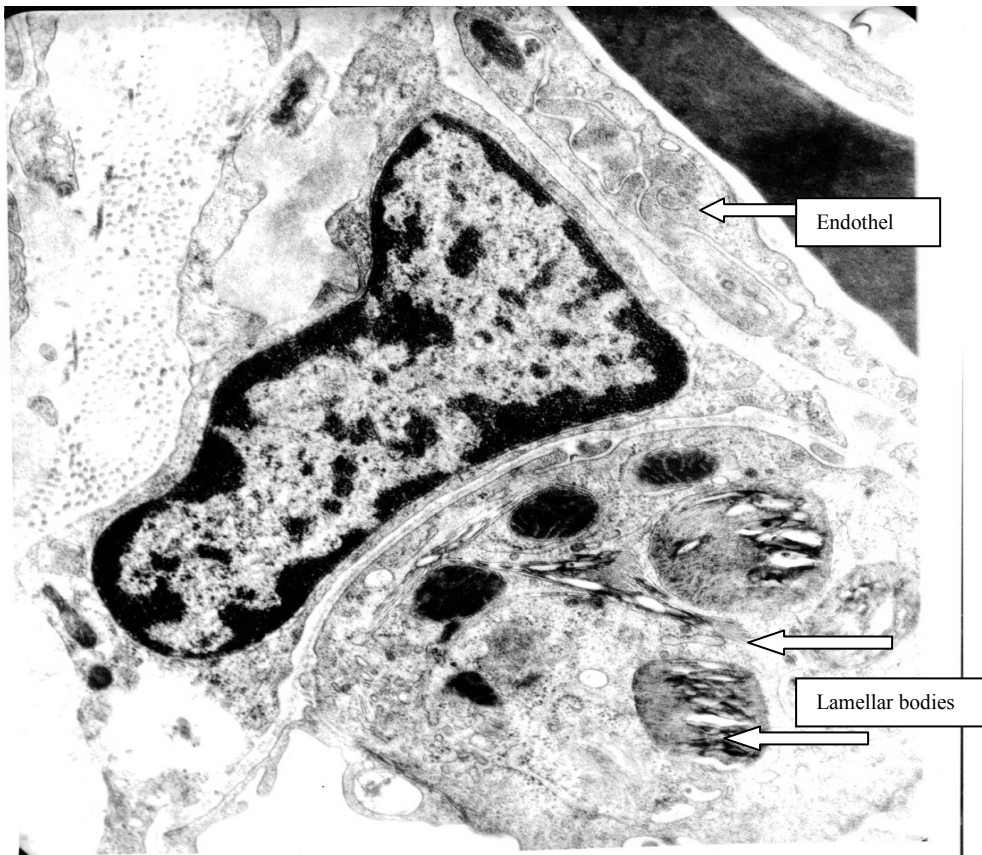
**Abbildung 26:** Alveolarseptum im Querschnitt  
(Gruppe 55-05)

#### **4.3.2 Alveolarepithelzellen Typ II**

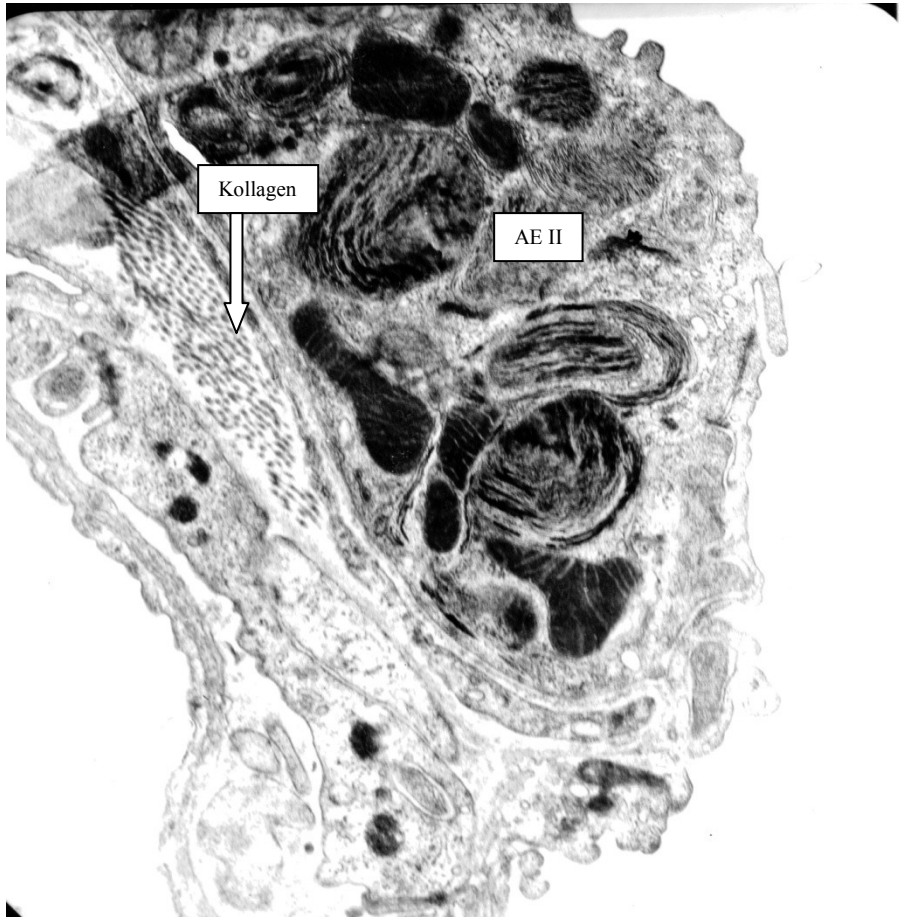
Die Volumina der Alveolarepithel Typ II Zellen zeigen zwischen der Versuchsgruppe im Alter von 28 Tagen und der Versuchsgruppe im Alter von 3 Monaten einen signifikanten Anstieg ( $p=0,017$ ). Dieser setzt sich nicht fort; die Ergebnisse der 6 Monate und 12 Monate alten Versuchsgruppe zeigen keine signifikanten Veränderungen mehr ( $p>0,05$ )



**Abbildung 27:** : Volumina der Alveolarepithelzellen Typ 2 in Abhängigkeit vom Lebensalter

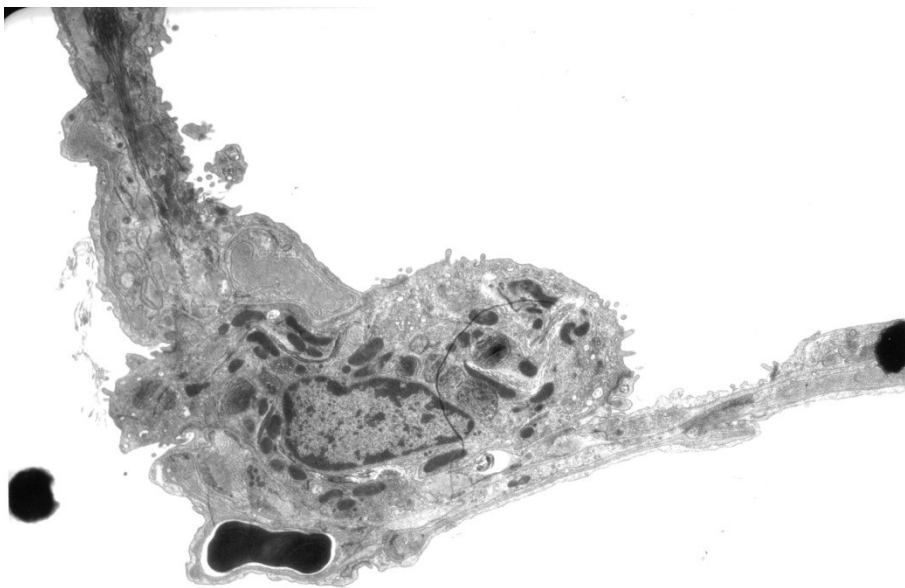


**Abbildung 28** Alveolarepitheltyp II mit lamellar bodies  
(Gruppe 51-05)



**Abbildung 29:** Alveolarepithel Typ II Zelle, Kollagenfasern sind im Querschnitt zu sehen

(Gruppe 274-05)



**Abbildung 30:** Alveolennische mit Alveolarepithel Typ II Zelle  
(Gruppe 169-05)

### 4.3.3 Kapillarendothel

Die Volumina der Endothelzellen zeigen einen signifikanten Anstieg zwischen der jüngsten Versuchsgruppe von 28 Tagen und der 3 Monate alten Versuchsgruppe ( $p=0,008$ ) danach bleiben die Werte auf etwa gleichem Niveau und zeigen keine signifikanten Veränderungen mehr.

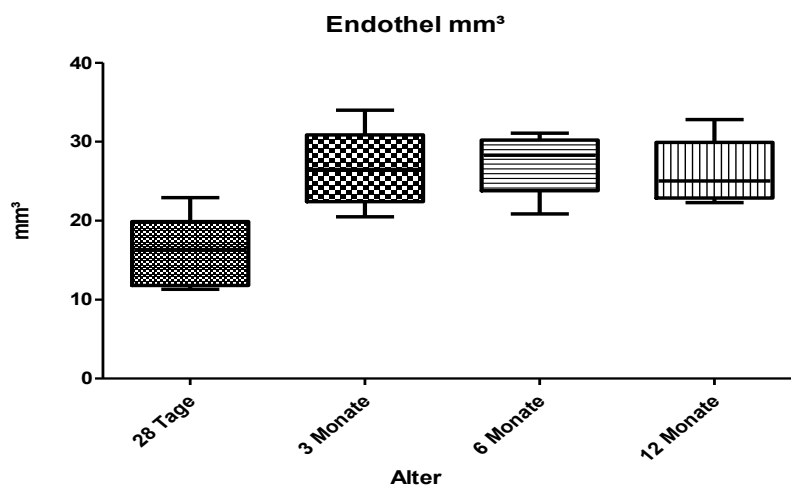


Abbildung 31: : Volumina der Endothelzellen in Abhängigkeit vom Lebensalter

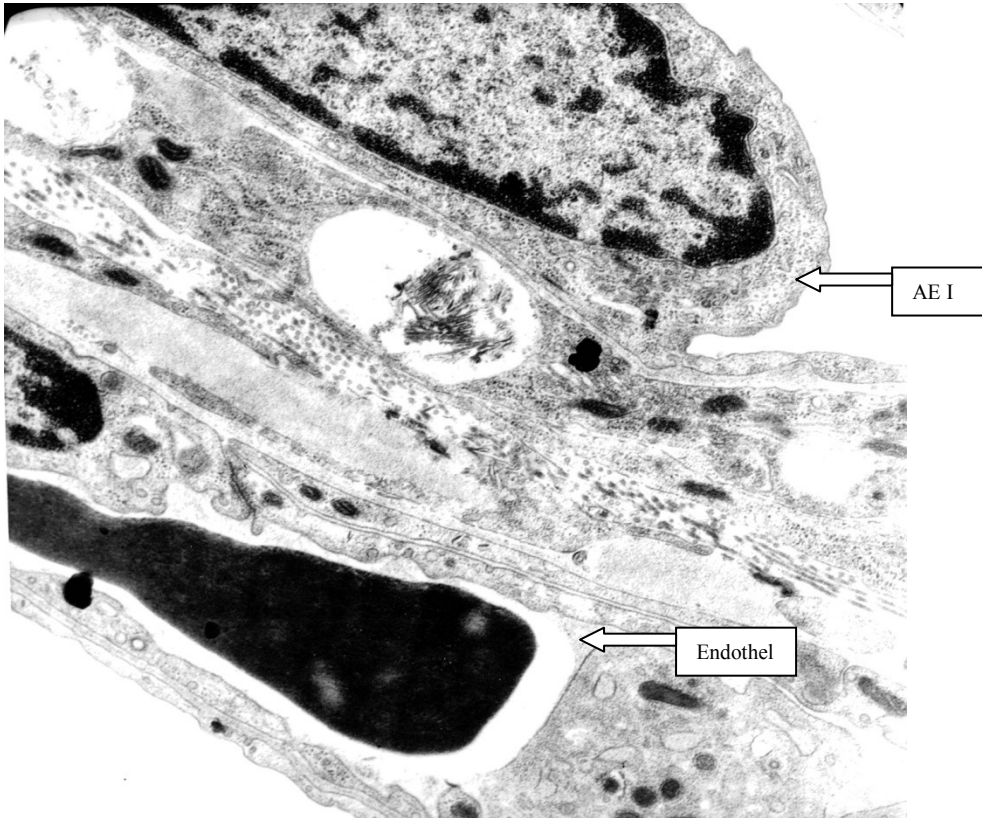


Abbildung 32

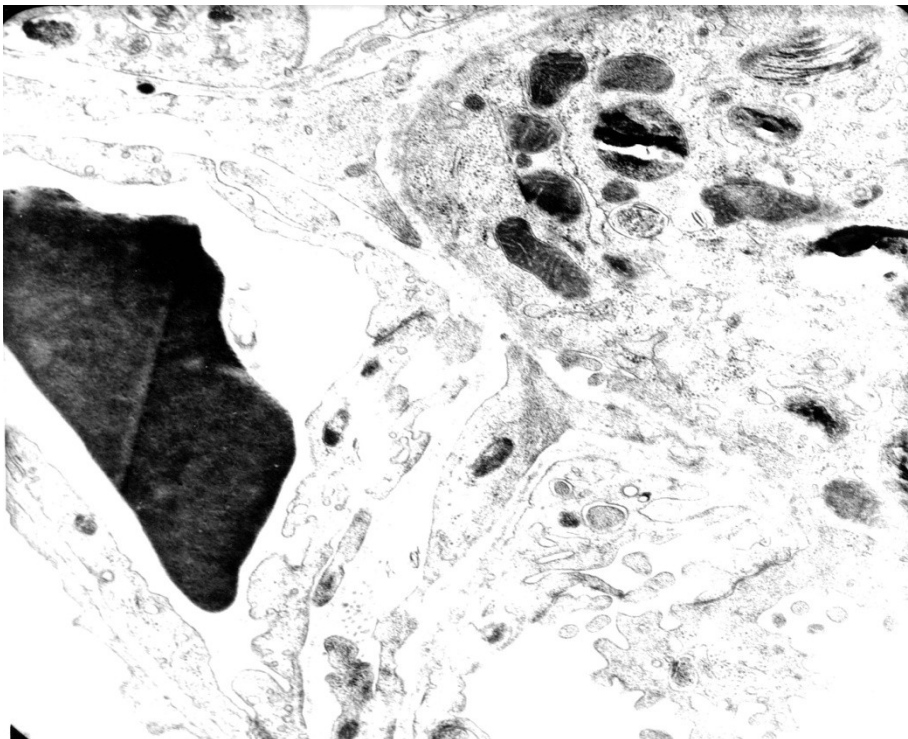
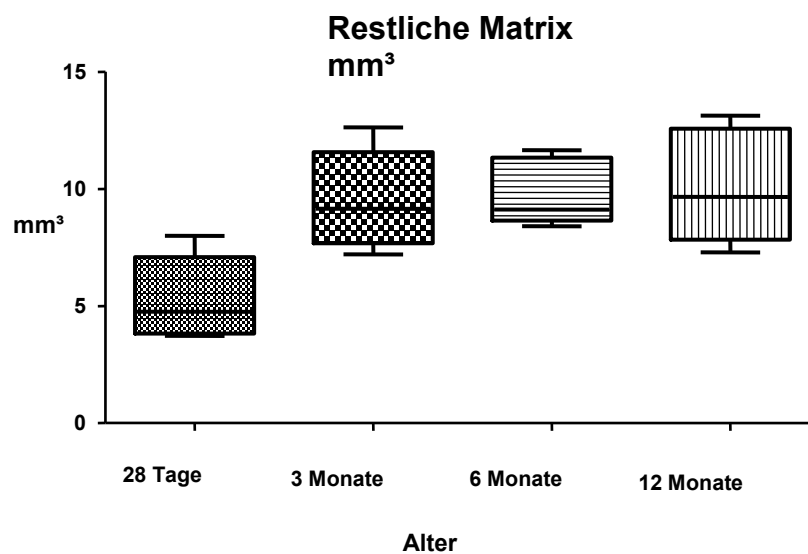


