

**Aus dem Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Botzenhart

**Bedeutung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten
bei der Entstehung von Lungenemphysem und Fibrose in den
Alveolarsepten von Patienten mit cystischer Fibrose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Simone Greiner
aus
Schorndorf**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Döring
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Bültmann

Für meine Eltern, Großeltern
und meine Brüder Steffen und Lennart

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1. Krankheitsbild der cystischen Fibrose	7
1.2. Aufbau der Lunge	8
1.3. Lungeninfektionen und chronische Lungenentzündung bei CF-Patienten	11
1.4. Lungenemphysem	15
1.5. Lungenfibrose	17
1.6. Aufbau und Funktion des Kollagens	18
1.7. Aufbau und Funktion des Elastins	20
1.8. Hypothese und Ziele	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Reagenzien, Chemikalien und Färbelösungen	22
2.2. Medien und Stammlösungen	23
2.3. Antikörper	24
2.4. Geräte	24
2.5. Patienten	24
2.6. Präparation des Lungengewebes	25
2.7. Paraffineinbettung	26
2.8. Herstellung von Paraffin- und Gefrierschnitten	26
2.9. Vorbehandlung der Paraffinschnitte	27
2.10. Nachweis der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	27
2.11. Nachweis von Elastin	28
2.12. Nachweis von Kollagen	30

2.13.	Nachweis von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in der Lungenperipherie von CF-Patienten mittels indirekter Immunfluoreszenz	31
2.14.	Quantifizierung	31
2.15.	Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz zur Darstellung von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
2.16.	Statistische Analyse	37
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Quantifizierung von PMN im Lungenparenchym von Patienten mit CF und einer Vergleichsgruppe von nCF-Patienten	38
3.2.	Quantifizierung des Gehaltes an elastischen Fasern im Lungenparenchym von Patienten mit CF und einer Vergleichsgruppe von nCF-Patienten	40
3.3.	Quantifizierung des Kollagengehaltes im Lungenparenchym von Patienten mit CF und einer Vergleichsgruppe von nCF-Patienten	42
3.4.	Quantifizierung der indirekten Immunfluoreszenz zur Darstellung von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
4.	Diskussion	45
5.	Zusammenfassung	52
6.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	53
7.	Verzeichnis der Abbildungen	54
8.	Verzeichnis der Tabellen	55
9.	Literatur	56
10.	Danksagung	62
11.	Lebenslauf	63

1. Einleitung

1.1. Krankheitsbild der cystischen Fibrose

Die cystische Fibrose (CF) (Synonym: Mukoviszidose) wurde erstmals 1938 von Andersen [Andersen 1938] beschrieben. Sie ist die häufigste schwerwiegende autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung [Davis 1996]. Nur homozygote Merkmalsträger erkranken. In Mitteleuropa tritt CF bei ca. einem von 2500 Lebendgeborenen auf [Davis 1996]. Bei CF kommt es infolge einer abnormen Zusammensetzung der Sekrete exokriner Drüsen zur Obstruktion der Drüsenausführungsgänge mit zystisch-fibrotischer Umwandlung der betroffenen Organe. CF wird aufgrund einer abnormalen hohen Chloridkonzentration von über 60 mmol/l im Schweiß mit Hilfe des Pilocarpin-Iontophorese-Schweißtests [Gibson und Cooke 1959] diagnostiziert. Weitere Diagnosemöglichkeiten bieten die transepitheliale Spannungsmessung [Knowles 1983] sowie die klinischen Symptome der obstruktiven Lungenerkrankung und Pankreasinsuffizienz [Davis 1996].

CF wird durch Mutationen in einem Gen auf dem langen Arm des Chromosom 7 in der Position 7q31-32 verursacht [Tsui 1985, Riordan 1989]. Bei der in Mittel- und Nordeuropa mit 70-75% häufigsten Mutation fehlt an Position 508 die Kodierung für Phenylalanin (Δ F508). Das Gen kodiert für ein Membranglykoprotein, das als „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)“ bezeichnet wird [Rommens 1989]. CFTR bildet einen Chloridkanal, welcher durch die Phosphorylierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase [Berger 1991] und durch Nucleosidtriphosphate reguliert wird [Anderson 1991] und in der apikalen Region von verschiedenen Epithelzellen nachgewiesen wird [Boat 1989]. Der primäre physiologische Defekt bei CF liegt in einer reduzierten Chloridionendurchlässigkeit apikaler Epithelzellmembranen. Stark betroffen sind Lunge, Bauchspeicheldrüse, Leber, Gastrointestinaltrakt und die Haut [Koch und Hoiby 1993]. Die bronchopulmonale Erkrankung stellt die Hauptursache für Morbidität und Mortalität der CF-Patienten dar

[Davis1996]. Aus der verminderten Chloridionenpermeabilität resultiert eine fehlende Sekretion von Chloridionen in das Lumen der Luftwege [Devra 1992]. Durch die gestörte Chloridsekretion kommt es zu einer erhöhten Natriumreabsorption [Knowles *et al.* 1995], zu einer verringerten Wasserkonzentration in den Bronchialsekreten [Boucher 1986, Matsui *et al.* 1998] und letztlich zu einer erhöhten Viskosität des Bronchialsekretes. Das pulmonale Frühsymptom bei CF ist ein chronischer Husten [Khan *et al.* 1995], der im Säuglingsalter als trockener, nächtlicher Reizhusten dominiert. Erst später wird der Husten produktiv. Im weiteren Verlauf fallen die Säuglinge und Kleinkinder durch gehäufte Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes auf. Später zeigen sich Dyspnoe, Zyanose, Faßthorax sowie Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel [Kraemer 1993]. Da der chronischen Lungenerkrankung im weiteren Verlauf von CF eine bedeutende Rolle zukommt, soll zunächst die Anatomie der Lunge näher beschrieben werden.

1.2. Aufbau der Lunge

Nach funktionellen Gesichtspunkten wird bei den Atmungsorganen zwischen luftleitenden Abschnitten mit Nasenhöhle, Trachea, Bronchien, Bronchiolen sowie gasaustauschenden, respiratorischen Abschnitten mit den Bronchioli respiratorii und den Alveolen unterschieden [Schiebler, Schmid und Zilles, Anatomie, Springer-Verlag, 1997]. Die Trachea teilt sich an der Bifurcatio tracheae in zwei Hauptbronchien (Abb. 1). Nach kurzem Verlauf teilen sich die Hauptbronchien rechts in drei, links in zwei Bronchi lobares, die jeweils einen Lungenlappen versorgen. Die Lappenbronchi teilen sich wiederum in Bronchi segmentales, deren Durchmesser immer kleiner werden und die sich dann in Bronchioli und schließlich über die Bronchioli terminales und Bronchioli respiratorii fortsetzen. Bronchioli respiratorii dienen sowohl der Luftleitung als auch dem Gasaustausch. Ihr Durchmesser beträgt 0,15-0,2 mm, ihre Länge 1-3 mm [Junqueira, Carneiro, Schiebeler und Schneider, Histologie, Springer-Verlag September 1991]. Charakteristisch für die Bronchioli respiratorii sind seitliche

Vorwölbungen der Bronchialwände, sie bilden die Alveolen. Alveolen sind die Endabschnitte des Bronchialbaumes und für den Gasaustausch zwischen Luftraum und Blut verantwortlich. Sie sind mit einem dünnen Plattenepithel ausgekleidet, welches aus Alveolarepithelzellen vom Typ 1 und Typ 2 besteht. Der mittlere Durchmesser der Alveolen beträgt 250 - 300 µm. Jede Lunge enthält annähernd 300 Mio. Alveoli [Schiebler, Schmid und Zilles, Anatomie, Springer-Verlag, 1997].