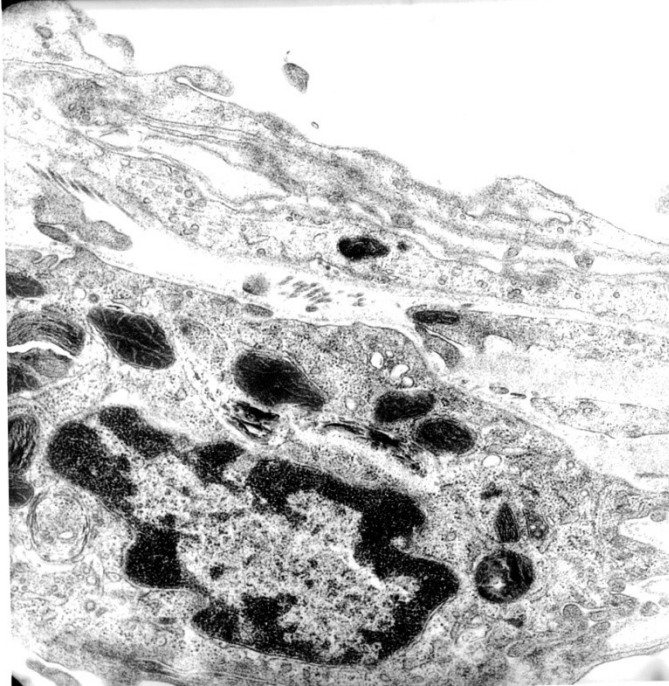
Abbildung 33: Querschnitt durch eine Alveolarsepte mit Kapillare mit Erythrozyt und Endothel (Gruppe 50-05)

#### 4.3.4 Restliche Matrix

Die Volumenergebnisse der restlichen Matrix zeigen ebenso einen signifikanten Anstieg zwischen der 28 Tage alten Versuchsgruppe und den 3 Monate alten Mäusen ( $p < 0,05$ ). Der Verlauf der Volumina zeigt danach keine signifikanten Veränderungen mehr. Insgesamt ist der Anstieg signifikant ( $p < 0,05$ ).



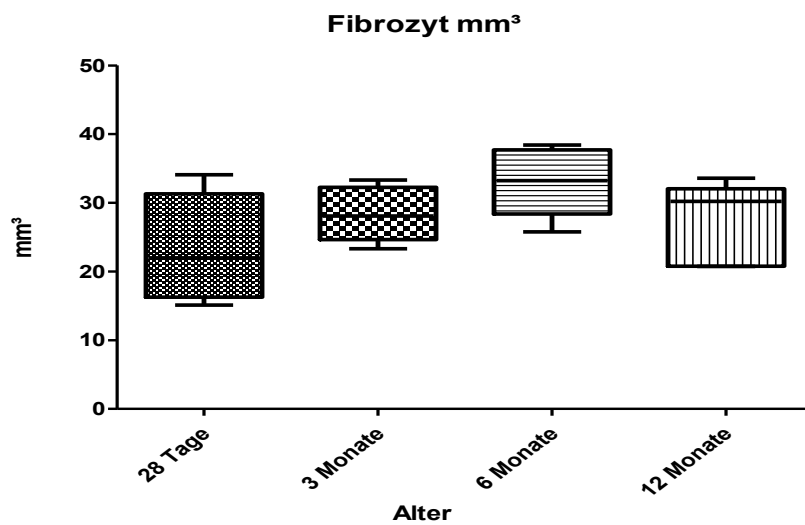
**Abbildung 34:** : Volumina der restlichen Matrix in Abhängigkeit vom Lebensalter



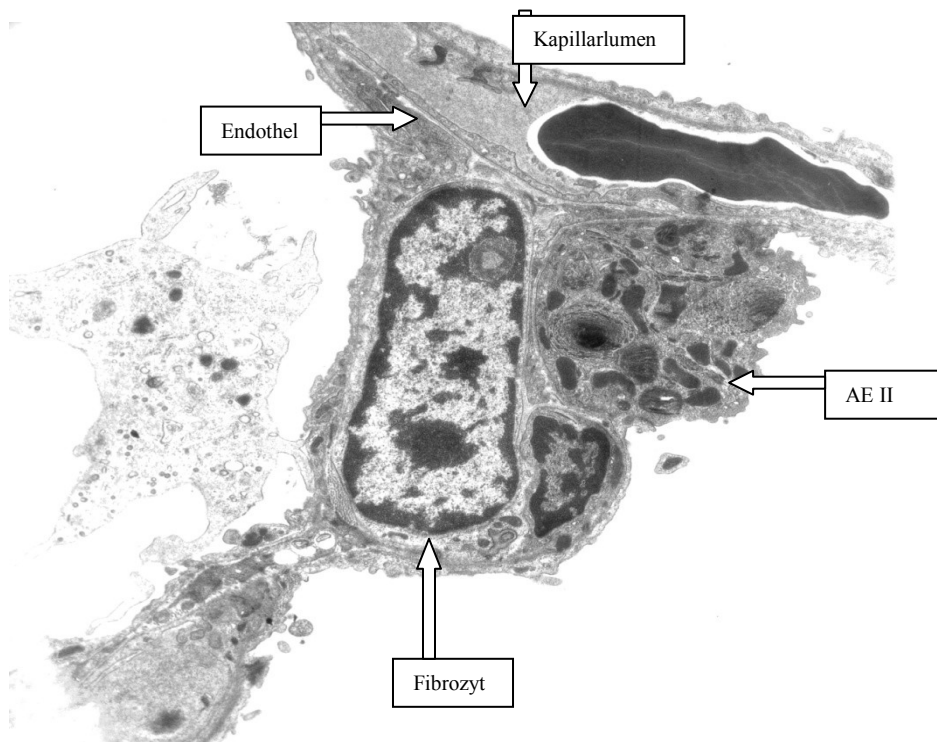
**Abbildung 35:** Querschnitt durch ein Alveolarseptum, gut zu sehen ist die restliche Matrix unter den Alveolarepithelzellen Typ I (Gruppe 50-05)

#### 4.3.5 Fibrozyten

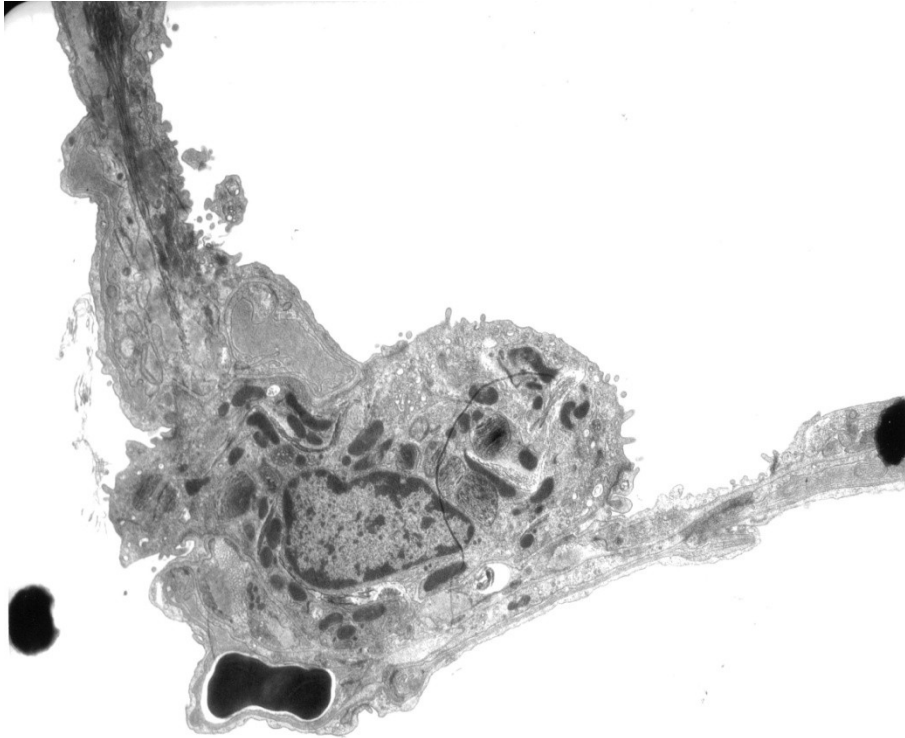
Es zeigt sich ein Anstieg der Fibrozytenvolumina bis zu der 6 Monate alten Versuchsgruppe, der dann wieder rückläufig ist und bei der 12 Monate alten Versuchsgruppe wieder auf einen ähnlichen Wert der 3 Monate alten Gruppe zurückfällt. Keine der Veränderungen ist signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 36** : Volumina der Fibrozyten in Abhängigkeit vom Lebensalter



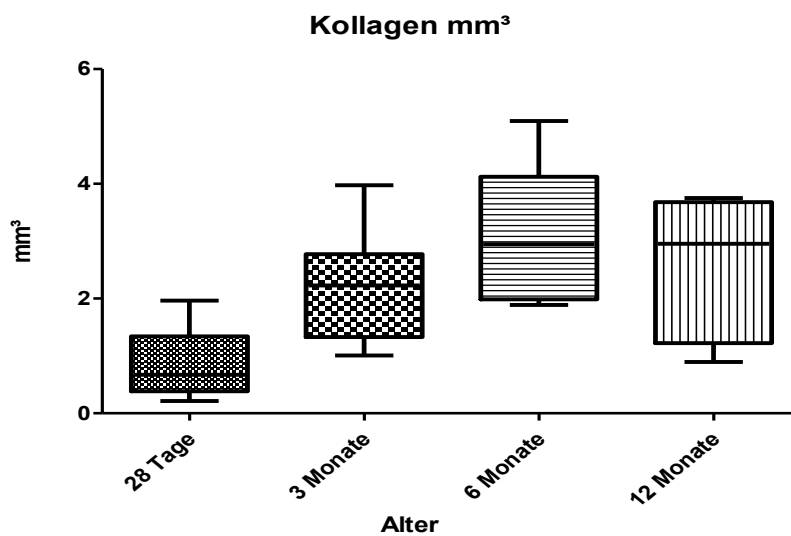
**Abbildung 37** Alveolarsepten mit Alveolarepithelzelle Typ II, Fibrozyt und Kapillare, das Alveolarepithelzelle Typ I ist dünn ausgebreitet über der Basallamina zu erkennen (Gruppe 168-05)



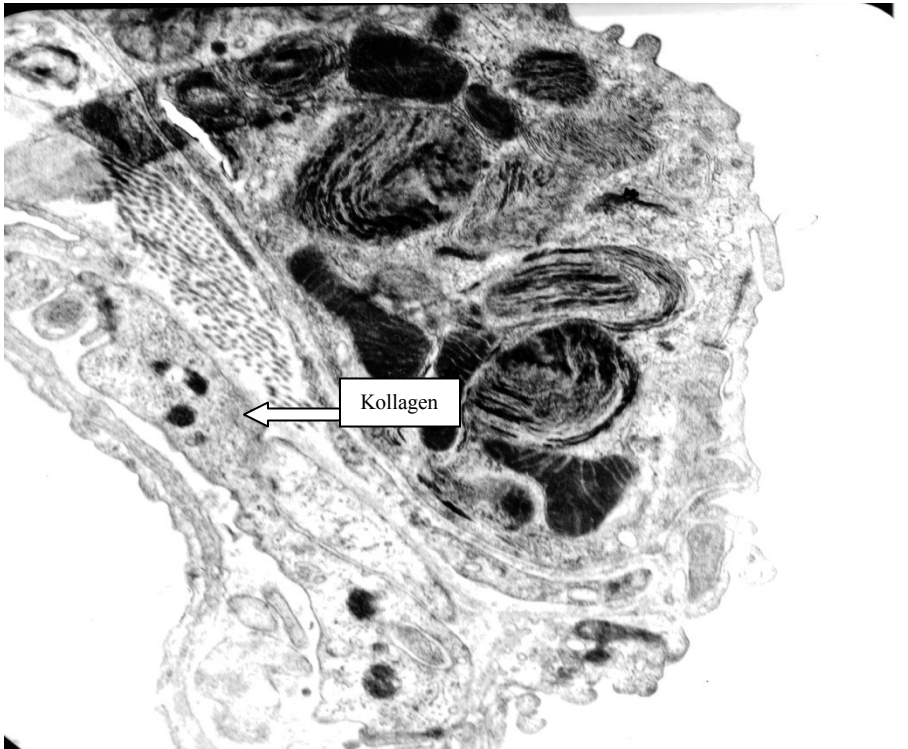
**Abbildung 38:** Alveolennische mit Alveolarepithel Typ II Zelle (Gruppe 55-05)

#### 4.3.6 Kollagen

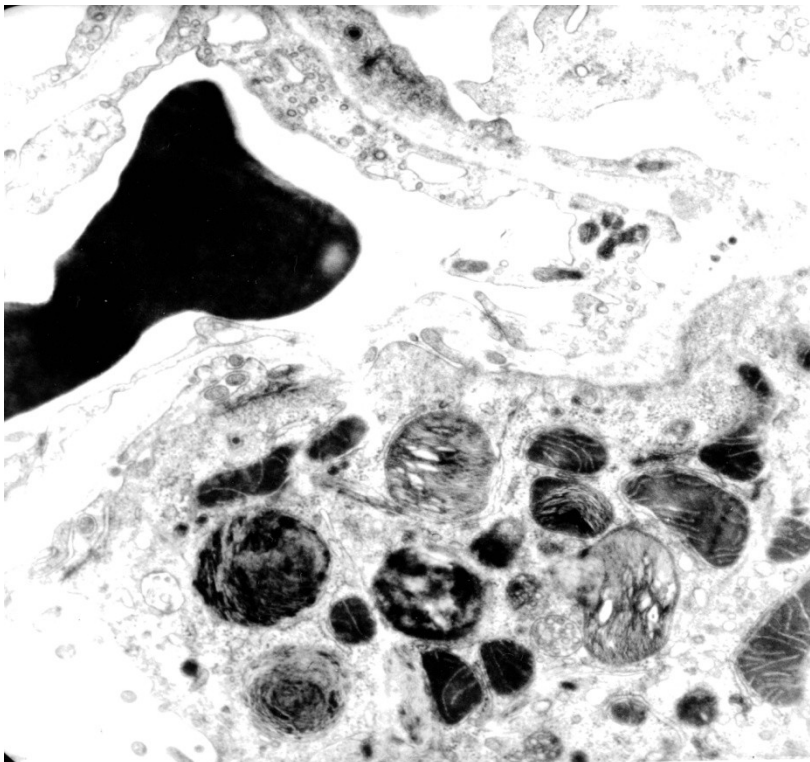
Die absoluten Volumenwerte des Kollagens steigen signifikant bis zur 6 Monate alten Versuchsgruppe ( $p=0,005$ ) und fallen dann wieder leicht ab, diese Veränderung ist nicht signifikant.



**Abbildung 39:** Volumina des Kollagen in Abhängigkeit vom Lebensalter



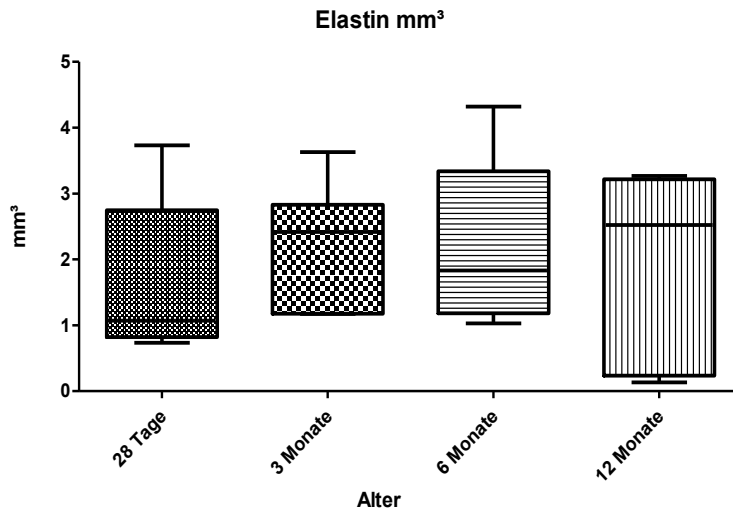
**Abbildung 40**



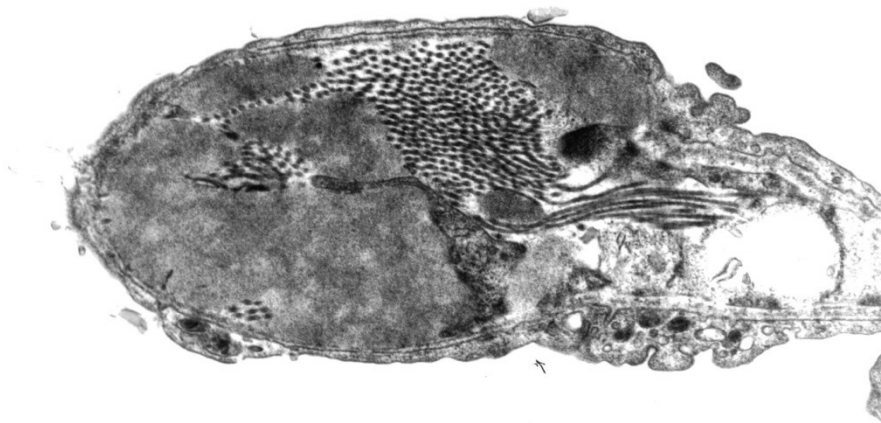
**Abbildung 41:** Alveolar Typ II Zelle, Kollagenfasern sind in Abbildung 40 im Querschnitt zu sehen (Gruppe 168-05)

### 4.3.7 Elastin

Die Elastinvolumina zeigen zunächst einen kleinen Anstieg, der dann wieder rückläufig ist. Diese Veränderungen sind nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 42:** Volumina des Elastin in Abhängigkeit vom Lebensalter



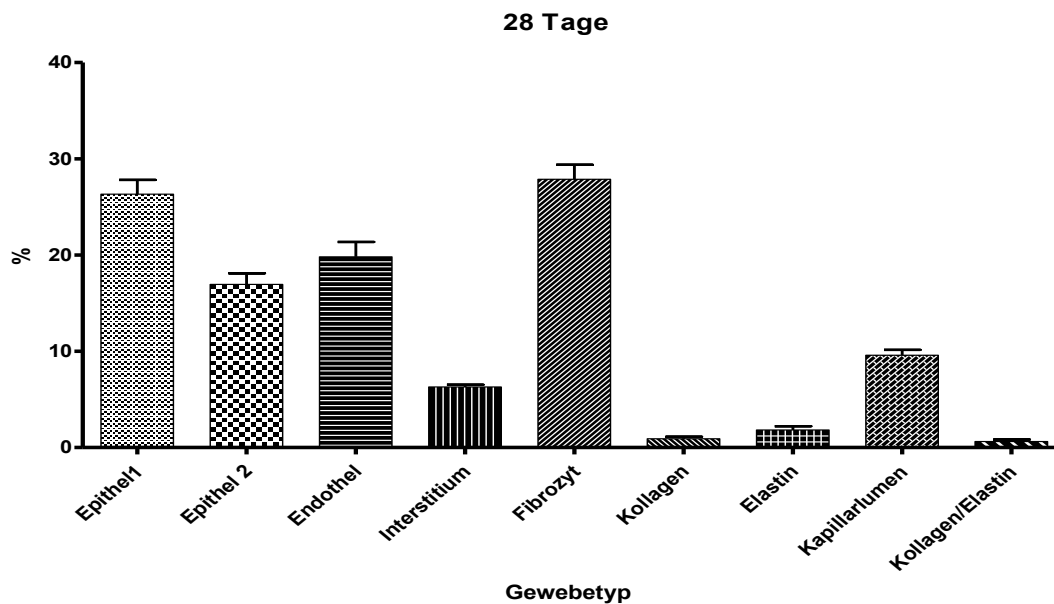
**Abbildung 43:** Endknöpfchen mit Elastin und Kollagen  
(Gruppe 96-05)

#### 4.4 Darstellung aller Ergebnisse im Überblick

Es zeigt sich eine ähnliche Zusammensetzung bei den verschiedenen Altersgruppen bezüglich der relativen Anteile der einzelnen Gewebeparameter an dem gesamten gezählten Punkten über den Alveolarepten.

Die zellulären Parameter wie Epithel I, Epithel II, Fibrozyten, Endothel liegen mit ihren Anteilen höher als die nicht zellulären Anteile wie die restliche extrazelluläre Matrix, das, Elastin und Kollagen.

#### Ergebnisse im Alter von 28 Tagen



**Abbildung 44:** Prozentuale Anteile der Gewebetypen am Septum bei 28 Tage alten SPD-ko Mäusen

### Ergebnisse im Alter von 3 Monaten

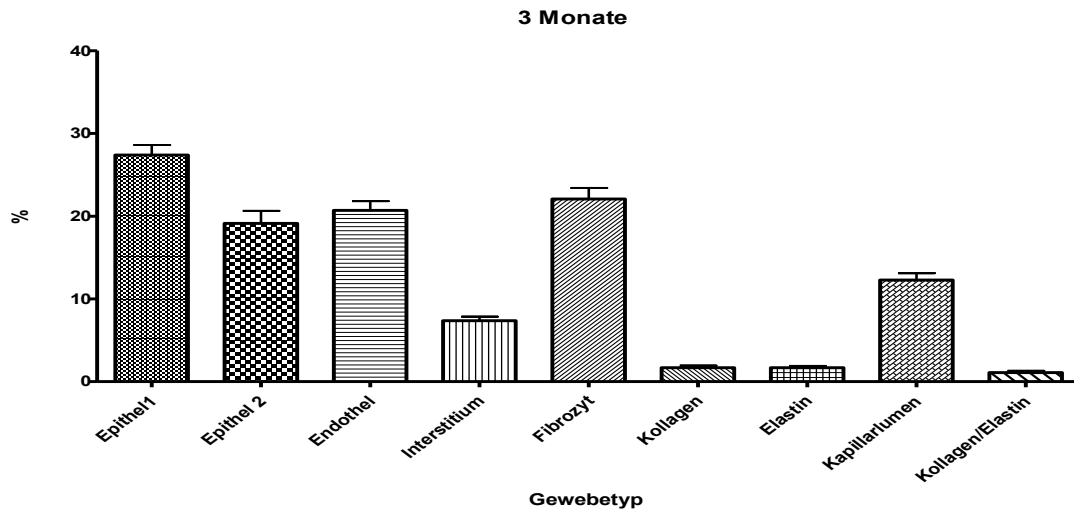


Abbildung 45: Prozentuale Anteile der Gewebetypen am Septum bei 3 Monate alten SPD-ko Mäusen

### Ergebnisse im Alter von 6 Monaten

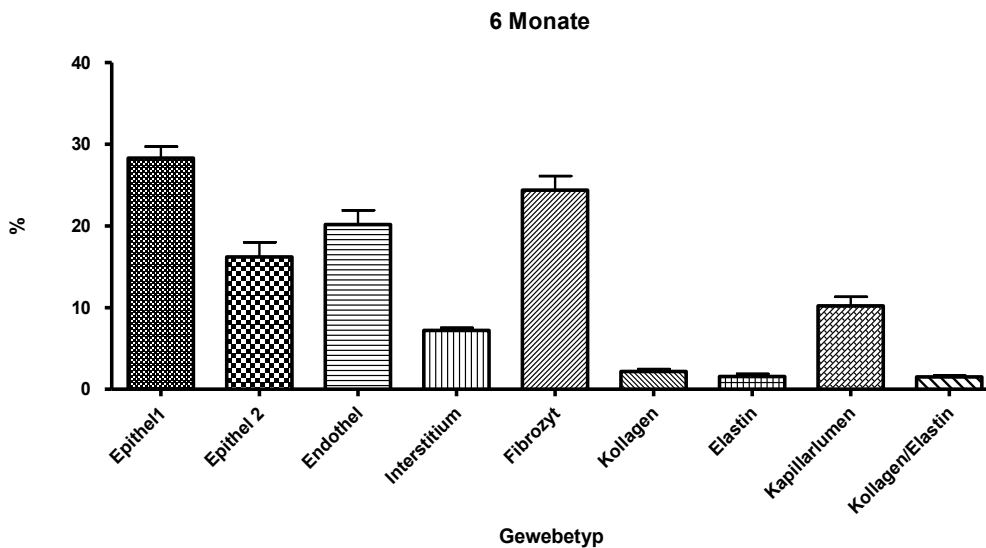
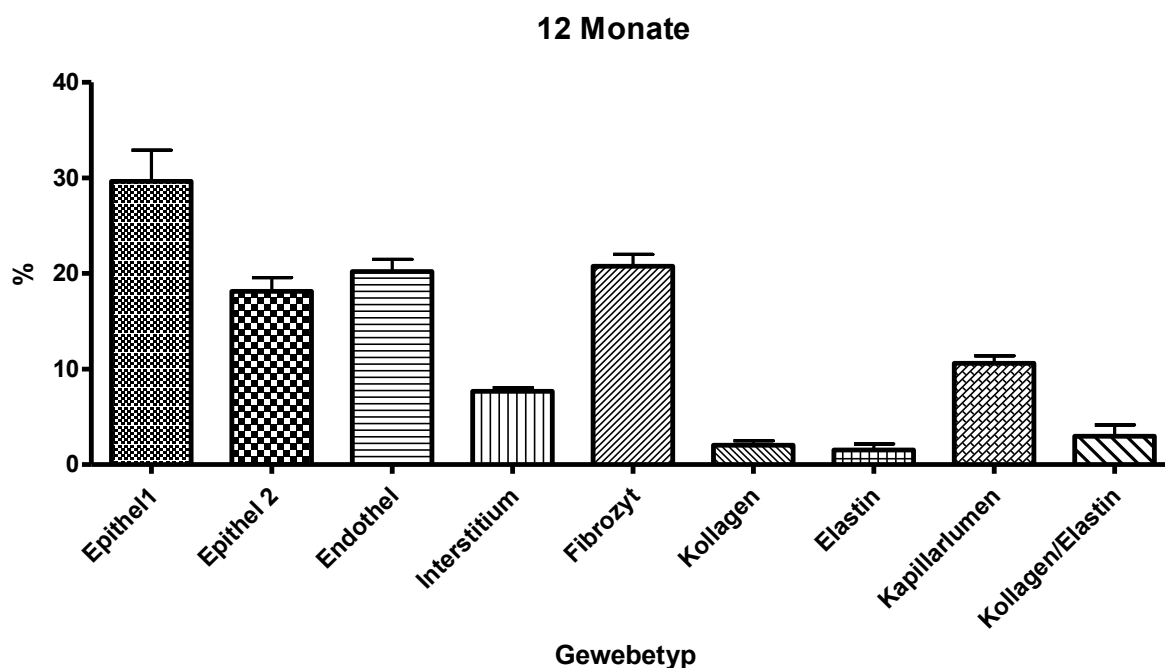


Abbildung 46 : Prozentuale Anteile der Gewebetypen am Septum bei 6 Monate alten SPD-ko Mäusen

**Ergebnisse im Alter von 12 Monaten**



**Abbildung 47:** Prozentuale Anteile der Gewebetypen am Septum bei 12 Monate alten SPD-ko Mäusen

**Anteil von der Alveolarsepten am Parenchym**

	m28T	m3Mo	m6Mo	m12Mo
<b>Vv Par</b>	89,9 ±	87,2 ±	89,3 ±	87,8 ±
(%)	2,4	1,6	1,4	0,9
<b>Vv AS</b>	13,0 ±	12,5 ±	11,5 ±	11,7 ±
(%)	3,1	1,8	0,5	2,4

**Tabelle 7:** Prozentualer Anteil Parenchym und Alveolarsepten am Parenchym im Verlauf der Zeit

**Volumenanteile aller Ergebnisse im Überblick**

Vv(%)	Epithel 1	Epithel 2	Endothel	restl. Matrix	Fibrozyten	Elastin	Kollagen	Kapillarlumen
Alter								
28 Tage	26,3 +/- 3,6	16,9 +/- 2,8	19,8 +/- 3,7	6,3 +/- 0,5	27,8 +/- 3,7	1,8 +/- 0,9	0,9 +/- 0,5	9,5 +/- 1,3
3mo	27,3 +/- 2,9	19,1 +/- 3,7	20,7 +/- 2,7	7,3 +/- 1,2	22,0 +/- 3,2	1,6 +/- 0,5	1,6 +/-0,6	12,2 +/- 2,0
6 mo	28,3 +/- 3,1	16,2 +/- 4,0	20,1 +/- 3,8	7,2 +/- 0,7	24,3 +/- 3,8	1,5 +/- 0,7	2,1 +/- 0,6	10,2 +/- 2,4
12mo	29,6 +/- 7,2	18,1 +/- 3,2	20,2 +/- 2,8	7,6 +/- 0,8	20,7 +/- 2,7	1,5 +/- 1,4	2,0 +/- 1,0	10,6 +/- 1,7