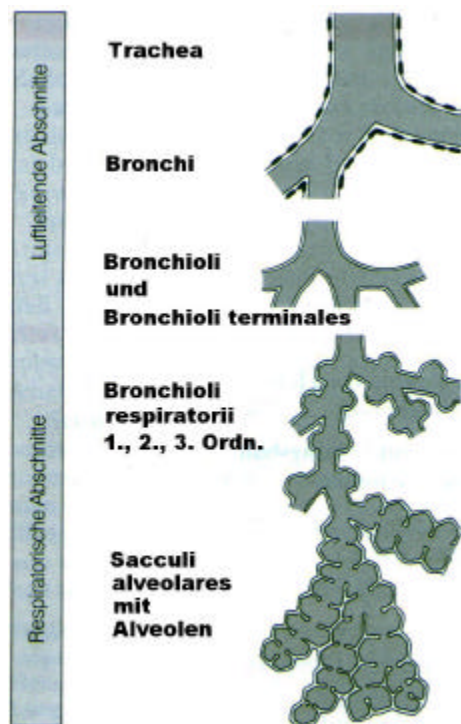


Abbildung 1: Schematische Übersicht über die einzelnen Abschnitte der unteren Atemwege [aus Schiebler, Schmid und Zilles, Anatomie, Springer-Verlag, 1997].

Benachbarte Alveolen haben als gemeinsame Wand ein Septum interalveolare (Abb. 2), das von einzelnen Poren durchsetzt wird.

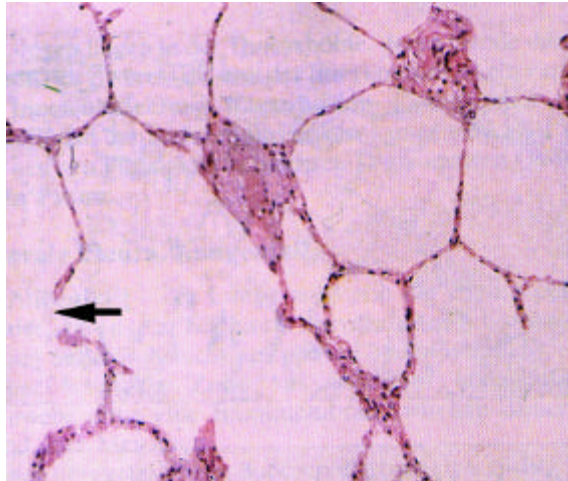


Abbildung 2: Histologischer Schnitt von Alveolen. Die Kommunikation zwischen benachbarten Alveolen erfolgt durch eine Alveolarpore (Pfeil). Färbung HE, Originalvergrößerung [aus Stevens und Lowe 1992].

Ein Septum interalveolare weist auf beiden Oberflächen flaches Alveolarepithel auf, welches zu 95% von Alveolarepithelzellen des Typ 1 gebildet wird (Abb. 3). Das Septum interalveolare enthält ein Kapillarnetz sowie elastische, kollagene und retikuläre Fasern. Vereinzelt sind Fibroblasten, Leukozyten, Makrophagen, Mastzellen, kontraktile Zellen und Nervenfasern anzutreffen. Die elastischen Fasern erfüllen in der Alveolarwand zwei wesentliche Aufgaben. Sie ermöglichen bei der Einatmung eine Erweiterung der Alveolen sowie bei der Ausatmung eine Rückführung der Alveolen auf die Ausgangsgröße. Etwa 15-20% des Interstitiums besteht aus Kollagen, vor allem aus Typ 1 und Typ 3 Kollagen (etwa im Verhältnis 2,5 : 1). Typ 1 Kollagen kommt vor allem in den Alveolarsepten, aber auch in der Adventitia des Bronchialbaums und in dem mit der Pleura in Verbindung stehenden Bindegewebe vor [Junqueira, Carneiro, Schiebler und Schneider, Histologie, Springer-Verlag, September 1991].

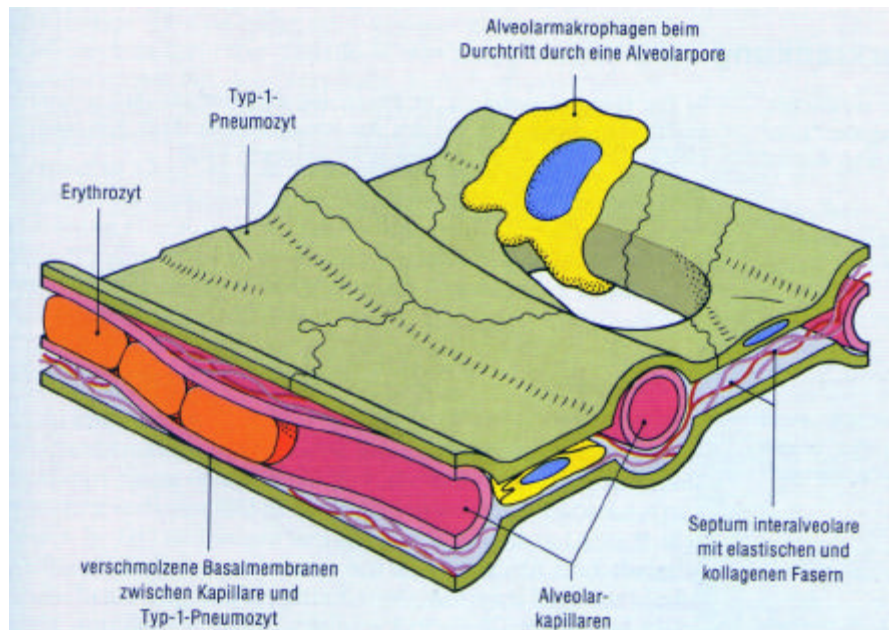


Abbildung 3: Septum interalveolare und Blut – Luftschranke. Jede Kapillare ist mit der Alveolarwand zweier Alveolarhöhlräume benachbart. Die Kapillare hat so stellenweise direkten Kontakt mit der Alveolarwand (dünne Stelle), während sie an dickeren Stellen durch Zellen sowie kollagene und elastische Fasern davon getrennt ist. Dünne Stellen, mit direkten Kontakt zwischen Kapillare und Alveolarwand, sind Orte des Gasaustausches, an dicken Stellen werden Flüssigkeiten zwischen Luftraum und Interstitium verschoben [aus Stevens und Lowe 1992].

1.3. Lungeninfektionen und chronische Lungenentzündung bei CF-Patienten

Die aufgrund des Gendefektes bedingte Viskositätszunahme des Bronchialsekretes und die dadurch beeinträchtigte Zilienfunktion führen zu einer verminderten mukoziliären Clearance der Lunge mit nachfolgender Stase des Sekretes. Die Sekretstauung führt zu bronchialen Obstruktionen (Abb. 4) und begünstigt dadurch die bakterielle Kolonisation des Tracheobronchialtraktes. Es kommt zu wiederholten bakteriellen Infektionen, häufig bereits kurz nach der Geburt. Bakterielle Kulturuntersuchungen zeigten in 80% der untersuchten Säuglinge positive Ergebnisse [Mearns *et al.* 1972]. Die Infektionen verursachen eine chronische Bronchitis, Bronchiektasenbildung und

bronchopneumatische Infiltration, die schließlich eine zunehmende Vernarbung des Lungenparenchyms zur Folge haben [Hodson 1995]. Die Entwicklung atelektatischer, emphysematischer und fibrotischer Bezirke führt zur Funktionsuntüchtigkeit des Lungengewebes. Die zunehmende respiratorische Insuffizienz mit chronischer Hypoxie und Erschöpfung der Atemmuskulatur führen zum Tode der Patienten [Götz *et al.* 1989].

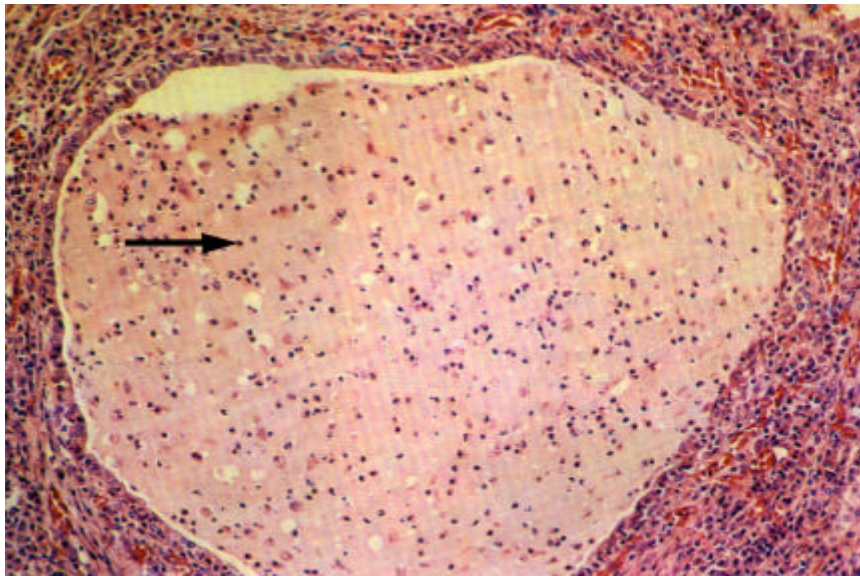


Abbildung 4: Ausschnitt über den Querschnitt eines Bronchus. Der Bronchus ist ekta-tisch, das Lumen ist mit einem blass gefärbten Sekret gefüllt, in dem sich viele PMN (polymorphkernige neutrophile Granulozyten) (Pfeil) und Makrophagen befinden. Die Bronchuswand und das umgebende Gewebe sind hyperämisch und von PMN, Lympho-zyten und Plasmazellen infiltriert. Färbung HE, Originalvergrößerung [aus Curran und Crocker 2000].