**Tabelle 8:** Volumenanteile der untersuchten Parameter im Überblick

	m28T	m3Mo	m6Mo	m12Mo
<b>V Par</b> (mm <sup>3</sup> )	645 ± 136	1037 ± 109	1180 ± 111	1220 ± 138
<b>V AS</b> (mm <sup>3</sup> )	84,8 ± 28,7	129 ± 15,2	136 ± 14,3	144 ± 38,8

Vv (mm <sup>3</sup> )	Epithel 1	Epithel 2	Fibrozyten	Endothel	Restliche Matrix	Elastin	Kollagen
28 Tage	22,9 +/- 10,1	14,4 +/- 5,6	23,3 +/- 7,6	16,2 +/- 4,4	5,3 +/- 1,7	1,6 +/- 1,2	0,8 +/- 0,6
3mo	35,5 +/- 7,2	24,4 +/- 4,4	28,2 +/- 3,9	26,7 +/- 4,9	9,5 +/- 2,1	2,2 +/- 0,9	2,2 +/- 1,0
6 mo	38,7 +/- 7,4	22,1 +/- 6,3	33,0 +/- 5,0	27,2 +/- 3,9	9,8 +/- 1,4	2,1 +/- 1,3	3,0 +/- 1,2
12mo	39,3 +/- 14,1	24,5 +/- 9,4	27,1 +/- 5,9	26,1 +/- 4,1	10,0 +/- 2,4	1,8 +/- 1,5	2,5 +/- 1,2

**Tabelle 9 und 10:** Volumina von Parenchym und Alveolarsepten, und der untersuchten Parameter im Verlauf der Zeit

## **5. Diskussion**

---

### **5.1 Methodenkritik**

#### **5.1.1 Präparatherstellung**

Ziel dieser Arbeit war es, die altersbedingten Veränderungen der Alveolarsepten bei männlichen C57/BL6 Sp-D Ko Mäusen Ko zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden mithilfe der Prinzipien stereologischer Auswertungsverfahren (Punkteraster, Punkte- / Linienraster usw.) aus dem zweidimensionalen Elektronenmikroskopiebild repräsentative Werte der dreidimensionalen Strukturparameter ermittelt. So war es möglich, die quantitativen Veränderungen der Gasaustauschfläche und der einzelnen Lungenkompartimente zu erfassen und zu bewerten.

Um eine aussagekräftige quantitative und qualitative Analyse von Gewebe, Zellen und subzellulären Strukturen durchführen zu können, werden hohe Erwartungen an das Präparat gestellt. Wichtig ist vor allem eine identische Darstellung der Gewebescharakteristika, das bedeutet eine bestmögliche Erhaltung der Zellen und der Gewebestrukturen.

Für meine Untersuchungen war demnach besonders die Stabilisierung der Alveolarsepten von Bedeutung.

Zur Herstellung der Schnitte für die Elektronenmikroskopie sind präparative Schritte erforderlich, die zu strukturellen Veränderungen führen können. Jedoch sollten diese möglichst gering gehalten werden (Weibel et al. 1982).

Durch eine Instillation über die Luftwege, sowie eine Einbettung in Araldit werden diese Anforderungen erfüllt. Auch die Anwendung des Fixierungsgemisches aus Glutardialdehyd und Formaldehyd hat sich bewährt (Fehrenbach H und Ochs 1998).

Positiv wirken hierbei die jeweiligen chemischen Eigenschaften, wobei Glutardialdehyd eine Proteinvernetzung bewirkt und stark und lang fixiert, während Formaldehyd schneller in das Gewebe eindringt, aber weniger stark fixiert. Die möglichst identische Abbildung der Organstrukturen auf den untersuchten Präparaten wurde hiermit gewährleistet.

Bei der Blockkontrastierung des Gewebes mit halb-gesättigter Uranylazetatlösung erfolgt zwar eine Entwässerung des Lungenparenchyms, wie erwünscht, gleichzeitig

verhindert das Uranylazetat durch seine lipidstabilisierende Wirkung aber ein Herauslösen der Phospholipide durch die Lösung (Fehrenbach und Ochs 1998).

Während der Auswertung der einzelnen Präparate stellten sich Veränderungen des Lungengewebes auf elektronenmikroskopischer Ebene relativ heterogen dar. Einige Präparate schienen relativ normal, während andere deutliche Veränderungen zeigten. Mitunter waren auf einem Präparat in verschiedenen Arealen aber auch deutliche Unterschiede bezüglich der Größe der Typ II Zellen, der Ansammlung von Elastin und Kollagen oder der Dicke der Septen oder auch der Menge an Makrophagen in den Alveolen zu beobachten. Auch zwischen den einzelnen Tieren einer Altersgruppe zeigten sich mitunter deutliche Unterschiede, was die manchmal großen Standardabweichungen erklärt. Dies macht eine einheitliche Interpretation der Ergebnisse teilweise schwierig

### **5.1.2 Ultrastruktureller Untersuchungsansatz**

Eine der wesentlichen Schwierigkeiten bei strukturellen Untersuchungsmethoden besteht darin, dass diese nur ein zweidimensionales Abbild von histologischen Strukturen liefern. Volumina, Oberflächen und Längen, in Form von Flächen, Linien und Punkten sind nur unvollständig dargestellt.

Der geeignete Untersuchungsansatz zur Analyse der Morphologie der Alveolarsepten ist daher die Stereologie. Erforderlich für die Darstellung der Zellen und der Substrukturen der Septen ist die Transmissionselektronenmikroskopie.

Diese Kombination ermöglicht eine adäquate Charakterisierung und Quantifizierung der Ultrastruktur der Septen. Auf Grundlage der zweidimensionalen Schnitte und Abbildungen ermöglichen die stereologischen Verfahren die Bestimmung von erwartungsgetreuen Schätzwerten der dreidimensionalen Strukturparameter. (Howard und Reed 1998). Die stereologischen Verfahren sind seit langem etabliert und unterliegen einer ständigen Weiterentwicklung, die Anwendung erfolgt systematisch und nach dem Zufallsprinzip. (Fehrenbach und Ochs 1998), so dass auf allen Ebenen der Auswahl eine für alle Strukturen gleich hohe statistische Wahrscheinlichkeit in die Auswertung aufgenommen zu werden, gewährleistet ist. Systematische Fehler (Bias) treten also nicht auf. (Howard und Reed 1998)

Die Testfelder wurden nach dem „systematic subsampling“ Verfahren zufällig ausgewählt. Die Schnitte von jeweils 5-6 ausgewählten Lungenblöckchen der

Versuchsgruppe wurde in konstanten Abständen systematisch untersucht zur Bestimmung der Anzahl an Gewebezellen habe ich das Punktezählverfahren verwendet. Die Verwendung von Punkterastern erlaubt ein Zählverfahren, das unabhängig von der Größe, Form und Volumen der auszählenden Gewebetypen ist. Das gröbere Punkteraster wurde für Alveolarepithelzellen Typ I, Typ II, Endothelzellen und Fibrozyten verwendet, das kleinere für die restliche extrazelluläre Matrix, Kapillarlumen, Elastin und Kollagen. Bei der Endberechnung wurden die Punkte des größeren Rasters mal 4 gerechnet, da 1 Punkt jeweils 4 Punkten des kleineren Rasters entspricht.

Die Abstände der Testfelder wurden so festgelegt, dass die relevanten Strukturen pro Organ etwa 1000mal erfasst wurden. Diese quantitativen elektronenmikroskopischen Messungen sind bei solchen Anzahlen von Strukturen sensitiv genug, um kleine, aber biologisch signifikante Veränderungen oder Schädigungen aufzuzeigen. Die Variabilität zwischen den Messungen trägt nur in geringem Maß zur gesamten beobachteten experimentellen Variabilität bei, die durch die individuelle biologische Variabilität bestimmt wird. (Cruz-Orive und Weibel 1990, 1997).

Dadurch kann Art und Schwere signifikanter Veränderungen definiert werden, sodass dies zur Aufklärung von pathologischen und pathophysiologischen Prozessen der Lunge beitragen kann (Chang et al 1991).

Allerdings ist die Interpretation der Ergebnisse limitiert, da zwar Veränderungen der Struktur der Alveolarsepten quantifiziert und charakterisiert werden können, jedoch nicht abgebildet wird, ob innerhalb eines Präparates signifikante Unterschiede vorliegen, die durch das Punkteraster in der Endberechnung nicht erfasst werden. Diese zeigt Mittelwerte, einzelne Regionen gehen in der Interpretation verloren.

### **5.1.3 Mäuse als Versuchstiere**

In-vivo Modelle haben sich besonders im Zuge der modernen Molekularbiologie zur Aufklärung der Pathologie und Physiologie der Lunge als sinnvoll erwiesen, vor allem durch eine Vielzahl an Möglichkeiten, Gene gezielt an- oder auszuschalten. Die Maus stellt ein hervorragendes Versuchsobjekt dar, Genvariationen und deren Konsequenzen für den Organismus zu erforschen (Kwak et al. 2004). Da die Maus momentan das dem Menschen am engsten verwandte Labortier ist und Gen-knockouts bei ihr verhältnismäßig unkompliziert erreicht werden können., ist eine genauere Erforschung

der von den ausgeschalteten Genen kodierten Proteine gut möglich. In der Surfactant Forschung konnte bereits (Glasser und Noguee 2006) mithilfe von knockout Mäusen dargestellt werden, dass ein Mangel an SP-B mit dem Leben nicht vereinbar ist.

SP-C<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen gedeihten postnatal zunächst normal und entwickelten erst später interstitielle Lungenerkrankungen. 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).

Die untersuchten C57/BL6 Mäuse zeigten bereits in vorausgehenden Studien nach Zigarettenrauch Exposition eine mittlere Emphyseanfälligkeit (Guerassimov et al 2004), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Ergebnisse dieser Studien also für den Mangel an SP-D repräsentativ sind und nicht auf eine generell erhöhte Tendenz zur Emphysementstehung dieser Mausart zurück zu führen sind

Die untersuchten Mäuse waren im Alter von 28 Tagen bis 12 Monaten. Bei einer Lebenserwartung von etwa 29-30 Monaten, abhängig von Stamm, Ernährungsstatus und Umwelteinflüssen, sind sie also eher in jüngerem Lebensalter. In den meisten bisherigen Studien an SP-D knockout Mäusen waren diese höchstens 6-7 Monate alt waren, so dass Informationen über Veränderungen in höherem Alter, die die Struktur und Funktion betreffen, also der Alveolen, der Vaskularisierung, der Innervation, des Lymph- und Immunsystems, eher begrenzt sind.

Der Versuchsaufbau dieser Arbeit, der Tiere von 28 Tagen bis zu 12 Monaten einschloss, ermöglichte es uns, die Veränderungen ihres Lungenparenchyms über einen wesentlich längeren Zeitraum zu beobachten.

Allerdings eignen sich wenige Studien zum direkten Vergleich, daher scheint es sinnvoll, die morphologischen Gemeinsamkeiten und Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe zu beschreiben und im Hinblick auf die Fragestellung, ob ein fehlendes SP-D Gen als Modell für ein pulmonales Emphysem gelten kann, kritisch zu diskutieren, ob es sich um eine normale Lungenalterung handelt oder ob sich eine emphysematöse Entwicklung zeigt.

## 5.2 Ultrastrukturelle Veränderungen bei Lungenemphysem und Alterungsprozessen der Lunge im Überblick

### 5.2.1 Emphysem

Die Definition eines pulmonalen Emphysems als „abnormale permanente Erweiterung der distal der Bronchioli terminales liegenden Atemwege und Destruktion ihrer Wände“ ist eine Basis für weitgehend anerkannte Studien.

Es gibt aber wenige Tiermodelle, die diese Kriterien beide erfüllt haben.

Wie in der Einleitung dargelegt zeigte sich in einigen Mausmodellen in Emphysemstudien ein Zusammenhang zwischen von Makrophagen produzierten Enzymen, wie Metalloelastase, Neutrophiler Elastase, Cathepsin S (lysosomales Endopeptidase aus aktivierten Makrophagen) und Metalloproteinase 9 (Elastinolytische Kollagenase) und einer Entwicklung eines Emphysems. Bedingt durch ein Ungleichgewicht in der Enzymausschüttung der Makrophagen, also ansteigende Expression von Proteasen und abnehmende Aktivität von Antiproteasen, kommt es zu einer zunehmenden Destruktion der Alveolarsepten mit Verlust an zellulären Anteilen und nichtzellulären Parametern, und einer Dysregulation von Entzündung und Reparaturmechanismen durch gestörte Interaktion zwischen Epithel und Makrophagen. ( Barnes et al. 2003; Vogelmeier et al. 2006).

Andere Untersuchungen bei Emphysempatienten haben jedoch auch gezeigt, dass es trotz der Abnahme des Alveolarraumes auch zu einer Verdickung der Septen kommen kann, die durch eine Vermehrung der kollagenen Fasern zustande kommt– also auf eine Fibrosierung zurück zu führen ist.

Beides, eine Destruktion der Septen aber auch eine Fibrosierung führt zu einem Verlust von alveolärer Oberfläche (Vlahovic et al 1999), also Gasaustauschregionen, der wiederum eine Hypoxie verursacht. Ein chronisch kompensatorischer Vasospasmus steigert den pulmonalen Widerstand, der bei zu einem kapillären Umbau führen kann und zu einem Verlust des pulmonalen Kapillarbetts.

Zur Analyse emphysematöser Prozesse eignen sich also besonders die Veränderungen der Elastin und Kollagenanteile, sowie der zellulären Parameter, Epithel II, II und Fibrozyten. Veränderungen der Endothelanteile können im Zusammenhang mit einem Verlust an Kapillaren stehen.

### 5.2.2 Alterungsprozess

Hierzu gehört erst einmal bei allen Spezies wachstumsbedingt eine Volumen und Oberflächenzunahme der Lungen. Später folgen eine zunehmende Ausdünnung der Septen und Fensterung der Alveolarwände durch sich vergrößernde Poren. Dies ist ebenso bei allen säugenden Spezies zu finden und erleichtert zum einen die Ventilation benachbarter Alveolen, und dient zum anderen der Migration von Zellen, wie Makrophagen. Im weiteren Alterungsprozess scheinen sich diese Poren noch zu vergrößern, und es kommt gleichzeitig zu einem Verlust von Alveolarepten im Alter.

Diese beiden Prozesse spielen jedoch auch bei der Entstehung eines Lungenemphysems eine große Rolle, was bei der Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung ist.

Die Alveolenzahl wird weniger, dabei kommt es zur Neuordnung von extrazellulärer Matrix wie Kollagen und Elastin, ein Prozess der zu Streckung und Verflachung der Alveolen führt und zu Blähung der Ducti alveolares (Pinkerton, Green 2003).

Außerdem kommt es zu einer Abnahme der pulmonalen Elastizität, die entweder durch eine Abnahme an elastischen Fasern bedingt ist oder durch deren fehlendes Wachstum bei zunehmendem Lungenvolumen.

Neben der altersbedingten Abnahme an diesen strukturellen Parametern kommt es auch funktionell zu Veränderungen, u.a. zu einem Anstieg der phagozytierenden Zellpopulation, mit gleichzeitig reduzierten phagozytotischen Fähigkeiten.

Das bedeutet, dass die oxidative Immunantwort auf entzündliche Prozesse, und akute Partikelexposition, die gemessen werden kann an der Zellkonzentration der Bronchoalveolaren Lavage, laut einer Studie an Ratten (Overdorster 2001) bei älteren Tieren abnimmt und es gleichzeitig zu größeren pathologischen Effekten, z.B. Zerstörung der Alveolarwände kommt.

Genauer bedeutet dies eine Abnahme der antioxidativen Kapazität, also eine Abnahme an antioxidativen Enzymen wie Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion, die dem Schutz der Zellen dienen und vor oxidativer Zerstörung durch Umweltfaktoren schützen soll (Pinkerton, Green 2003).

Ob die Entwicklung chronischer Erkrankungen, wie das Altersemphysem, damit ursächlich in Zusammenhang steht oder ob es allein aufgrund der altersbedingten Abnahme der Alveolarwand zu einer Überblähung der Lungen, ist damit noch nicht geklärt. Wenige Studien hingegen untersuchen die Einflüsse des Alterungsprozesses auf das Surfactantsystem. Jedoch können alle Veränderungen die im Alter eintreten auch

Einfluss auf die Zusammensetzung und Funktion des Surfactantsystems nehmen (Orgeig, Daniels 2004).

Physiologische Alterungsprozesse können also ebenso Veränderungen in der Zusammensetzung der Alveolarsepten verursachen wie eine Emphysementwicklung, die möglicherweise durch ein fehlerhaftes Surfactantsystem begründet ist.

Genauere Veränderungen der Parameter und was diese Ergebnisse bedeuten können, wird im Folgenden dargestellt.

### **5.3 Ergebnisse der untersuchten Parameter in der Diskussion**

#### **5.3.1 Alveolarepithelzellen Typ I, Alveolarepithelzellen Typ II**

Alveolarepithelzellen Typ I bilden die eigentliche Alveolenoberfläche. Sie sind extrem flach und vor allem durch ihre weit ausgedehnten Fortsätze gekennzeichnet, die ein geschlossenes Alveolenepithel bilden. Sie haben somit eine Barrierefunktion. (Breitbach 1986)

Alveolarepithel Typ II Zellen kommen in den Nischen der Alveolen vor. Luminal besitzen sie unregelmäßige Ausläufer und sind mit kurzen Mikrovilli besetzt (Schiebler 1996). Sie sind die Produzenten des Surfactant-Proteins (Janquerira, Carneiro, Schiebler 1996, Fehrenbach 2001). Außerdem besitzen sie die Fähigkeit zu proliferieren und sich in Typ I Zellen umzuwandeln. Alveolarepithel II Zellen sind üblicherweise resistenter gegen Schädigung als Typ I Zellen.

Bei Verletzungen der Alveolenoberfläche oder bei Absterben von Typ I Zellen kommt es zu einer gesteigerten Proliferation von Typ II Zellen. (Mason, Williams 1977, Bowden 1981), bedingt durch eine Abnahme der Inhibition zur Proliferation von Typ I auf Typ II Zellen. Die Typ II Zellen sind also Progenitor Zellen für das Alveolarepithel Typ I (Fehrenbach 2001). Ihre Turnover Zeit, also ihre mittlere Lebensdauer beträgt zwischen 28 und 35 Tagen, kann jedoch reaktiv nach Schädigung des Alveolarepithels erheblich verkürzt sein. (Bowden 1983)

Entzündliche Veränderungen, die auch bei der Pathogenese eines Lungenemphysems eine Rolle spielen, können also auch zu einer Verminderung an Typ I Zellen führen und nachfolgend zu einer vermehrten Proliferation der Typ II Zellen.

Wichtig ist hierbei, dass es bei der stereologischen Analyse bei pathologischen Veränderungen zu Schwierigkeiten kommen kann, während einer möglichen Regeneration des Alveolarepithels, die Zellen zu klassifizieren (Ochs et al 2004).

Bei Betrachtung meiner Ergebnisse der Versuchsgruppen, ist eine leichte Zunahme der relativen Anteile am Septum sowohl der Epithel Typ I als auch der Typ II Zellen, jedoch mit einer Abnahme bei der 6 Monate alten Gruppe, danach einer erneuten Zunahme, zu beobachten.

Der relativ größte Anteil an AE I findet sich bei der 12 Monate alten Gruppe, die 3 Monate alte Versuchsgruppe weist den größten Anteil an Typ II Zellen auf.

Auch bei den Volumenberechnungen zeigt sich, dass die AE I Zellen im Lauf der Zeit zunächst an Volumen zunehmen, ebenso die AE II Zellen, dies sogar zunächst signifikant, jedoch mit erneutem Abfall bei der 6 Monate alten Versuchsgruppe und mit einer hohen Streuung.

Es offen ob es sich bei dieser beobachteten Streuung um eine biologische Variabilität handelt oder die untersuchten Präparate der Versuchsgruppen einen typischen Alterungsprozess, oder eine Emphysementwicklung zeigen.

Die Annahme, dass AE Typ II Zellen die Fähigkeit besitzen zu proliferieren und aus ihnen AE Typ I Zellen hervorgehen, lässt aber auch die Vermutung zu, dass es im Laufe der Entwicklung zu einer vermehrten Proliferation der AE Typ II Zellen gekommen sein könnte, mit einer nachfolgenden Umwandlung in Typ I Zellen. Dies würde für einen vermehrten Umsatz an AE Typ I und Typ II sprechen, also wie bei chronischer Infektion oder gesteigerten Reparaturmechanismen.

Ein SP-D Mangel, wie bereits erklärt, kann natürlich für eine chronische Infektion oder erhöhte Infektionsrate mit verantwortlich sein, da seine wichtigen Funktionen in der Immunabwehr, wie die Erkennung pathogener Oberflächenmerkmale oder Beeinflussung der Immunzellen im Hinblick auf Phagozytose, Agglutination oder Ausschüttung von Cytokinen ausfallen.

Die genaue Ursache für die Veränderungen der relativen und absoluten Volumenanteile am Alveolareseptum bei den Typ II Zellen, und für Ergebnisse der Epithel Typ I Zellen bleibt jedoch offen

Die zentrale Rolle des Surfactant Systems für die gesunde Funktion der Lunge ist bewiesen, abnorme Surfactant Funktionen, wie sie bei den SP-D ko Mäusen zu erwarten sind, müssen demnach zu Störungen führen.

Ob die leichte Zunahme der Alveolarepitheltellen Typ I und die Schwankungen der Alveolarepithelzellen Typ II Zellen jedoch im Zusammenhang mit der irregulären Surfactantfunktion steht kann anhand der erhobenen Daten nicht festgestellt werden.

Wie von Brown und Rannels dargestellt, könnten gesteigerte Reparaturmechanismen eine vermehrte Destruktion der Septen zunächst verdecken. Ein natürlicher Alterungsprozess wiederum tritt vermutlich erst nach dem 12. Lebensmonat der Mäuse ein, daher bieten meine Ergebnisse Möglichkeiten für weitere Untersuchungen und Fragestellungen, ohne die sich die Daten nicht weiter interpretieren lassen. (Brown LM, Rannels SR, Rannels DE. 2001).

Hierfür wäre interessant zu wissen, ob die Alveolartyp II Zellen einer vermehrten Mitose unterliegen oder es zu einer vermehrten Proliferation und daher Kompensation der Störungen kommt.

Kompensatorische Reparaturmechanismen bei Verlust an Gas-Austauschfläche wurden bereits in umfassenden Studien von Brown und Rannel in ihren komplexen Auslösemechanismen und Beeinflussungsmöglichkeiten an verschiedenen Säugetierspezies erforscht.

Brown et al zeigten 2002, dass eine transiente Hypoxie oder gesteigerter Blutstrom in den pulmonalen Gefäßen, wie es auch bei einem Lungenemphysem der Fall sein kann, ein kompensatorisches Wachstum, abhängig vom Alter, auslösen können. Physiologische Kompensationsmechanismen des Verlusts der Gasaustauschoberfläche basieren auf mehreren Mechanismen: der vollständigen Nutzung des verbliebenen Lungengewebes, einer Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes, sowie der Generierung neuer Gasaustauschareale. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der Alveolarisierung und der alveolären Differenzierung ebenso wenig verstanden wie die Reparatur und der Umbau bereits geschädigten pulmonalen Gewebes (Brown LM, Rannels SR, Rannels DE. 2001).

Das Aufdecken dieser Mechanismen könnte als einer der entscheidenden Schritte in der Entwicklung neuer Therapieansätze für chronisch-obstruktive, emphysematöse und fibrotische Lungenerkrankungen gelten (Bennett RA, Colony PC, Addison JL, Rannels DE; Berger LC, Burri PH. 1985) bei denen zu derartigen Kompensationsmechanismen kommt. Die Tatsache, dass in verschiedenen Säugetierspezies auch im Erwachsenenalter unter gewissen Umständen eine Rekonstitution des Lungenparenchyms und der gasaustauschenden Oberflächen stattfindet ( Laros CD,

Westermann C.J.J. 1987) legt die Existenz biologischer Regulationsmechanismen nahe, welche das Wachstum der Alveolen und die Neoalveolarisierung steuern. (Atabai K., Ishigaki M., Geiser T., Ueki I., Matthay MA, Ware LB. 2002)

Die weitere Spezifizierung der proliferierenden Zellen zeigte, dass alle wichtigen zellulären Kompartimente an dieser Proliferation beteiligt sind (Endothel, Bronchial- und Alveolarepithel, glatte Muskelzellen, Fibroblasten).

Burri et al. postulierten, dass Alveolen nur in Bereichen entstehen können, die wie die primären Alveolarsepten eine kapilläre Doppelmembran besitzen (Burri PH. 1997)

Diese befinden sich in der adulten Lunge an den Grenzflächen der Alveolen zu den großen Luftwegen, den großen Gefäßen und zu der Pleura.

Außerdem fielen bei weiteren Studien zur Regeneration geschädigter Alveolen Areale mit verdickten Alveolarsepten auf. Diese waren ebenfalls subpleural lokalisiert. Bindegewebefärbungen zeigten, dass die Verdickung durch eine Hyperzellularität bedingt war und nicht durch vermehrte Einlagerung von Extrazellulärmatrix. (Jankov RP, Luo X., Campbell A., Belcastro R., Cabacungan J., Johnstone L., Frndova H, Lye SJ, Tanswell AK. 2003 Mar 5)

Aus meinen erhobenen Morphometriedaten ergibt sich weder eine Vergrößerung der alveolären Oberfläche durch Neoalveolarisierung noch durch eine Generierung neuer Alveolarsepten, oder eine Vergrößerung bereits vorhandener Alveolen.

Die Möglichkeit, dass es bedingt durch einen frühzeitigen Verlust an Alveolarsepten durch erhöhte entzündliche Level, zu einer kompensatorischen Proliferation und regenerativem Wachstum kommt, besteht, ist jedoch anhand der erhobenen Daten nicht nachzuweisen.

Auch die anderen untersuchten Gewebeanteile können keine eindeutige Auskunft über mögliche Reparaturprozesse oder Proliferation geben. Hierzu wäre neben der histologischen Untersuchung auch eine funktionelle von Interesse gewesen, denn anhand dieser hätten Veränderungen in der Atemwegsphysiologie festgestellt werden können, die ebenso durch eine Destruktion der Alveolarsepten bedingt sind.

Im Hinblick auf die anatomische Definition des Emphysems reichen diese morphologischen Ergebnisse nicht aus, um eine Aussage treffen zu können, wodurch sie bedingt sind.

Eine Vergrößerung der Alveolen und Verdünnung der Septen, wie es bei einem Emphysem und auch beim physiologischen Altern zu erwarten gewesen wäre, hätte

eher zu einer Abnahme der Ergebnisse an Epithelzellen geführt, jedoch kann auch eine Abnahme der anderen Gewebetypen vorliegen, während das Epithel, zur Regeneration befähigt, davon nicht betroffen ist.

Nichtsdestotrotz erfordert eine verlässliche Diagnose des Emphysems eine Destruktion der Septen, eine Abnahme des Alveolenwandvolumens, der totalen alveolären Oberfläche und der Anzahl der Alveolen, sowie eine permanente Alveolarraumerweiterung.

### **5.3.2 Fibrozyten, Elastin, Kollagen**

Fibrozyten sind Bindegewebszellen, die vor allem in wachsendem Bindegewebe vorkommen. Morphologisch haben sie eine fortsatzreiche dünne Gestalt und breiten sich oft flächenhaft aus.

Wichtig ist, dass sie den Synthesort für Kollagen und Elastin darstellen, die den Hauptbestandteil des Bindegewebes in der Lunge bilden und somit für deren Spannung und Elastizität verantwortlich sind. (Leonhart 1990, Schiebler 1996).

Beim atrophischen Altersemphysem kommt es zu einer irreversiblen Schädigung der Alveolarwände primär durch einen Verlust an Elastin und dadurch zu einem Elastizitätsverlust und Erweiterung der Alveolarräume (Meyer 2005).

Im Alterungsprozess kommt es außerdem zu einer verminderten Synthese von Elastin und Kollagen, bedingt durch eine erhöhte Fibrozytenapoptose, auch dies geht mit einer zunehmenden Ridigität und Verlust an Elastizität einher.

Die Untersuchungen bei den SP-D ko Mäusen zeigen eine signifikante Abnahme der prozentualen Anteile am Septum bei den Fibrozyten. Bei den berechneten Volumina jedoch ist besonders zwischen den 28 Tage und 3 Monate alten Mäusen eine Volumenzunahme des Fibrozytenanteils zu sehen, die jedoch bei der ältesten Versuchsgruppe wieder rückläufig ist.

Dass es trotz dieses abnehmenden relativen Anteils zu einer geringen Zunahme der absoluten Menge, also zu einer Volumenzunahme kommt, liegt daran, dass es bei den älteren Mäusen auch zu einer Volumenzunahme des septalen Gewebes und der Lunge gekommen ist.

Dargestellt ist dies in Tabelle 44 des Ergebnisteiles, es handelt sich hierbei um Ergebnisse der Dissertation von Sarah Liefländer 2009.

Es zeigt sich also, dass sich durch die Änderung des Referenzraumes die Interpretation der relativen Ergebnisse erschwert. Daher ist es sinnvoll, die relativen Anteile der Struktur auf die Volumina des Referenzraumes zu beziehen, so dass man die absoluten Werte der Struktur von Interesse erhält.

Die absoluten Volumina der Fibrozyten zeigen hier eine geringfügige Zunahme, allerdings mit besonders bei der jüngsten Versuchgruppe, großen Schwankungen. Es ist also insgesamt von einer leichten Zunahme des Fibrozytenvolumens auszugehen.