Bei Säuglingen und Kleinkindern ist *Staphylococcus aureus* häufig der erste Erreger [Gilligan 1991] einer bakteriellen Lungeninfektion. Die Inzidenz von *S. aureus*-Infektionen wird bei zunehmendem Alter von den *Pseudomonas aeru-ginosa*-Infektionen übertroffen. Warum CF-Patienten nicht in der Lage sind, die eingedrungenen Bakterien zu eliminieren ist unklar. Normalerweise ist das Im-munsystem der Lunge in der Lage, Bakterien mit Hilfe des sekretorischen IgA, der Lymphozyten, Mastzellen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), Lysozym, Laktoferrin und der Kompletkaskade zu eliminieren. CF-

Patienten haben keinen primären Immundefekt, wie ursprünglich vermutet wurde. So lösen die bakteriellen Infektionen heftige Immunreaktionen aus, die durch spezifische Serumantikörper gegen die bakteriellen Erreger, Immunkomplexe im Blut und durch die Einwanderung hoher Zahlen von PMN in das Bronchiallumen charakterisiert sind [Döring *et al.* 1995]. Aufgrund bakterieller und chemotaktischer Reize wandern bei CF eine große Anzahl von PMN vom Blut in die Lumina der Bronchien [Snider *et al.* 1991]. PMN sind in der Lage, als Effektorzellen der unspezifischen Immunabwehr Proteasen freizusetzen. Die von den PMN sezernierte humane neutrophile Elastase ist eine Serinprotease, die zusammen mit Cathepsin G und Proteinase 3 in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten vorkommt. Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 sind in Sputum und Bronchiallavageflüssigkeit der CF-Patienten in hohen Konzentrationen und hoher freier katalytischer Aktivität nachgewiesen worden [Goldstein und Döring 1986]. Der Elastase wird in der Pathophysiologie der fortschreitenden Lungenerkrankung bei CF eine entscheidende Bedeutung zugesprochen. Eine erhöhte Konzentration an freier Elastase zeigte sich nicht nur in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, sondern auch bei Patienten mit guter Lungenfunktion und mildem Krankheitsverlauf sowie bei klinisch symptomfreien Säuglingen [Balough *et al.* 1995, Birrer *et al.* 1994]. Es existiert daher die Hypothese, dass die durch die Proteasen hervorgerufene entzündliche Reaktion der Infektion vorausgeht, und nicht erst durch diese induziert wird [Konstan und Berger 1997]. Elastase ist in der Lage Strukturproteine der Lunge wie Elastin und Kollagen abzubauen [Vogelmeier und Döring 1996]. In einem Versuch mit Hamstern konnte gezeigt werden, dass intratracheal verabreichte Elastase zu einer Degranulation von sekretorischen Zellen mit nachfolgender Zellmetaplasie und Emphysembildung führen [Snider *et al.* 1995]. Elastase wirkt direkt toxisch auf die Epithelzellen der Atemwege und beeinträchtigt die Zilienmotilität. Auch wird der Elastase eine sekretionsstimulierende Wirkung zugesprochen, durch Anregung sekretproduzierender submuköser Drüsenzellen [Schuster *et al.* 1995] und Becherzellen [Lamblin 1992, Boat 1994, Larivee 1994]. Diese Eigenschaften fördern zusätzlich die Bronchialobstruktionen und begünstigen so die bakterielle Besiedlung des Tracheobronchialsystems bei CF-Patienten. Die

Elastase ist in der Lage, Komponenten des Immunsystems zu inaktivieren. Immunglobuline werden an der „hinge region“ des Fc-Rezeptor gespalten und die komplementvermittelte Opsonierung und Phagozytose von Bakterien wird beeinträchtigt [Döring *et al.* 1995]. Durch die Beeinträchtigung lokaler Abwehrmechanismen in den Atemwegen von CF-Patienten wird die bakterielle Besiedlung weiterhin begünstigt. Interleukin-8 ist der wichtigste chemotaktische Mediator für die PMN [Richman-Eisenstat *et al.* 1993]. Die hohe Elastaseaktivität in den CF-Atemwegen führt zu einer gesteigerten Genexpression von Interleukin-8 in den bronchialen Epithelzellen. Dies zieht einen Circulus vitiosus nach sich, da die erhöhte Freisetzung von Interleukin-8 chemotaktisch auf die PMN wirkt [Nakamura *et al.* 1992] und somit eine erhöhte Sezernierung von Elastase bewirkt und zur Aufrechterhaltung der chronisch entzündlichen Reaktionen in den Lungen von CF-Patienten beiträgt. Auch scheinen die Zytokine Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF- α die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung zu fördern [Bonfield *et al.* 1995].

Inhibitoren der Elastase sind das α_1 -Antitrypsin [O'Connor *et al.* 1993] und der sekretorische Leukozyteninhibitor (SLPI). α_1 -Antitrypsin wird hauptsächlich in der Leber gebildet und gelangt über die Blutbahn in die Lungen. Geringe Mengen werden auch lokal in den Lungen synthetisiert. α_1 -Antitrypsin bindet irreversibel freie, nicht an Elastin gebundene Elastase. Es entfaltet seine Schutzwirkung vor allem in den unteren Atemwegen [Meyer *et al.* 1991, Gadek *et al.* 1981]. α_1 -Antitrypsin ist der stärkste Inhibitor der Elastase. In gesunden Lungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Elastase und ihrem Inhibitor, dem α_1 -Antitrypsin [Virca und Schnebli 1984]. SLPI wird von Zellen des Bronchialtraktes gebildet und sezerniert. SLPI kann im Gegensatz zum α_1 -Antitrypsin sowohl freie als auch an Elastin gebundene Elastase hemmen, seine Bindung ist reversibel [Vogelmeier *et al.* 1991]. Die hohe Anzahl von PMN in den chronisch infizierten und entzündeten Atemwegen von CF-Patienten führt zu einem Ungleichgewicht zwischen der Elastase und ihren endogenen Inhibitoren, so dass die Schutzwirkungen der Antiproteasen aufgehoben sind. In hohen Konzentrationen kann die Elastase die Antiproteasen spalten und inaktivieren

[Stockley 1998, Sallenave 1998]. Der Überschuss an freier Elastase führt zu einem gesteigerten Abbau des Elastins. Peripheres Lungengewebe des Menschen, welches mit Elastase behandelt und inkubiert wurde, zeigte bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen Alveolarsepten mit verdünnten und geschädigten Faseranteilen und reichlich Emphyseblasen [Morris *et al.* 1993]. Das Ausmaß des Elastinabbaus kann über die spezifischen Elastinabbauprodukte Desmosin und Isodesmosin mit Hilfe biochemischer Nachweisverfahren im Urin bestimmt werden. Dabei zeigten sich deutlich erhöhte Werte bei CF-Patienten mit bronchopulmonaler Erkrankung und reichlich PMN in der Bronchiallavage [Viglio *et al.* 2000]. Es wird angenommen, dass es sich dabei, aufgrund der Entzündungsreaktionen in den Lungen von CF-Patienten, um Abbauprodukte des Lungenelelastins handelt [Stone *et al.* 1995].

1.4. Lungenemphysem

Unter einem Lungenemphysem versteht man die irreversible Erweiterung der Alveolarbereiche distal der terminalen Bronchien. Die interalveolären Septen bestehen aus elastischen und kollagenen Fasern, die auch beim Gesunden einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen [Siegenthaler, Lehrbuch der inneren Medizin, Thiemeverlag 1992]. Bei der Entwicklung eines Lungenemphysems treten die Degenerationsprozesse des pulmonalen Bindegewebes in den Vordergrund, so dass eine vermehrte Dehnbarkeit der Lunge und eine Verminderung der elastischen Rückstellkräfte eintritt. Die Alveolen erweitern sich und die Septen rupturieren. An der Ruptur der Alveolen ist neben der Überblähung der Alveolen auch eine Destruktion der Septen durch proteolytische Enzyme, wie die Elastase beteiligt. Durch die chronische bakterielle Besiedlung und die chronische Inflammation mit PMN ist bei CF-Patienten das Proteasen–Antiproteasengleichgewicht gestört. α_1 -Antitrypsin und SLPI sind nicht mehr ausreichend in der Lage, das Lungengewebe vor der destruierenden Proteasenaktivität zu schützen.

Lucey *et al.* 1998 konnten zeigen, dass das Ausmaß und die zeitliche Entwicklung eines Emphysems nicht nur vom Elastinabbau durch die Elastase abhängig ist, sondern auch von Regenerationsprozessen des Elastins. In einem Versuch mit experimentell induzierten emphysematischen Hamsterlungen konnte gezeigt werden, daß die mRNA von Elastin und Kollagen in der Pleura, Luftwegen und an den Alveolenränder stark erhöht war. Es wird vermutet, dass es sich bei dem Auf- und Abbau des Elastins und Kollagens um einen Gleichgewichtsprozeß handelt, bei dem das Ausmaß der Emphysementwicklung von der Neubildung des Elastins abhängt. Die Bildung eines Lungenemphysems erfolgt langsam und progressiv. Neben dem Proteasen–Antiproteasenungleichgewicht können auch Nikotinabusus, Umweltgifte und Ventilationsstörungen der Lunge Ursachen sein [Snider *et al.* 1994]. Emphyseme nehmen ab dem 50. Lebensjahrzehnt zu. Aufgrund des stärkeren Nikotinabusus sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Bei $\frac{2}{3}$ aller Männer sind Anzeichen eines Lungenemphysems ab dem 70. Lebensjahrzehnt vorhanden [Zöllner, Innere Medizin, Springer-Verlag, 1991].

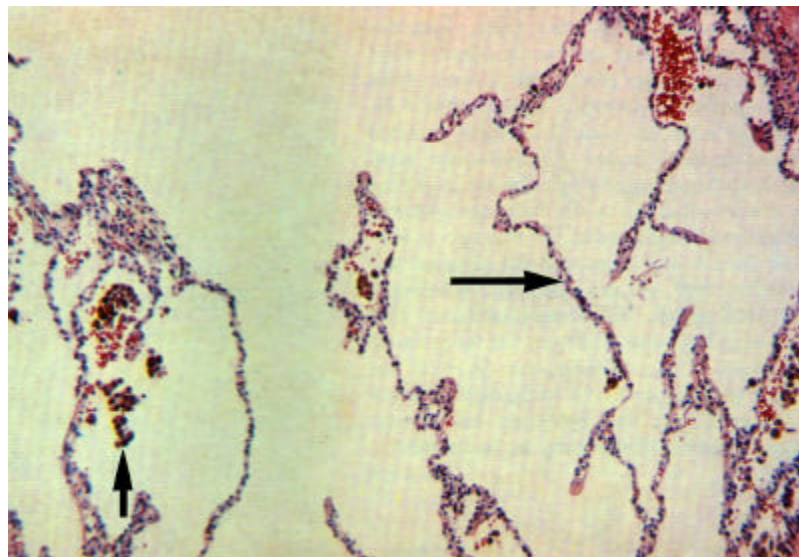


Abbildung 5: Histologischer Schnitt von Alveolen mit einem Lungenemphysem. Die Alveolarwände sind atrophiert (langer Pfeil), dünn und fehlen zum Teil, so dass sich Räume gebildet haben, die erheblich größer sind als die normalen Alveolarlumina. Man sieht kleine Ansammlungen pigmenthaltiger Makrophagen (kurzer Pfeil). Färbung HE, Originalvergrößerung [aus Curran und Crocker 2000].

1.5. Lungenfibrose

Fibrosen sind meist die Folge chronisch verlaufender Entzündungen. Das morphologische Bild wird von einer interstitiellen Faservermehrung bestimmt. Die Entzündung führt zu einer Aktivierung von PMN, Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen Thrombozyten sowie epithelialen und endothelialen Zellen. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8 und Wachstumsfaktoren wie TNF- α , TGF- β , FGF, IGF-1, PDGF. Die Interleukine stammen vor allem aus den Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und den Fibroblasten selbst. TNF- α und TGF- β hauptsächlich aus Thrombozyten, Makrophagen und Mastzellen. IGF-1 aus Fibroblasten und Makrophagen. Diese Mediatoren wirken aktivierend und chemotaktisch auf die Fibroblasten, welche über eine Stimulation von Mesenchymzellen zur Neubildung von Kollagenfasern führen [Konietzko, Wendel, Wiesner, Erkrankungen der Lunge, Walter de Gruyter-Verlag 1995]. Die Alveolarsepten werden dadurch zunehmend verbreitert. Die Folge ist eine Gewebeverhärtung der Lunge und eine eingeschränkte Ausdehnungsfähigkeit. Durch den erhöhten Lungengewebswiderstand muss eine erhöhte Atemarbeit geleistet werden, um ein bestimmtes Volumen einzuatmen. Zusätzlich ist der Gasaustausch beeinträchtigt, da die Anwesenheit von Kollagenfasern zwischen den Kapillaren und Alveolarwänden die Diffusionswege verlängern [Siegenthaler, Klinische Pathophysiologie, Thiemeverlag, 1994]. Das Endresultat einer chronisch interstitiellen Fibrose ist die Umwandlung der Lunge in zystische Lufträume, die von Bezirken eines dichten kollagenfaserigen Narbengewebes unterbrochen werden [Pfreundschuh und Schölmerich. Pathophysiologie und Pathobiochemie, Urban & Fischer, 1999].

1.6. Aufbau und Funktion des Kollagens

Kollagene sind mit 25% des Gesamtproteins die am häufigsten vorkommende Proteinklasse. Sie kommen im Gewebe des Binde- und Stützsystems wie Haut, Knorpel, Knochen und Sehnen vor, aber auch als interzellulärer Bestandteil der meisten parenchymatösen Organe wie Leber, Lunge, Milz, Niere und Gehirn. Die Kollagensynthese findet sowohl intrazellulär im Fibroblasten als auch extrazellulär statt (Abb. 6). Zunächst werden im Fibroblasten an membrangebundenen Ribosomen als Vorstufen die Pro- α -Ketten synthetisiert und in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Die Pro- α -Ketten bestehen hauptsächlich aus den Aminosäuren Prolin, Glycin und Lysin. An ihren Kettenenden tragen die Pro- α -Ketten weitere Aminosäuren, die sogenannten Extensionspeptide. Im endoplasmatischen Retikulum werden bestimmte Prolin- und Lysinreste hydroxyliert, so dass Hydroxyprolin bzw. Hydroxylysin entsteht. Manche der Hydroxylysinreste werden glykosyliert. Jeweils drei dieser α -Polypeptidketten verdrillen sich zu einer seilartigen Superhelix, die man als Prokollagen bezeichnet. Die Hydroxylgruppen des Hydroxyprolins und des Hydroxylysin bilden zwischen den α -Ketten Wasserstoffbindungen, die zur Stabilisierung der drei-strängigen Helix beitragen. Glycin ermöglicht eine enge Zusammenlagerung des Prokollagens. Das Prokollagen wird aus der Zelle ausgeschleust und erst im Extrazellulärraum durch Abspaltung der Extensionspeptide zu Kollagenmolekülen umgeformt. Die Kollagenmoleküle lagern sich im Extrazellulärraum zu Kollagenfibrillen zusammen und über eine Zusammenlagerung der Kollagenfibrillen entstehen die kollagenen Fasern [Alberts 1995]. Die Kollagenfasern sind verantwortlich für die Zugfestigkeit, sowie für die mechanische Stabilität in den verschiedenen Geweben und in der Lunge [Löffler, Petides, Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag 1998]. Die Protease Elastase, die von PMN produziert wird, kann den Elastingehalt in der Lunge verringern. Dies hat einen Einfluss auf die Elastizität der Alveolen, nicht aber auf die Zug- und Reißfestigkeit der Lunge. Diese wird massgeblich durch den Kollagengehalt und durch das kollagenabbauende Enzym Kollagenase bestimmt [Senior *et al.* 1975].