Für die weitere Interpretation ist noch von Interesse sich die Fibrozytenfunktion anzuschauen.

Anhand der Volumenanteile von Elastin und Kollagen im Verlauf, kann vielleicht eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Fibrozyten in den verschiedenen Altersgruppen Syntheseleistungen erbringen mussten, die auf eine pathologische Entwicklung hindeuten.

Die mechanischen Eigenschaften und strukturelle Integrität der Lunge sind größtenteils durch Kollagen, Elastin und Proteoglykane bedingt. Die Kollagenfasern bilden das strukturelle Gerüst der Lunge, die Elastinfasern sichern die elastischen Rückstellkräfte. Elastin ist in den Alveolen, Alveolargängen, den Bronchien und der Pleura vorhanden. Die Elastin Synthese durch Fibrozyten ist in der fetalen und neonatalen Phase am größten und wird im erwachsenen Alter minimal.

Pathologische Umstände, wie ein Emphysem oder eine Lungenfibrose könnten die Elastin Synthese wieder reaktivieren, allerdings finden sich hier die Elastinfasern in einem nicht funktionsfähigem Zustand, da davon auszugehen ist, dass die erwachsene Lunge nicht in der Lage ist, den Anordnungsmechanismus der Fasern wiederherzustellen.

Einige Studien haben einen Elastinabbau im Zusammenhang mit der Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen gezeigt.

Dieser kommt durch einer ansteigenden Expression von Proteasen und abnehmenden Aktivität von Antiproteasen, also eine fehlende Balance dieser Enzyme zustande.

In Mausmodellen konnte ebenso ein Zusammenhang zwischen von Makrophagen produzierter Metalloelastase, Neutrophiler Elastase, Cathepsin S (lysosomales Endopeptidase aus aktivierten Makrophagen) und Metalloproteinase 9 (Elastinolytische Kollagenase) und der Entwicklung eines Emphysems gezeigt werden.

Eine Verschlimmerung des Krankheitsprozesses ist bedingt durch die Unfähigkeit der Fibrozyten, Elastinfasern zu reparieren; es kommt zu einer zunehmenden Degeneration. Elastinfasern gehören zu der Matrixstruktur, die am schwersten zu reparieren ist, bedingt durch ihre Größe, ihre molekulare Komplexität und ihren hohen Proteinbedarf während ihrer Homeostase (Pierce R.A et al, Shifren A, et al).

Die Ergebnisse bei den 4 Versuchsgruppen der Sp-D ko Mäuse zeigen hier nicht signifikante Veränderungen bei den relativen Anteilen von Elastin und einen insgesamt signifikanten Anstieg bei Kollagen, mit einem Maximum bei den 6 Monate alten Tieren und einem leichten Abfall zu den 12 Monate alten Tieren. Bei den Volumina zeigt sich ein ähnlicher Verlauf, mit einem leichten Anstieg von Elastin zwischen der 28 Tage alten Versuchsgruppe und der 3 Monate alten, und dann einer gleich bleibenden Entwicklung, und einem signifikanten Anstieg bei Kollagen, so dass insgesamt von einer Zunahme an Kollagen ausgegangen werden kann, allerdings mit einer Abnahme zu der ältesten Versuchsgruppe hin

Dieses Ergebnis passt zu dem der Fibrozyten. Bei ihnen kommt es zu keiner signifikanten Veränderung im Volumenanteil und auch bei ihrem Syntheseprodukt Elastin kommt es zu keiner signifikanten Veränderung. Es scheint also zunächst keine Destruktion der Alveolarsepten vorzuliegen, wobei natürlich eine genauere Untersuchung der Elastinfasern im Hinblick auf abnormale Formation und Synthese vonnöten wäre, ebenso eine Untersuchung der Expressionsrate von Tropoelastin, dem Vorläufer von Elastin, um tatsächlich beurteilen zu können, ob nicht ein Ungleichgewicht zwischen Elastindestruktion und fehlerhafter Neusynthese vorliegt.

Eine erhöhte Proteaseaktivität durch Makrophagen, wie sie bei einem Lungenemphysem zu finden ist, würde eben zu einer Parenchymdestruktion auch durch Elastinverlust führen.

Bei einem SP-D Mangel ist eine erhöhte Anfälligkeit für solch einen Pathomechanismus zu erwarten, dazu müsste jedoch genauer die Makrophagenaktivität und deren Enzymausschüttung untersucht werden.

Der leichte Anstieg des Kollagenvolumens spricht für eine erhöhte Synthese von Kollagen, wie sie bei einem Emphysem zu finden ist, häufig als subepitheliale Kollagenablagerung.

Dies ist typischerweise bei Emphysepatienten zu finden, bei denen es trotz der Abnahme des Alveolarraumes zu einer Verdickung der Septen durch eine Vermehrung der kollagenen Fasern kommt, also zu einer zunehmenden Fibrosierung.

Die aus Makrophagen und Neutrophilen freigesetzten Enzyme wie Elastase und Protease greifen in der Lunge nämlich nur das Elastin, nicht aber das Kollagen an.

Die so entstehenden Elastinfragmente wirken wiederum chemotaktisch auf Monozyten, so dass es bei einem Ungleichgewicht an Proteinaseinhibitoren zu Proteinasen zu einer progredienten proteolytischen Zerstörung kommt. In der vorliegenden Studie ist Zielsetzung gewesen den SP-D Mangel im Zusammenhang mit pathogenen Entwicklungen in der Morphologie der Septen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen im Bezug auf Elastin, Kollagen und Fibrozyten keine eindeutig durch den SP-D Ausfall induzierte Emphyseentwicklung. Auch ein Alterungsprozess lässt sich nicht eindeutig nachweisen. Eine leichte Zunahme des Kollagens könnte einen Hinweis auf eine Dysregulation zwischen Entzündung und Reparaturmechanismen hinweisen, also eine leichte Fibrosierung, wie es bei einer chronischen Infektion der Fall wäre, aber das lässt sich nicht eindeutig beweisen.

### **5.3.3 Endothelzellen**

Sie gehören mit den Epithel Typ I Zellen zur Blut-Luft Schranke und stellen den beim Gasaustausch wichtigen Diffusionsweg des Sauerstoffes in die Gefäße und des Kohlendioxids aus den Gefäßen heraus dar. An dieser Stelle beträgt der Diffusionsweg lediglich unter 100 Nanometer. Das Kapillarlumen und die Alveolarlichtung sind praktisch nur durch eine gemeinsame Basallamina getrennt. Die Blut-Luftschranke weist einen typischen Schichtenbau auf: Cytoplasma der Endothelzelle, die miteinander verschmolzene Basalmembran des Endothels und der Alveolarepithelzelle vom Typ I sowie das Cytoplasma dieser Zelle.

Zu Veränderungen im pulmonalen Kapillarbett kann es aus mehreren Gründen kommen.

Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, COPD oder dem Lungenemphysem kann es bedingt zum einen zu einem Verlust an Gas-Austauschregionen durch eine zunehmende Destruktion der Septen, also Verlust an Alveolaroberfläche kommen zum anderen durch eine Vergrößerung des funktionellen Totraums zu einer Hypoventilation in den Alveolen. Bedingt durch den Euler-

Liljestrand Mechanismus führt dies zunächst zu einem kompensatorischen Vasospasmus. Bei einer Chronifizierung dieses Zustandes verursacht der kapilläre Vasospasmus einen gesteigerten pulmonalen Widerstand, der schließlich zu einem kapillären Umbau führen kann also zu einem Verlust des pulmonalen Kapillarbett.

Die Volumina der Endothelzellen zeigen einen signifikanten Anstieg zwischen der jüngsten Versuchsgruppe mit 28 Tagen, von 16, 29 mm<sup>3</sup> und der 3 Monate alten Versuchsgruppe auf 26,71 mm<sup>3</sup> an, danach bleiben die Werte auf etwa gleichem Niveau.

Durch die Auswertung des Endothelanteils erhofften wir uns Erkenntnisse darüber, ob das Kapillarbett im Verlauf Veränderungen aufweist, die mit einer Emphysementwicklung in Zusammenhang stehen können; beispielsweise eine Abnahme des Endothels, oder eine vermeintliche Destruktion des Kapillarbettes und ob diese mit Veränderungen der anderen Parameter assoziiert ist oder es diesbezüglich Unterschiede in den verschiedenen Altergruppen gibt. Es zeigte sich, dass sich der Endothelanteil zunächst signifikant erhöhte, dann aber, ab einem Alter von 3 Monaten keine Veränderungen zeigte

Mit etwa 2 bis 3 Monaten werden die Mäuse geschlechtsreif (Kawakami et al 1984).

Veränderungen nach dem Erreichen der Endgröße der Mäuse und dem Abschluss der Entwicklung können als Alterungsprozesse bezeichnet werden. Diese sind zum einen durch genetische Einflüsse bedingt aber auch moduliert von äußeren Faktoren.

Eine Abnahme der Volumina der Endothelzellen liegt nicht vor, dies hätte Hinweise auf eine Alveolardestruktion im Rahmen des Alterungsprozesses oder eine pathologischen Veränderung der Alveolarsepten geben können.

#### **5.4 Klinisch relevante Aspekte**

Pulmonales Surfactantprotein D ist in seiner optimalen Funktion in den Alveolen wichtig für eine Stabilisierung der leitenden Luftwege, und sichert die Aufrechterhaltung des Oberflächenfilms bzw. der Oberflächenspannung. Außerdem ist es bei der Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Allergenen beteiligt und hat wichtige immunmodulatorische Eigenschaften. Bei einer emphysematösen Entwicklung ist es in vivo Studien bei denen eine Surfactant Protein Dysfunktion vorliegt, bewiesenermaßen beteiligt. Die durchgeführte Studie kann dies nicht belegen, allerdings

sind noch genauere Untersuchungen vonnöten, um entzündliche Prozesse oder den Beginn einer Emphysembildung tatsächlich auszuschließen und von einer normalen Lungenalterung abzugrenzen. Verschiedene Forschungsgruppen demonstrierten, dass Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen mitunter Abnormalitäten ihres SP-D Haushalts zeigen (Hirama et al 2007).

Therapeutisch ist es also von großem Interesse, den Nachweis zu erbringen, dass SP-D ko Tiermodelle tatsächlich als Emphysemmodell gelten können, da so die Möglichkeit bestünde, exogen Surfactant Proteine zuzuführen oder das Surfactantsystem endogen zu stimulieren und damit wieder eine optimale Funktion zu erreichen und so einen Benefit für Emphysepatienten zu ermöglichen, durch eine reversible Atemwegsobstruktion.

#### **5.4.1 Möglichkeiten weiterer Untersuchungen**

Eine Veröffentlichung von Jeffrey A. Whitsett beschäftigte sich mit einer ähnlichen Studie, auch hier wurden SP-D knockout Mäuse in unterschiedlichen Altersgruppen untersucht, allerdings wurden die Alveolarsepten und deren einzelne Bestandteile morphologisch in tiefer gehendem Ausmaß im Hinblick auf pathologische Veränderungen bei SP-D Mangel auch auf molekularer und physiologischer Ebene untersucht.

Diese Untersuchungsansätze sind im Folgenden dargestellt.

##### **5.4.1.1 Morphologie**

Seine morphologischen Untersuchungen der Alveolen zeigten erste Abnormalitäten ab einem Alter von etwa 14 Tagen mit ansteigenden Zahlen an Alveolarmakrophagen. Diese veränderten sich in atypische, vergrößerte Makrophagen, im Alter von etwa 3-6 Wochen. Auch die Alveolarräume begannen sich in diesem Zeitraum zu vergrößern, besonders im Alter von etwa 12 Wochen. Akkumulierende Makrophagen, Monozyteninfiltrate und weiterhin sich vergrößernde Alveolen, letzteres allerdings in moderatem bis ausgeprägtem Ausmaß, wurden im Altern von 6-7 Monaten beobachtet. Bei den 7 Monate alten SP-d(-/-) Mäusen kam es zu fibrotischen Läsionen, die besonders kollagenhaltig waren. Außerdem kam es zu Störungen in der

Elastinzusammensetzung, so dass Septen mit kurzen dicken Elastinfasern, die öfter spiralisiert waren, beobachtet werden konnten, neben solchen, in denen es zu einer Abnahme an Elastin kam, besonders in der Nähe entzündlicher Prozesse und Makrophagenakkumulation.

Die Alveolartyp II Zellen zeigten keine charakteristischen morphologischen Unterschiede zu SP-D (+/+) Mäusen.

Zieht man diese Studie zum Vergleich heran, zeigen die erlangten Ergebnisse eine minimal ähnliche Tendenz. Kollagenhaltige Läsionen, könnten auch bei den Versuchsgruppen im Lauf der Zeit zu dem leichten Anstieg des Kollagenvolumens geführt haben. Allerdings zeigt sich, dass meine Untersuchungen nicht ausreichend sind, um diesen weiteren Fragestellungen nachgehen zu können. Eine Untersuchung der molekularen und physiologischen Mechanismen wurde nicht durchgeführt. Die Möglichkeit die Ergebnisse zu interpretieren sind limitiert. Zum einen wurden die Untersuchung nicht in engeren Zeitabschnitten durchgeführt, so dass etwaige Veränderungen verloren gegangen sein könnten, zum anderen lässt die Methode der Stereologie offen, ob es beispielsweise Strukturen gab mit fibrotischen Läsionen oder solche an denen weniger Kollagen zu finden war, oder eine Akkumulation von einer Zellart, anderorts wiederum keine dieser Zellarten zu finden waren. Es ist eine quantitative Methode die Morphologie der Alveoralsepten zu erfassen.

So bleibt offen, ob sich beispielsweise bei der Zusammensetzung des Elastins etwas verändert hat, oder ob es zu Regionen einer Elastinzunahme und Regionen einer Elastinabnahme gekommen ist.

Die Anzahl an untersuchten Versuchstieren ist zu gering, eine Kontrollgruppe fehlt.

#### **5.4.1.2 Makrophagen**

Desweiteren wäre es interessant zu wissen gewesen, ob es zu Veränderungen in der Makrophagenaktivität gekommen ist, die ursächlich für eine Elastinabnahme sein könnte. Whitsett hat sowohl die Morphologie der Makrophagen als auch deren Anzahl und Größe untersucht. Er beobachtete eine 4-fach erhöhte Makrophagenzahl im Vergleich zu normalen Mäusen, und eine Vergrößerung der Zellen.

Um jedoch eine genaue Aussage treffen zu können, wurde noch die Makrophagenaktivität gemessen, also zum einen Cytokine, und von Makrophagen produzierte Enzyme wie Hydrogenperoxid und Metalloproteinasen.

Im Alter von 6-9 Wochen zeigten die Lungen der SP-D (-/-) Mäuse keine entzündlichen Level der proinflammatorischen Cytokine; die Oxiadantienproduktion (Hydrogenperoxid und Superoxid) der Makrophagen jedoch war bereits 10fach angestiegen. Die Makrophagenaktivierung war also extrem erhöht. Daneben wurden außerdem Metalloproteinasen gemessen, besonders 9 und 2, die an der Pathogenese des Lungenemphysems beteiligt sind. Auch diese und die Makrophagenmetalloelastase, MME, zeigten erhöhte Level.

Die Makrophagenakkumulation, der Umbau der Lunge und ein später moderater Anstieg der proinflammatorischen Zytokine lassen Whittsett auch im Hinblick auf die histologischen und morphologischen Ergebnisse den Schluss zieht, dass SP-D (-/-) Mäuse als Modell für ein Lungenemphysem gelten.

Whittsetts Ergebnisse zeigen also erneut wie in der Einleitung beschrieben die Rolle des SP-D für die Modulation der Makrophagen Aktivität, deren Oxidantienproduktion, die zu einer Proteaseaktivierung führt und im Übermaß letztendlich zu einem Emphysem und Fibrose.

Ob die Zytokine oder die Oxidantien dafür verantwortlich sind, bleibt ungeklärt. Erstaunlicherweise zeigen sich bei Whittsets Mäusen keine Zeichen einer Infektion, obwohl die Rolle des SP-D für die Immunabwehr bewiesen scheint. Ob der SP-D Mangel nun tatsächlich im ursächlichen Zusammenhang mit chronischen Lungenerkrankungen steht und zu einer progredienten Entzündungen oder zu der Entwicklung eines Emphysems oder einer Fibrose beiträgt, ist dabei noch ungeklärt.

Aus lichtmikroskopischen Untersuchungen der Lungen meiner Versuchsgruppen der SP-D knockout Mäuse, die im Rahmen der Dissertation von Sarah Liefländer 2008 in Lübeck durchgeführt wurden, ergeben sich ergänzend im Hinblick auf die Makrophagenvolumina die in Tabelle 43 dargestellten Ergebnisse.

Es zeigt sich, dass es eine Zunahme der Volumina der Makrophagen gibt. Wie bereits erwähnt, liegt auch eine Zunahme der Volumina der Alveolarsepten und der Lungenvolumina vor, so dass es sich auch um eine physiologische Zunahme der Makrophagenvolumina handeln kann. Die Werte unterliegen zudem großen Schwankungen, die durch die hohe Standardabweichung in der 12 Monate alten Gruppe ersichtlich wird.

Whitsetts Studie ermöglicht durch die Messungen der Makrophagenaktivität eine weiterreichende Interpretation. Meine Studie hingegen lässt zwar die Vermutung zu, dass es zu einer erhöhten Makrophagenzahl gekommen ist, jedoch bleiben genau Aussagen verwehrt.

Whitsetts Studie lässt für meine Untersuchungen also viele Fragen offen. So wäre eine genaue Untersuchung der Makrophagenaktivität wichtig, um eine Aussage über mögliche inflammatorische Prozesse treffen zu können.

Messungen der Oxid Produktion oder ansteigende Zahlen an Makrophagen könnten das Konzept der antiinflammatorischen SP-D Funktion, in vivo unterstützen oder widerlegen.

In anderen Tiermodellen ist der Zusammenhang zwischen Oxidantien und der Entwicklung eines Emphysems oder einer Fibrose belegt.

Die Aktivierung und lokale Konzentrationsanstiege der Metalloproteinasen -2 und -9 stehen ebenso in Zusammenhang mit einem SP-D Defizit wie Veränderungen anderer Proteasen und Antiproteasen. Diese wiederum sind mit der Pathogenese des Lungenemphysems und pulmonaler Fibrose assoziiert.

#### **5.4.1.3 SP-A**

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der noch diskutiert werden kann, ist die Rolle des SP-A bei pulmonalen Erkrankungen, wie Infektionen, Entzündungen oder Allergien. Wie bereits in der Einleitung erwähnt hat auch das SP-A eine antimikrobielle Funktion, indem es Pathogene agglutiniert, und Neutrophile und Makrophagen aktiviert und rekrutiert und die Phagozytose und Produktion von Superoxiden verstärkt. Außerdem hat das SP-A einen direkten inhibitorischen Einfluss auf mikrobiologisches Wachstum. Entzündungsprozesse in der Lunge sind von zwei Seiten zu Betrachten, zum einen als Prävention ernsthafter Infektionen, jedoch auch als Risiko einer Schädigung des Lungengewebes. Die Aktivität der Immunabwehr muß demnach einer strikten Kontrolle unterliegen und es muss anti-inflammatorische Mediatoren geben, die entzündliche Reaktionen modulieren. Wahrscheinlich wird dies unter anderem auch durch SP-D und SP-A erreicht, die die initiale Immunantwort beeinflussen. Allerdings können Pathogene auch die Überhand gewinnen und proliferieren, so dass es zu pro-inflammatorischen Prozessen kommt; hierbei nehmen SP-D und SP-A wiederum eine andere Funktion ein und unterstützen diese pro-inflammatorische Antwort.

Nun stellt sich die Frage, ob die SP-D (-/-) Mäuse allein aufgrund des SP-D Defizits eine pathologische Immunantwort haben müssen und eine dadurch bedingte erhöhte Infektionsrate. Whittsets Studie zufolge steht dies im Zusammenhang, jedoch lassen seine Ergebnisse auch noch den Schluss zu, dass andere Faktoren bei pathologischen Mechanismen, die zu einem Lungenemphysem führen, eine ebenso große Rolle spielen. So kann es sein, dass es durch eine verstärkte SP-A Synthese zu anderen Reaktionen kommt, als anfänglich erwartet, beispielsweise könnten die anti-oxidativen Eigenschaften des SP-A eine erhöhte Oxidantien synthese der Makrophagen wieder auf normale Level regulieren.

Whittset hat hierzu die SP-A Level in den Sp-D (-/-) Mäusen untersucht und beobachtet eine Abnahme, sowohl der mRNA als auch des SP-A Proteins in der BAL. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass SP-D eine regulatorische Funktion in der SP-A Produktion übernimmt und daher die Immunabwehr zu einen dadurch, zum anderen durch direkte Interaktion mit Immunzellen und Pathogenen, beeinflussen kann.

Interessant wäre für diese Versuchsgruppen daher eine Untersuchung der SP-A Level gewesen, um Whittsets Aussage zu bestätigen, und auszuschließen, dass eine eventuell erhöhte SP-A Produktion die pathologischen Prozesse, bedingt durch den SP-D Mangel, moduliert und es daher zu keinen morphologischen Veränderungen kommt.

Trotz vieler Studien auf diesem Feld ist das Verständnis für die molekularen und physiologischen Mechanismen, wie die SP-A Expression in Gesundheit und Krankheit regulieren und die Immunmechanismen, die durch SP-A und auch SP-D während einer Infektion getriggert werden, noch nicht genau definiert. Auch die Beziehung von SP-A, SP-D und anderer Chemokine und Cytokine unterliegt vielen Faktoren, die noch weiterer Untersuchung bedürfen.

#### **5.4.2 Ausblick**

Meistens sind Surfactant Fehlfunktionen nicht Ursache für pathologische Entwicklungen, führen jedoch zu einem Progress der Erkrankung:

Eine reduzierte Lungencompliance, bedingt durch eine herabgesetzte Oberflächenspannung, steigende Alveolarpermeabilität, die zu einem pulmonalen Ödem führen kann, und eben eine veränderte Immunfunktion, die zu einem gesteigerten Infektionsrisiko führen kann.

Daher ist es von immenser Bedeutung seine komplexen Interaktionen auf humoraler, immunologischer und vaskulärer Ebene besser zu verstehen und in die Entwicklung effektiver therapeutischer Strategien mit einzubeziehen( Orgeig S. Daniels C.B. 2004).

### **5.5 Zusammenfassung**

Die vorgelegte Arbeit hat zum Ziel, die Alveolarsepten männlicher SP-D knockout Mäuse hinsichtlich morphologischer Veränderungen zu analysieren. Pulmonales Surfactant und seine Proteine haben vielfältige Funktionen. Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt reduziert es zum einen die Oberflächenspannung der Alveolen, zum anderen sind die Surfactant Proteine SP-A und SP-D an der Surfactant Homöostase und der angeborenen sowie adaptiven Immunabwehr der Lunge wesentlich beteiligt. Das SP-D agglutiniert Pathogene, und beeinflusst Makrophagen zur Phagozytose und moduliert darüber hinaus direkt die Aktivität von Zellen des Immunsystems. SP-D kommt somit eine Schlüsselposition in der Vermittlung von Erregerabwehr, Regulation des Immunsystems, Infektiosität von Pathogenen, Entzündung und allergischen Reaktionen zu (Kishore et al 2006, Kingma, Whitsett 2006, Takahashi et al 2006).

Es hat sich herausgestellt, dass das SP-D die Pathogenese chronischer Atemwegserkrankungen, wie das Lungenemphysem, die COPD oder Asthma bronchiale beeinflussen kann, indem es sowohl die chronische Entzündung reduziert, als auch die Entstehung von oxidativem Stress und den Proteasen-/Antiproteasenhaushalt moduliert. Pathologische Veränderungen der Lunge bei Studien mit SP-D-knockout Mäusen entsprechen in etwa denen bei einer COPD: eine chronische Entzündung, sowie eine Hypertrophie und Hyperplasie der Alveolarepithel Typ II Zellen, vergrößerte Makrophagen, verminderte und vergrößerte Alveolen und eine verringerte Alveolaroberfläche. SP-D und SP-A ähneln sich in ihren Effekten der Pathogen Clearance. Die Lungen bei SP-D knockout Mäuse zeigten in Studien jedoch eher eine Tendenz eine emphysemähnliche Morphologie zu entwickeln. (Hohlfeld et al 2003).

Einen größeren Teil nimmt das SP-D bei der Beseitigung apoptotischen Zellmaterials ein (Palaniyar et al 2004, 2005). Wie LeVine et al zeigen konnten, produzierten SP-A defiziente Versuchstiere nach bakterieller Infektion weniger oxidative Enzyme, bei SP-D defizienten Mäusen war die Produktion jedoch gesteigert (LeVine et al 2000). Daraus

ergibt sich, dass SP-D bei der Entstehung parenchymdestruktiver Prozesse des Emphysems eine größere Rolle spielt.

Des Weiteren wurde schon im Bronchial- und Alveolarsekret von gesunden Rauchern ein verminderter Gehalt an SP-D entdeckt und hierbei geschlechtsabhängige Unterschiede (Hirama et al 2007). Interessanterweise zeigten sich bereits bei gesunden Frauen im Vergleich zu Männern erniedrigte SP-D Level und eine schnellerer und schwerer Verlauf der COPD bei Frauen. (Heidinger et al 2005, Sorensen et al 2005). Die Vermutung, dass die unterschiedlichen SP-D Level die Entstehung von Lungenerkrankungen wie dem Emphysem oder chronischen Entzündungen beeinflussen, liegt also nahe.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag deshalb auf der Untersuchung der Konsequenzen eines Mangels an SP-D. Die Hypothese war dementsprechend, dass die Versuchstiere auf den SP-D knockout mit einer veränderten Morphologie der Alveolarsepten reagieren.

Während die Lungen der Versuchstiere im Rahmen der Promotion von Sarah Liefländer 2008 in Lübeck am Lichtmikroskop quantitativ-morphologisch untersucht wurden, beschäftigt sich diese Arbeit primär mit der quantitativen Analyse dieser Lungen am Transmissionselektronenmikroskop.

Es wurden die Lungen von 22 Versuchstieren, männlichen SP-D knockout Mäusen, im Alter von 28 Tagen, 3, 6 und 12 Monaten mit stereologischen Verfahren (siehe Methoden) auf quantitative Veränderungen der Alveolarsepten untersucht. Durch die Einbeziehung verschiedener Altersgruppen können zu der Analyse der Alveolarmorphologie auch Rückschlüsse auf mögliche emphysematöse Veränderungen oder eine Progression dieser Veränderungen der Lungen mit fortschreitendem Alter der Mäuse gezogen werden, ebenso können mögliche alterbedingte Veränderungen der Alveolarsepten analysiert werden.

### **5.5.1 Ergebnisse**

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse zum einen keine eindeutigen Hinweise auf eine Zerstörung der Alveolarsepten im Sinne der Emphysementstehung geben, aber auch keine typischen Zeichen einer Lungenalterung zeigen. Durch die schwierige Differenzierung zwischen den altersbedingten

Veränderungen und denen die einzig auf einen SP-D Mangel zurück zu führen sind, und durch die Frage inwieweit sich diese gegenseitig beeinflussen, war es in dieser Arbeit erschwert Rückschlüsse auf den generellen Einfluss eines SP-D Mangels auf den Organismus der Versuchstiere zu ziehen. Hierzu wäre es sinnvoll gewesen auch entsprechende Wildtypgruppen zu untersuchen. Eine Untersuchung der physiologischen, humoralen und molekularen Ebene fehlt, so dass hier ebenso Möglichkeiten weiterer Experimente bestehen.

Die zellulären Volumina nehmen im Lauf der Zeit zu, nur bei Alveolarepithel Typ II Zellen wäre das typisch für eine Emphysementwicklung, es kommt also eher nicht zu einer Epithelzelldegeneration oder zu einer Destruktion des Kapillarbettes. Bei den Volumina der extrazellulären Matrix nimmt nur der Anteil des Kollagens zu. Bei einer Verdickung der Alveolarsepten im Sinne einer Fibrose mit Vermehrung der kollagenen Fasern würde das zu einer Emphysementwicklung passen. Obwohl es keine eindeutigen Hinweise auf eine pathologische Entwicklung der Ultrastruktur der Alveolarsepten bei einer SP-D Dysfunktion in diesem in vivo Modell der SP-D knock-out Mäuse zu geben scheint, geben die Ergebnisse bisheriger veröffentlichter Studien Anlass, eine Surfactant Protein Dysfunktion mit pathophysiologischen Mechanismen in Zusammenhang zu bringen. Daher ist es gerechtfertigt die wichtige Rolle der Surfactantproteine im Hinblick auf Therapiemöglichkeiten chronischer Erkrankungen weiter zu untersuchen.

### **5.5.2 Schlusswort**

Klinisch relevant ist die vorliegende Arbeit aktuell für eine mögliche Anwendung von SP-D in der Behandlung verschiedener chronischer Lungenerkrankungen, bei denen hierdurch eine Unterstützung des Immunsystems erreicht werden könnte und die Infektionsraten der Patienten reduziert, bzw. vermieden werden könnten. Die Pathogenese scheint durch SP-D Therapie beeinflussbar. Berichte über die therapeutische Anwendung von SP-D liegen jedoch nicht vor, da die anwendbaren Surfactant Therapeutika aufgrund der Herstellungsverfahren fast kein SP-D enthalten (Reid et al. 2005) und es mangels Studien wenig Erfahrung mit therapeutisch angewandtem rekombinantem Surfactant gibt (Hartl et al. 2006).

Im Detail sind also die Eigenschaften des SP-D in Pathomechanismen und Salutogenese weitgehend unklar (Kishore et al. 2006) hier bieten sich viele Möglichkeiten weiterer Untersuchungen.