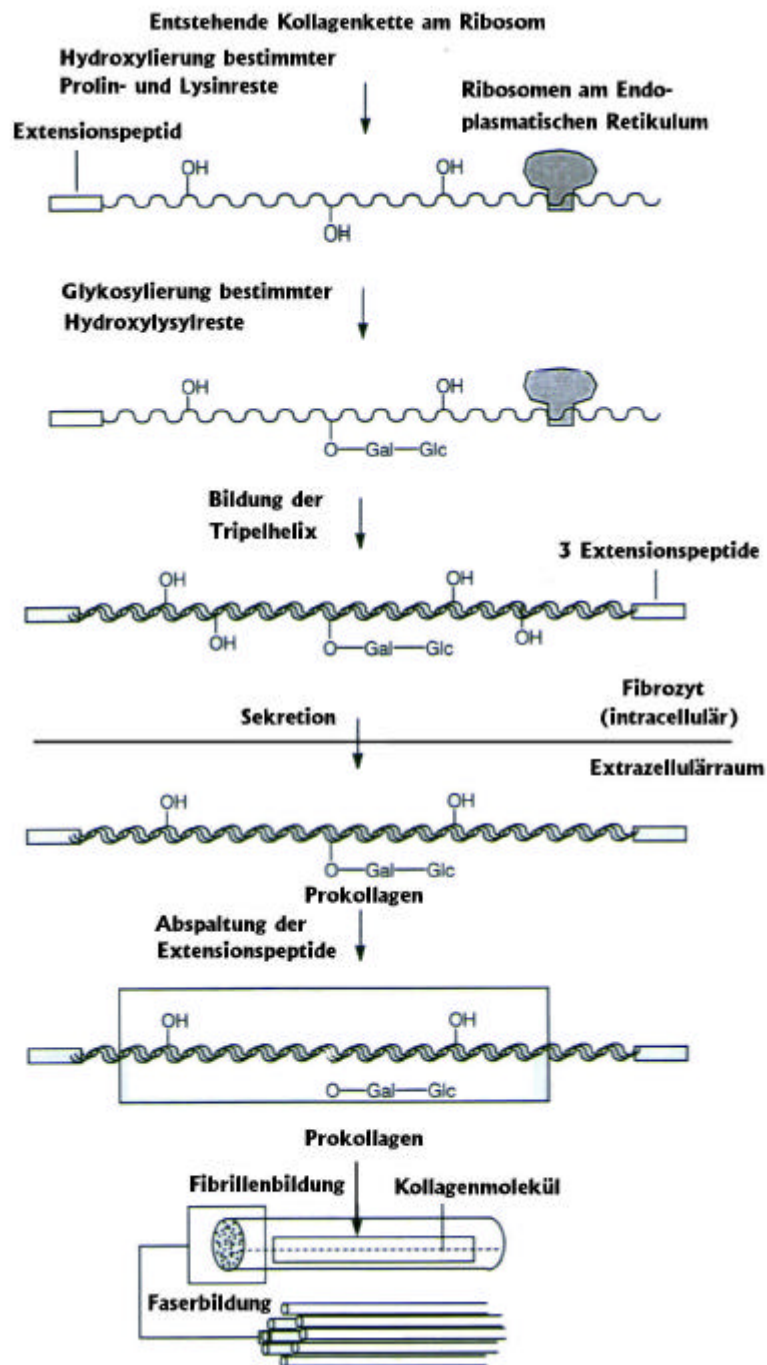


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kollagensynthese [aus Linnemann und Kühl, 1995].

1.7. Aufbau und Funktion des Elastins

Elastin ist ein hydrophobes Protein, das sich durch Quervernetzung zu Filamenten zusammensetzt [Stevens und Lowe, Histologie des Menschen, VCH Verlagsgesellschaft 1992]. Wie das Kollagen wird auch Elastin von Fibroblasten gebildet. Es zeigt gleichfalls einen hohen Gehalt an Glycin sowie Prolin. Zusätzlich sind auch hydrophobe Aminosäuren wie Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin und in geringen Mengen Hydroxyprolin vorhanden. An der Quervernetzung der Elastinfilamente sind Desmosin und Isodesmosin beteiligt. Desmosin und Isodesmosin kommen beim Menschen ausschließlich im Elastin vor, ihr Nachweis ist also spezifisch für Elastin. Merkmale des Elastins sind seine chemische Inertheit gegenüber Säuren, Basen und seine geringe Löslichkeit. Elastin ist die Hauptkomponente der elastischen Fasern und als solches Bestandteil der Alveolenmembran in der Lunge, der Gefäßwände und der Haut [Greiling und Gressner, Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer-Verlag, Oktober 1994]. Elastische Fasern sorgen für die reversible Dehnbarkeit der Gewebe. Im Alter nimmt die Elastizität der elastischen Fasern und Membranen ab.

1.8. Hypothese und Ziele

Bei CF-Patienten begünstigt die Viskositätszunahme des Bronchialsekretes sowie die verminderte mukoziliäre Clearance der Lunge die bakterielle Besiedlung des Tracheobronchialtraktes. Die Folgen sind rezidivierende bakterielle Infektionen und chronische Entzündungsreaktionen. Die durch Bakterien hervorgerufene Entzündung ist durch einen massiven Einstrom von PMN in das Lumen der Bronchien charakterisiert. Die von den PMN freigesetzte Elastase führt zu degenerativen Veränderungen der oberen Atemwege. Folgen sind Metaplasien des auskleidenden Epithels der oberen Atemwege, Obstruktionen der Bronchien und Bronchiektasien.

In der Peripherie von CF–Patientenlungen findet man strukturelle Veränderungen der Alveolen wie emphysematische Erweiterungen und fibrotisch verdickte Septen. Während der Tracheobronchialtrakt jedoch mit Bakterien besiedelt ist, sind in den Alveolen keine Bakterien nachweisbar. Möglicherweise kommt es auch hier zu einem erhöhten Influx von PMN, deren sezernierte Elastase zu Veränderungen in der Lungenperipherie in Form von Elastinabbau bzw. gesteigerter Kollagensynthese führen kann.

Zur Überprüfung dieser Hypothese war es das Ziel dieser Arbeit:

PMN, elastische Fasern und kollagene Fasern in den Alveolarsepten von Patienten mit CF im Vergleich zu Kontrollpersonen zu quantifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien, Chemikalien und Färbelösungen

DAB- Chromogen-Tablette (Dako, Hamburg)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Eiweißglycerin (Chroma, Schmidt Gmbh, Köngen/Neckar)

Eukitt (Kindler, Freiburg)

Essigsäure (Merck, Darmstadt)

Faramount-aqueous-mounting-medium (Dako, Hamburg)

Falcon: konisches Reagenzröhrchen, 50ml (Becton - Dickinson, Hamburg)

Formaldehyd (Sigma, Deisenhofen)

Hämatoxylin nach Weigert (Sigma, Deisenhofen)

Levimasole-endogenous-AP-Inhibitor (Dako, Hamburg)

Nitro-Blue-Tetrazolium (Dako, Hamburg)

Nystatin (Gibco BRL, Eggenstein)

Objektträger (R.Langenbrinck, Emmendingen)

Pepsin (Merck, Darmstadt)

Resorcinfuchsin (Sigma, Deisenhofen)

Retinsäure (Sigma, Deisenhofen)

Salzsäure (Merck, Darmstadt)

Schweineserum (Dako, Hamburg)

Silikonstift (Dako, Hamburg)

Streptomycin (Gibco BRL, Heidelberg)

Tween 20 (Sigma, Deisenhofen)

Ultrosor G (Gibco BRL, Heidelberg)

Van Gieson-Gemisch (Sigma, Deisenhofen)

Wasserstoffperoxid 3% (Sigma, Deisenhofen)

Xylol (Merck, Darmstadt)

2.2. Medien und Stammlösungen

Transportmedium für das Lungengewebe

500 ml DMEM/Nut Mix F-12 (Ham) enthalten:

5 ml Ultrosor G, 2% ig

100 µl Choleratoxin, 10 ng/ml

125 µl Retinsäure, 10 ng/ml

750 µl Nystatin und Penicillin/Streptomycin 50µg/ml

PBS (20 - fache Stammlösung)

85,05 g NaCl

14,23 g Na HPO x 12 H O

1,35 g KH PO

in 500 ml Aqua dest lösen, gut mischen

PBS-Tween 20 (0,2% ig)

PBS-Stammlösung 1:20 verdünnen in 1l Aqua dest und 2 ml Tween 20 dazugeben, gut mischen

Pepsin-Essigsäure-Gemisch

1 mg/ml Pepsin in 0,5 M Essigsäure lösen

Formaldehyd (4%)

Formaldehyd (37%) 1:9 mit Aqua dest verdünnen

stets frisch ansetzen, bei 4°C aufbewahren

2.3. Antikörper

Monoklonaler Antikörper gegen neutrophile Elastase (Dako, Hamburg)

AP-konjugierter Antikörper gegen Maus IgG (Dako, Hamburg)

Polyklonaler Kollagen-Typ 1 Antikörper gegen Kaninchen IgG (Biotrend, Köln)

HRP-konjugierter-Antikörper gegen Kaninchen IgG (Dako, Hamburg)

Monoklonaler Antikörper gegen Teichonsäure (Fournier, Pasteur-Institut, Frankreich)

Polyklonaler Antikörper gegen *P. aeruginosa* (freundliche Gabe von Gerald B. Pier, Boston, MASS, Harvard-University, USA)

Antikörper gegen Anti-Maus-Indocarbocyanin 3 (Dianova, Hamburg)

2.4. Geräte

Einbettautomat (Hypercenter, Shandon, SI, Frankfurt)

Image-Analyser (Analysis, Soft imaging Software, GmbH Münster)

Invertmikroskop (Zeiss-Jena-Optik, Göttingen)

Kontron-Imaging-System KS 300 (Kontron electronic GmbH, Eching)

Schlittenmikrotom (Jung HN 40, Leica, Frankfurt)

2.5. Patienten

Es wurde peripheres Lungengewebe von 6 männlichen CF-Patienten und 5 weiblichen CF-Patienten mit einem mittleren Alter von $27,4 \pm 5,7$ Jahren und von einem weiblichen und 6 männlichen nicht an cystischer Fibrose erkrankten Patienten mit einem mittleren Alter von $58 \pm 9,6$ Jahren untersucht. Das Lungenmaterial der CF-Patienten stammt aus dem CF/Pulmonary Research and Treatment Centre in Chapel Hill, University of North Carolina, USA. Es handelt sich dabei um Lungen von CF-Patienten die sich aufgrund ihrer fortschreitenden destruktiven Lungenerkrankung und der chronischen Besiedlung beider

Lungenflügel mit *P. aeruginosa* einer Lungentransplantation unterziehen mussten. Bei den nCF-Patienten handelt es sich um Karzinompatienten aus der Klinik Schillerhöhe der Landesversicherungsanstalt Württemberg, Stuttgart-Gerlingen, die sich aufgrund ihrer Erkrankung einer Teilresektion bzw. Lobektomie der Lunge unterziehen mussten. Anamnestisch waren die nCF-Patienten Raucher. Bei vier Patienten der nCF-Patientengruppe wurde der rechte Oberlappen reseziert, einmal der linke und einmal der rechte Unterlappen sowie eine Pneumektomie der rechten Lunge. Bei der Präparation des resezierten Lungengewebes wurde darauf geachtet, dass nur gesundes, tumorfernes Material zur Weiterverarbeitung entnommen wurde. Alle CF und nCF-Patienten hatten zugestimmt, dass das Lungengewebe für wissenschaftliche Zwecke genutzt werden konnte. Die zuständige Ethikkommission der Universität Tübingen hatte der Verwendung des Gewebematerials für dieses Forschungsvorhaben zugestimmt.

2.6. Präparation des Lungengewebes

Die nCF-Lungen wurden nach der Lobektomie sofort in 1x1x1 cm große Gewebestücke geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Gewebestücke nur alveolare Lungenanteile enthielten. Das frisch entnommene Gewebe wurde in ein Falconröhrchen (50 ml) mit 20 ml Kulturmedium 1 überführt und für den Transport auf Eis gelagert. Die Lungenproben wurden noch am selben Tag dreimal mit sterilem PBS gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung in frischem Formaldehyd (4%) bei 4°C aufbewahrt. Das Formaldehyd wurde einmal pro Woche gewechselt, um neu entstandene Fumarsäure zu entfernen.

Zur Herstellung von Gefrierpräparaten wurden die 1x1x1 cm großen Gewebestücke unmittelbar nach der Lobektomie in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.7. Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung des Lungenmaterials wurde von den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität Tübingen im Rahmen ihrer Routinearbeiten durchgeführt. Hierfür wurde ein Einbettautomat verwendet. Da das Fixierungsmittel negative Auswirkungen auf die Paraffineinbettung und auf die Färbung ausübt, wurde das Gewebe zunächst vom 4%igem Formaldehyd gereinigt, entwässert und anschließend mit Paraffin durchtränkt. Bei den nCF-Patienten wurden aus jeder Lunge jeweils drei Paraffinblöcke hergestellt. Diese enthielten Lungengewebe verschiedener Bereiche der Lungenlappen.

2.8. Herstellung von Paraffin-und Gefrierschnitten

Die Herstellung von Paraffinschnitten erfolgte an einem Schlittenmikrotom. Um eine bessere Schneidefähigkeit der Paraffinblöcke zu erreichen, wurden diese für 20 min im Eisfach bei -8°C gekühlt. Anschließend wurden die Paraffinblöcke in eine entsprechende Halterung am Mikrotom eingespannt, die gewünschte Stärke in μm eingestellt und $5\ \mu\text{m}$ dünne Gewebeschnitte hergestellt. Zur Glättung der Paraffinschnitte wurden diese auf die Oberfläche eines 47°C warmen Wasserbads überführt. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen, die zuvor dünn mit Eiweißglycerin beschichtet worden waren, um eine bessere Haftung zwischen Paraffinschnitt und Objektträger zu erzeugen. Zur Einleitung der Entparaffinierung wurden die Schnitte für mindestens 20 min in einen Brutschrank bei 70°C gestellt.

Die Herstellung der Gefrierschnitte wurde gleichfalls am Institut für Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt. Es wurden ca. $10\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte mit Hilfe eines Gefriermikrotoms angefertigt.

2.9. Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Für den PMN-Nachweis, die Elastica van Gieson-Färbung, den Kollagen-Nachweis sowie für den Bakterien-Nachweis wurden die Paraffinschnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Die Entparaffinierungsreihe besteht aus:

1. Xylol 1	2 min
2. Xylol 2	2 min
3. Xylol 3	2 min
4. Xylol 4	2 min
5. Alkohol 100%	2 min
6. Alkohol 100%	2 min
7. Alkohol 96%	2 min
8. Alkohol 96%	2 min
9. Alkohol 70 %	2 min

Für die verschiedenen Färbungen wurden die entparaffinierten Schnitte direkt aus dem 70% - Alkohol entnommen und weiterverarbeitet.

2.10. Nachweis der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

Der PMN-Nachweis wurde mit einem monoklonalen neutrophilen Elastase-Antikörper gegen die von den PMN produzierte Elastase durchgeführt. Zunächst wurden auch hier die Paraffinschnitte wie unter 2.8. beschrieben entparaffiniert. Zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Präparate 10 min mit Levamisole-endogenous-AP-Inhibitor inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 20 wurden die Schnitte mit 100 µl Schweineserum (1:10 mit PBS-Tween 20 verdünnt) 30 min bei Raumtemperatur zur Absättigung inkubiert und wiederum dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Die Absättigung dient der Unterdrückung unspezifischer Hinter-

grundfärbungen. Anschließend wurden die Gewebesschnitte mit 100 µl des neutrophilen Elastase-Antikörpers (1:100 mit PBS-Tween 20) für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 20 wurden die Schnitte mit 100 µl des zweiten Antikörpers bedeckt, (AP-konjugierter Antikörper gegen Maus IgG, 1:150 mit PBS-Tween 20 verdünnt) und 1 h inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Zur Färbung wurden die Paraffinschnitte mit einem Tropfen Nitro-Blue-Tetrazolium-Substrat für 12 min bedeckt, dreimal mit Aqua bidest gewaschen und anschließend mit Faramount–aqueous–mounting-medium eingebettet. Um eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers auszuschließen, wurde für jedes Präparat eine Kontrolle mitgeführt, bei der nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurde.

2.11. Nachweis von Elastin

Die Elastica van Gieson-Färbung gehört zu den Trichromfärbungen. Bei dieser Art der Färbung werden drei Farbstoffe verwendet, wobei zwei dieser Farbstoffe sich in einer Farblösung befinden und simultan angeboten werden. Hierbei handelt es sich um einen feindispersen Farbstoff, der das Zytoplasma darstellt und um einen grobdispersen Farbstoff, der die groben Strukturlücken des Bindegewebes besetzt. Als Kernfarbstoff dient das Eisenhämatoxilin nach Weigert. Bei der Färbung werden simultan die Farbstoffe Pikrinsäure für das Zytoplasma und das Säurefuchsin zur Darstellung des kollagenen Bindegewebes im van Gieson-Gemisch angeboten. Zur Sichtbarmachung der elastischen Fasern wird der Farbstoff Resorcin-Fuchsin verwendet. (Abb. 7).

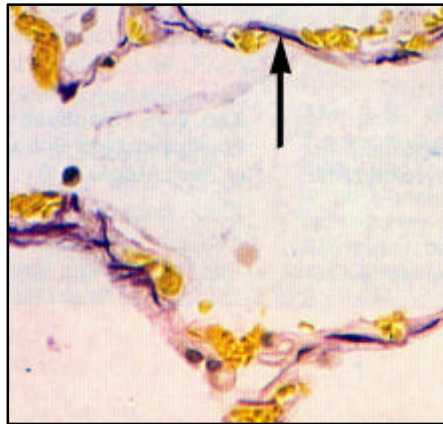


Abbildung 7: Darstellung der elastischen Fasern mittels der Elastica van Gieson-Färbung. Die elastischen Fasern sind dunkelviolet (Pfeil), die Erythrozyten in den Alveolarkapillaren gelb. Originalvergrößerung [aus Stevens und Lowe 1992].

Die Paraffinschnitte wurden wie in 2.8. beschrieben zunächst entparaffiniert. Die entparaffinierten Schnitte wurden direkt aus dem 70%igen Alkohol für 20 min in die Färbelösung Resorcin-Fuchsin gegeben. Anschließend wurde kurz mit 80%igen Alkohol differenziert und die Kernfärbung mit Eisenhämatoxilin nach Weigert für 5 min durchgeführt. Die Schnitte wurden kurz mit Aqua dest gespült und für einige Sekunden mit HCL-Alkohol differenziert. Um den blauen Kernfarbstoff zu erhalten wurden die Schnitte für 10 min unter fließendes Leitungswasser zum Bläuen gestellt. Im nächsten Schritt wurde für 15 sek zur Bindegewebsdarstellung mit van Gieson-Gemisch gefärbt und mit Aqua dest kurz gespült. Die gefärbten Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die aufsteigende Alkoholreihe besteht aus einer Wanne mit 70%igen Ethanol und jeweils 2 Wannen mit 96%igen und 100%igen Alkohol sowie 4 Xylolwannen. Die Eintauchphase beträgt jeweils 2 min. Xylol dient als Intermedium zwischen dem Alkohol und dem Eindeckmedium Eukitt. Eukitt ist ein Kunstharz und dient der Haltbarmachung der Präparate.

2.12. Nachweis von Kollagen

Bei der Darstellung von Kollagen wurden die Schnitte zunächst wie in 2.8. beschrieben entparaffiniert. Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate für 1 h bei 37°C in 1 mg/ml Pepsin in 0,5 M Essigsäure inkubiert, anschließend mit Aqua bidest und dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen um den pH-Wert wieder herzustellen. Zur Unterbindung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Paraffinschnitte 10 min in 3% Wasserstoffperoxid inkubiert und wiederum kurz mit Aqua bidest gespült und dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Schweineserum (1:10 mit PBS-Tween 20 verdünnt) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 20 wurden die Präparate mit 100 µl des polyklonalen Kollagen-Typ-1-Antikörper gegen Kaninchen IgG (1:20 mit PBS-Tween 20 verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert und wiederum dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde der HRP-konjugierte zweite Antikörper gegen Kaninchen IgG (1:500 mit PBS-Tween 20 verdünnt) für 1 h auf die Gewebeschnitte gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 20 wurde für die Färbung eine DAB-Chromogen-Tablette in 10 ml PBS-Tween 20 aufgelöst. Aus der Suspension wurden 2 ml entnommen, 15 µl 3% Wasserstoffperoxid hinzugefügt und die Paraffinschnitte 15 min mit dieser Farblösung bedeckt. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua bidest wurden die Schnitte mit Faramount-aqueous-mounting-medium eingedeckt. Für jedes Präparat wurde eine Kontrolle mitgeführt, um eine unspezifische Bindung des HRP-konjugierten-Antikörpers ausschließen zu können.

2.13. Nachweis von Staphylococcus aureus und Pseudomonas aeruginosa in der Lungenperipherie von CF-Patienten mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Bakterien wurden sowohl Gefrier- als auch Paraffinschnitte untersucht. Die Paraffinschnitte wurden zunächst wie in 2.8. beschrieben entparaffiniert. Zum Nachweis von *S. aureus* wurden die Schnitte mit Human-IgG (1:10 mit PBS-Tween 20 verdünnt) 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 20 wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Teichonsäure (1:30 mit PBS-Tween 20 verdünnt) für 1h bedeckt, dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen und anschließend mit dem 2. Antikörper (Anti-Maus-Indocarbocyanin 3, 1:500) 40 min inkubiert und dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit DAPI (1µg/ml) 5 min bedeckt, mit Aqua bidest gewaschen und mit Fluoreszenz-Eindeckmedium eingebettet. Zur Darstellung von *P. aeruginosa* wurden die Schnitte mit Schweineserum (1:10 mit PBS-Tween 20 verdünnt) für 30 min abgesättigt, dreimal mit PBS-Tween 20 gewaschen und mit einem polyklonalen Antikörper gegen *P. aeruginosa* 1:50 verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween 20 wurde mit dem 2. Antikörper (Anti-Maus-Indocarbocyanin 3, 1:500) 40 min inkubiert und anschließend mit PBS-Tween 20 gewaschen. Die Schnitte wurden mit DAPI (1µg/ml) für 5 min gefärbt, mit Aqua bidest gewaschen und mit Fluoreszenz-Eindeckmedium eingebettet.

2.14. Quantifizierung

Die Quantifizierung der PMN, der Elastica van Gieson-Färbung sowie des Kollagengehaltes erfolgte an einem Lichtmikroskop mit Hilfe des Image-Analysers und des Kontron-Imaging-System. Für die drei Färbungen wurden jeweils 19 Dünnschnitte der CF-Präparate untersucht (11 Patientenlungen aus denen Paraffinschnitte aus unterschiedlichen Lungenlappenbereichen hergestellt wurden)

und jeweils 21 Dünnschnitte der nCF-Präparate (7 Patientenlungen aus denen Paraffinschnittpräparate aus unterschiedlichen Lungenlappenbereichen hergestellt wurden). Von den nCF-Lungen wurden mehr Präparate untersucht und ausgewertet, da von den nCF-Patienten mehr Material zur Verfügung stand. Die Ergebnisse wurden für die einzelnen Patienten als Mittelwerte berechnet. Alle drei Färbungen wurden bei gleicher Lichtstärke bewertet, die am Mikroskop eine Einstellung zwischen 4 und 5 entsprach. Pro Dünnschnitt wurden zwischen 15 und 20 Gesichtsfelder ausgewertet. Nach der histologischen bzw. histochemischen Färbung wurden die Bildausschnitte von einer im Mikroskop integrierten Videokamera aufgenommen. Die von dieser analogen Kamera erzeugten elektrischen Signale wurden in digitalisierte Bilder umgewandelt und zur Analyse herangezogen. Auf den digitalisierten Bildern wurde die Länge der Alveolarsepten anhand eines Markers am Bildschirm ausgemessen. Dabei entsprachen 4 cm am Bildschirm 50 μm .