## 6.Literaturverzeichnis

- Adamson IYR, King GM.: Postnatal development of the rat lung following retarded fetal lung growth (1988) *Pediatr Pulmonol* 4: 230- 236
- Ansari MA, de Mello DE, Devaskar UP.: Effect of prenatal glucocorticoid on fetal lung ultrastructural maturation in hyt/hyt mice with primary hypothyroidism, (2000) *Biol Neonate* 77 (1): 29- 36
- Atabai K, Ishigaki M, Geiser T, Ueki I, Matthay MA, Ware LB.: Keratinocyte growth factor can enhance alveolar epithelial repair by nonmitogenic mechanisms, (2002) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283 (1): L 163-9
- Bachofen M, Bachofen H: Fixation of human lungs, (1990) *Lung biology in health and disease. Vol. 47: Models of lung disease. Microscopy and structural methods*; hrsg. V. GIL J; Marcel Dekker, New York 23-36
- Bachofen H, Ammann A, Wangenstein D, Weibel ER. : Perfusion fixation of lungs for structure-function analysis; credits and limitations,(1982) *J Appl Physiol* 53, 528-533
- Bennett RA, Colony PC, Addison JL, Rannels DE. : Effects of prior adrenalectomy on postpneumectomy lung growth in the rat, (1985) *Am J Physiol* 248: E70- E74
- Barlett D. Jr.: Postnatal growth of the mammalian lung: Influence of low and high oxygen tensions, (1970) *Respir Physiol* 9, 58- 64
- Barlett D.: Postnatal growth of the mammalian lung: Influence of excess growth Hormone, (1971) *Respir Physiol* 12, 297- 304
- Berger LC, Burri PH.: Timing and quantitative recovery in the regenerating rat lung,(1985) *Am Rev Respir Dis* 132, 777- 783
- Bernard S, Leblanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, Maltais F: Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease, (1998) *Am J Respir Crit Care Med* 158, 629-634
- Benninghoff, Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Bd1,13../14. Auflage von 1985
- Botas et al: Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D, (1998) *Proc. Natl. Am. Sci. USA* 95, 11869-11874
- Breitbach C: Zur mikroskopischen Anatomie der Lunge von Ratte, Maus, Meer-

- Schweinen und Kanninchen  
Veterinärmedizinische Dissertationsarbeit, München, (1986)
- Brown LM, Rannels SR, Rannels DE.: Implications of postpneumonectomy compensatory lung growth in pulmonary physiology and diseases, (2001) *Respir. Res.* 2, 340- 347
- Burri PH. : The postnatal growth of the rat lung. III. Morphology, (1974) *Anat Rec* 180, 77- 98
- Burri PH.: Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung, (1997) McDonald JA, Lenfant C (ed.). *Lung Biology in Health and Disease*. New York: Dekker Inc. 100, p 1- 32.
- Clark, Reid: The potential role of recombinant surfactant protein D therapy to reduce inflammation in neonatal chronic lung disease, cystic fibrosis, and emphysema (2003) *Arch Dis. Child* 88, 981-984
- Crapo J, Young S, Fram E, Pinkerton K, Barry B, Crapo R et al:  
Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs (1983) *Rev. Respir Dis* 128, 42-46
- Crouch EC.: Biosynthesis and Secretion of Surfactant Protein D, (1998) Rooney et al  
*Lung Surfactant: Cellular and Molecular Processings* R.G. Landes Company
- Crouch EC. : Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D), (1998) *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3): 278-89.
- Crouch EC.: Surfactant protein-D and pulmonary host defense, (2000) *Respir Res* 1(2) 93-108.
- Cruz-Orive LM, Weibel ER: Recent stereological methods for cell biology: a brief survey, (1990) *Am J Physiol* 258, L 148-L156
- Cruz-Orive LM, Weibel ER: Sampling designs for stereology, (1981) *J Microsc* 122, 235-257
- Dawkins PA, Stockley RA: Animal models of chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax* (2001) 56: 972-977
- Duncker HR: Atemapparat, In: Benninghoff-Anatomie, 15. Aufl. 1994;  
Urban&Schwarzenberg
- Drenckhahn D: Zellenlehre, In: Benninghoff-Anatomie, 15. Aufl. 1994;  
Urban&Schwarzenberg
- Faller A. , Schünke M.: *Der Körper des Menschen*. Thieme, Stuttgart (1999)

- Fehrenbach H: Die Rolle des Pneumozyten Typ II als Wächter des Alveolus: Funktionsmorphologische Aspekte. (2000) Biol. Habilitationsschrift Dresden
- Fehrenbach H : Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. (2001) *Respir Res* 2(1): 33-46.
- Fehrenbach H und Ochs M. :Studying Lung Ultrastructure, (1998) In *Methods in Pulmonary Research* Uhlig & Taylor; Birkhäuser Basel: 429-54.
- Gilbert KA, Rannels DE. From Limbs to Lungs: A Newt Perspective on Compensatory Lung Growth, (1999) *News Physiology Science* Volume 14
- Guerrassimov et al: The Development of Emphysema in Cigarette Smoke-exposed Mice is Strain Dependent, (2004) *Am J Respir Crit Care Med* 170: 974-980
- Gu H, Marth JD, Orban PC, et al: Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting, (1994) *Science* 265: 103-106
- Gross P, Pfitzer E, Tolker M, et al: Experimental emphysema: Its production with papain in normal and silicotic rats, (1965) *Arch Environ Health* 11: 50-58
- Hartl, Griese: Surfactant protein D in human lung disease, (2006) *European Journal of Clinical Investigation* 36: 423-435
- Hamm H, Kroegel C, Hohlefeld J:  
Surfactant: a review of its function and relevance in adult respiratory disorders, (1996) *Respir. Med* 90:251-270
- Harding R, Pinkerton KE, Plopper CG und al: The Lung. Development, Aging and the Environment ,(2004)Elsevier Academic Press, London
- Hirama, N., Y. Shibata, K. Otake, J. Machiya, T. Wada, S. Inoue, S.Abe, N. Takabatake, M Sata und I. Kubota:  
Increased surfactant protein foamy macrophages in smoking induced mouse Emphysema, (2007) *Respirology* 12(2):191-201
- Hogg JC, Senior RM: Chronic obstructive pulmonary disease c2: pathology and biochemistry of emphysema, *Thorax* 2002; 57: 830-834
- Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, et al.: Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors, (2006) *Mol Immunol* 43(9): 1293-315.
- Jankov RP, Luo X, Campbell A, Belcastro R, Cabacungan J, Johnstone L,

- Frndova H, Lye SJ, Tanswell AK.: Fibroblast Growth Factor Receptor- 1 and Neonatal Compensatory Lung Growth after 95% Oxygen Exposure,(2003)Am J Respir Crit Care Med Mar 5 (epub ahead of print)
- Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, et al: Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localisation of the instilled elastase, (1977)Am Rev Respir Dis; 115: 461
- Junqueira, Careneiro, Schiebler: Histologie, Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 4. Auflage; Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York; 1996: 438-464
- Kingma, Whitsett: In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D, (2006) Curr Opin Pharmacol, 6 (3): 277-283
- Kay JM: Blood Vessels of the Lung. In: Parent RA (Hrsg.) Treatise on pulmonary toxicology, (1992) Volume I. Comparative biology of the normal lung. CRC Press, Inc.; 163-172
- Kingma P.S., und J.A. Whittsett: In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D, (2006) Curr Opin Pharmacol 6(3): 277-832
- Kishore U., A.L. Bernal, M.F. Kamran, S. Saxena, M. Singh, P.U. Sarma, T. Madan, T.: Chakraborty Surfactant proteins S-PA and SP-D in human health and disease, (2005) 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 : Surfactant proteins S-PA and SP-D: structure function and receptors, (2006) Mol Immunol 43 (9): 1293-315
- Kühnel Wolfgang, Prof. Dr.med. Dr.h.c.W. : Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, 11. Auflage, Thieme 2002
- Laennec RTH: A treatise on diseases of the chest and on mediate auscultation, Translates by: Forbes J, 4th ed. 1834, Longmans, London
- Laros CD, Westermann CJJ.: Dilatation, compensatory growth, or both after pneumonectomy during childhood and adolescence. A thirty-year follow-up study, (1987) J Thorac Cardiovasc Surg; 93: 570-576
- Lawson et al: Genomic Organization of the Mouse Gene for Lung Surfactant Protein D, (1999) Am J Respir Cell Mol Biol, 20: 953-963
- LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, et al.: Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung, (2000) J Immunol 165(7): 3934-40

- Leonhardt H: Histologie, Zytologie und Makroanatomie des Menschen. Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie, Band 3; 8.Auflage; Thieme Verlag; Stuttgart, New York; 1990
- Leopold JG, Gough J: Centrilobular form of hypertrophic emphysema and its relation to chronic bronchitis, *Thorax* 1957; 12: 219-235
- Lieflander, Sarah : Dissertation an der Universität zu Lübeck (2008) Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Emphysementwicklung Surfactant Protein-D defizienter Mäuse
- Mason RJ, Williams MC: Type II alveolar cell. Defender of the alveoles, (1977) *Am Rev Respir Dis* 115: 81-91
- Massaro D, Massaro GD: Toward Therapeutic Pulmonary Alveolar Regeneration in Humans, (2006) *Proc Am Thorac Soc*, 3: 709-712
- Mariassy AT: Epithelial Cells of Trachea and Bronchi, (1992) Parent RA (Hrsg.): Treatise on pulmonary toxicology, Volume I. Comparative biology of the normal lung. CRC Press, Inc: 63-76
- Martorana PA, Brand T, Gardi C, et al: The pallid mouse. A model of genetic alpha 1-antitrypsin deficiency, (1993) *Lab invest*; 68: 233-241
- McCallum WG: Types of injury: Destruction of the respiratory tract, (1940) Saunders WB: A textbook of pathology, 7th ed., Philadelphia 419-428
- McLean KH: Microscopic anatomy of pulmonary emphysema, (1956) *Aust Ann Intern Med* 5: 73-88
- Nyengard, J. R.: Stereological methods and their application in kidney research, (1999) *J Am Soc Nephrol* 10 (5): 1100-23
- Ochs M : A brief update on lung stereology, (2006) *J Microsc* 222(Pt 3): 188-200.
- Ochs M, Knudsen L, Allen L, Stumbaugh A, Levitt S, et al.: GM-CSF mediates alveolar epithelial type II cell changes, but not emphysema-like pathology, in SP-D-deficient mice,( 2004) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(6): L1333-41.
- Orgeig S., Daniels C.B.: Effects of Aging, Disease and the Environment in the Pulmonary Surfactant System, (2004) *The Lung: Development, Aging and the Environment*, CH 27 (Elsevier)
- Pinkerton KE und Green FHY: Normal Aging of the Lung, (2004) Harding et al: *The Lung: Development, Aging and the Environment* CH 15(Elsevier).

- Pierce RA, Mariani TJ, Senior RM. Division of Dermatology, Washington University School of Medicine, Jewish Hospital, St. Louis, MO 63110, USA. PMID: 8575258 (Pub Med -indexed for MEDLIN)
- Plopper CG, Hyde DM: Epithelial Cells of Bronchioles, (1992) Parent RA (Hrsg.): Treatise on pulmonary toxicology, Volume I. Comparative biology of the normal lung. CRC Press, Inc.; 1: 85-92
- Rannels SR, Rannels DE. : Alteration in type II pneumocytes after partial Pneumonectomy, (1988) Am J Physiol; 254: C684-C690
- Rooney S.A.: Lung surfactant: cellular and molecular processing. (1998) RG Landes Bioscience, Austin Texas
- Sano H und Kuroki Y : The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity, (2005) Mol Immunol 42(3): 279-87.
- Shifren A, Mecham RP. Department of Cell Biology and Physiology, Campus Box 8228, 660. South Euclid Avenue, St. Louis, MO 63110, USA
- Silverman et al: Gender-Related Differences in Severe, Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease, (2000) Am J Respir. Crit. Care Med. 162: 2158
- Schiebler TH, Schmidt W, Arnold G, Beier HM, Herrmann M, et al.: Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen, (2003) Springer Berlin.
- Shapiro SD: The pathogenesis of emphysema: the elastase:antielastase hypothesis 30 years later, (1995) Proc Ass Am Phys; 107(3): 346-352
- Shapiro SD: Animal models for COPD, (2000) Chest 117: 223S-227S
- Snider GL, Kleinermann JL, Thurlbeck WM, et al: Definition of emphysema. Report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Division of Lung Diseases, (1985) Am Rev Respir Dis 132: 182-185
- Takahashi H, Sano H, Chiba H und Kuroki Y : Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases, (2006) Curr Pharm Des 12(5): 589-598.
- Tyler WS, Julian MD: Gross and Subgross Anatomy of Lungs, Pleura, Connective Tissue Septa, Distal Airways, and Structural Units, (1992) Parent RA (Hrsg.): Treatise on pulmonary toxicology, Volume I. Comparative biology of the normal lung. CRC Press, Inc: 37-48
- Vlahovic et al: Cellular and Connective Tissue Changes in Alveolar Septal

- Walls in Emphysema, (1999) Am J Respir Crit Care Med, 160: 2086-2092
- Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P und Reid KB: Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (Dermatophagoides pteronyssinus) allergens, (1996) Clin Exp Immunol 106(2): 367-73.
- Weibel ER: Stereological methods. Vol.1.: Practical methods for biological morphometry, ( 1979)  
Academic Pres, Ltd., London
- Weibel ER: Design and development of the mammalian lung, (1984) Weibel ER: The pathway of oxygen, Cambridge Mass.
- Welsch U : Lehrbuch Histologie(2003), Urban & Fischer
- Wiebe BM, Laursen H: Lung morphometry by unbiased methods in emphysema: Bronchial and blood vessel volume, alveolar surface area and capillary length, (1998) APMIS; 106: 651-656
- Williams MC: Alveolar type I cells: Molecular phenotype and development, (2003) Annu Rev Physiol; 65: 669-695
- Whitsett JA : Surfactant proteins in innate host defense of the lung, (2005) Biol Neonate 88(3): 175-80
- Yoshida, M. und J.A. Whitsett: Alveolar macrophages and emphysema in surfactant protein-D-deficient mice, (2006) Respirology 11 Suppl: S 37-40

## **7. Anhang**

### **7.1 Danksagung**

Ich möchte mich vor allem ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Heinz Fehrenbach und meinem Betreuer Dr. Ali Önder Yildirim bedanken. Ich hätte mir für meine Promotion keine bessere Betreuung wünschen können.

Des Weiteren danke ich für die Übernahme des 2. Gutachtens.

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

Mein Dank gilt außerdem meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meinem Freund Christian Apelman, meinen Korrekturlesern, meiner Mitdotorandin und Freundin Sarah Liefländer und allen anderen, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Meiner Freundin Anne Münks danke ich besonders dafür, dass sie die ganze Zeit über an meiner Seite war.

## 7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Baum, Basler, Beyer, Celik, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Feuser, Griß, Gotzen, Grundmann Hasilik, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Kretschmer, Krieg, Lennartz, Lippert, Lorenz, Moll, Müller, Niessing, Neubauer, Oertel, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Voigt, Weihe, Werner, Zielke