Die Quantifizierung der PMN erfolgte nach der immunhistochemischen Färbung mit einem monoklonalen neutrophilen Elastase-Antikörper und einem AP-konjugierten Antikörper gegen Maus IgG bei 200facher mikroskopischen Vergrößerung. Die nach der immunhistochemischen Färbung dunkelblau erscheinenden PMN wurden ausgezählt (Abb. 8). Zur Prüfung der Färbung wurden jeweils Kontrollpräparate ohne den ersten Antikörper mitgeführt.

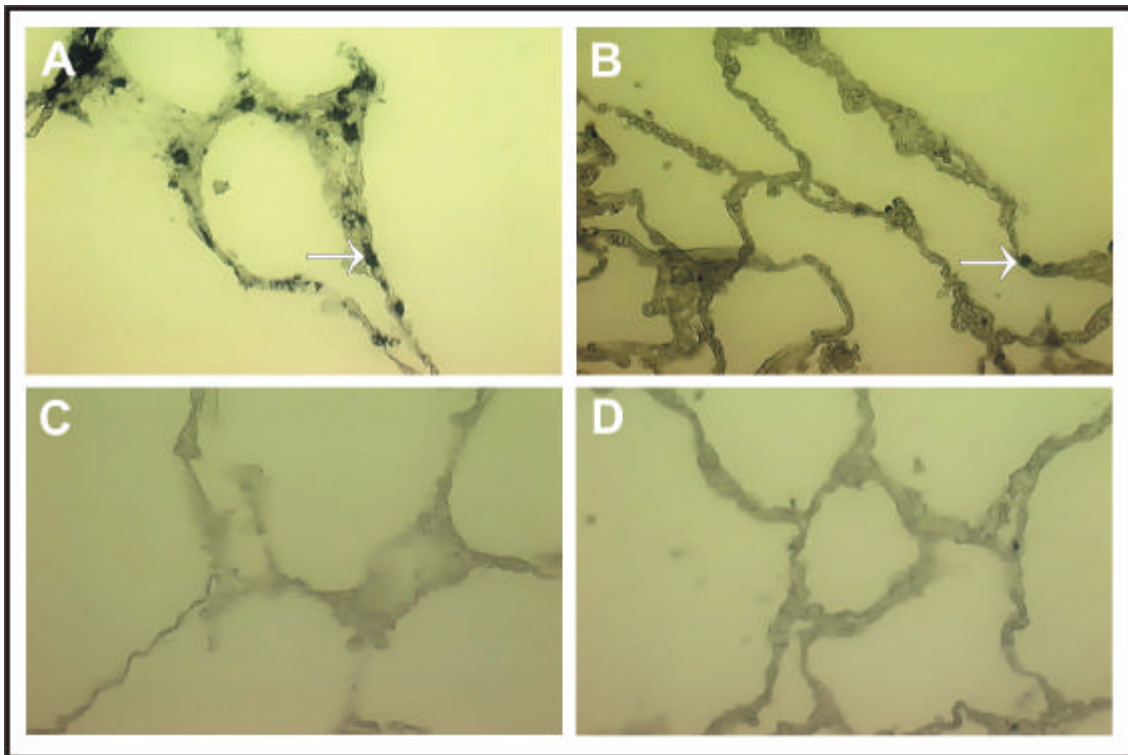


Abbildung 8: Quantifikation von PMN: Lichtmikroskopische Bilder von Alveolaresepten aus einer CF-Lunge (A,C) und einer nCF-Lunge (B,D). Ein spezifischer Antikörper gegen die von den PMN sezernierte Elastase zeigt die Infiltration von PMN (Pfeil) in die Alveolaresepten einer CF-Lunge (A) und einer nCF-Lunge (B). Um eine unspezifische Bindung des 2. Antikörpers auszuschließen wurden Kontrollen mitgeführt, bei denen nur mit dem 2. Antikörper inkubiert wurde (C,D). 200fache Vergrößerung.

Für die Quantifizierung des Elastins sowie des Kollagens wurde mit Hilfe des Kontron-Imaging-System (KS 300) ein Makro erstellt. Über das in der Menüleiste vorhandene Symbol „Image“ wurde zunächst über Camera Frame die Fenstergröße des zu beurteilenden Bildausschnittes eingestellt. Dies betrug 768 x 512 mm. Des weiteren wurde über „Measure“ die Geometrische Calibration auf eine 200fache Vergrößerung festgelegt. Die elastischen und kollagenen Fasern stellten sich nach der histologischen bzw. immunhistochemischen Färbung als dunkelrote Fasern dar. Über das im Menü vorhandene „Threshold“ konnte der zu messende Rotton der elastischen bzw. kollagenen Fasern eingestellt werden, und über „Label\Object set up“ wurde die zu messende Farbfläche markiert. Anschließend wurde das Originalbild in ein schwarz-weißes

Maskimage überführt. Die elastischen bzw. kollagenen Fasern stellten sich nun weiß dar (Abb. 9 und Abb. 10)

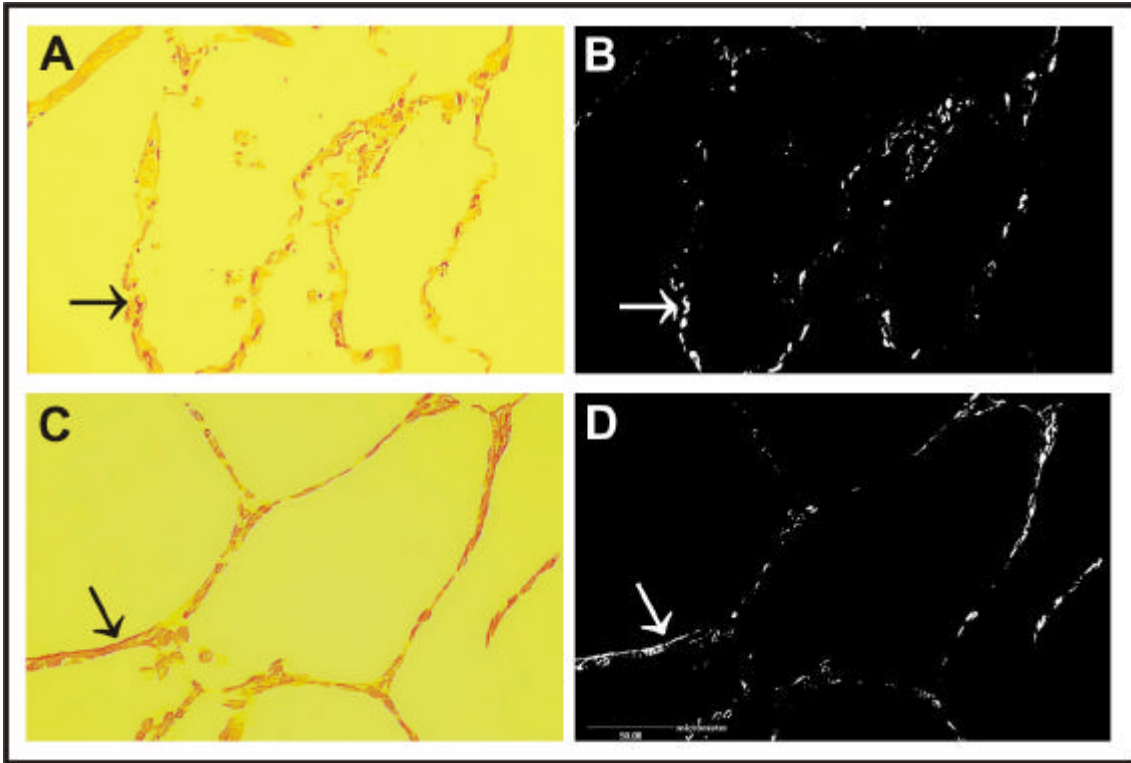


Abbildung 9: Quantifikation des Gehaltes an elastischen Fasern: Lichtmikroskopische Bilder von Alveolarsepten einer CF-Lunge (C) und einer nCF-Lunge (A) und die dazugehörigen schwarz-weißen Maskimages der CF-Lunge (D) und der nCF-Lunge (B). Die elastischen Fasern stellen sich nach der Elastica van Gieson-Färbung dunkelviolett dar (Pfeile A,C). Die Bilder (B,D) zeigen die zur Flächenberechnung herangezogenen schwarz-weißen Maskimages. Die elastischen Fasern stellen sich weiß dar (Pfeile B,D). 200fache Vergrößerung.

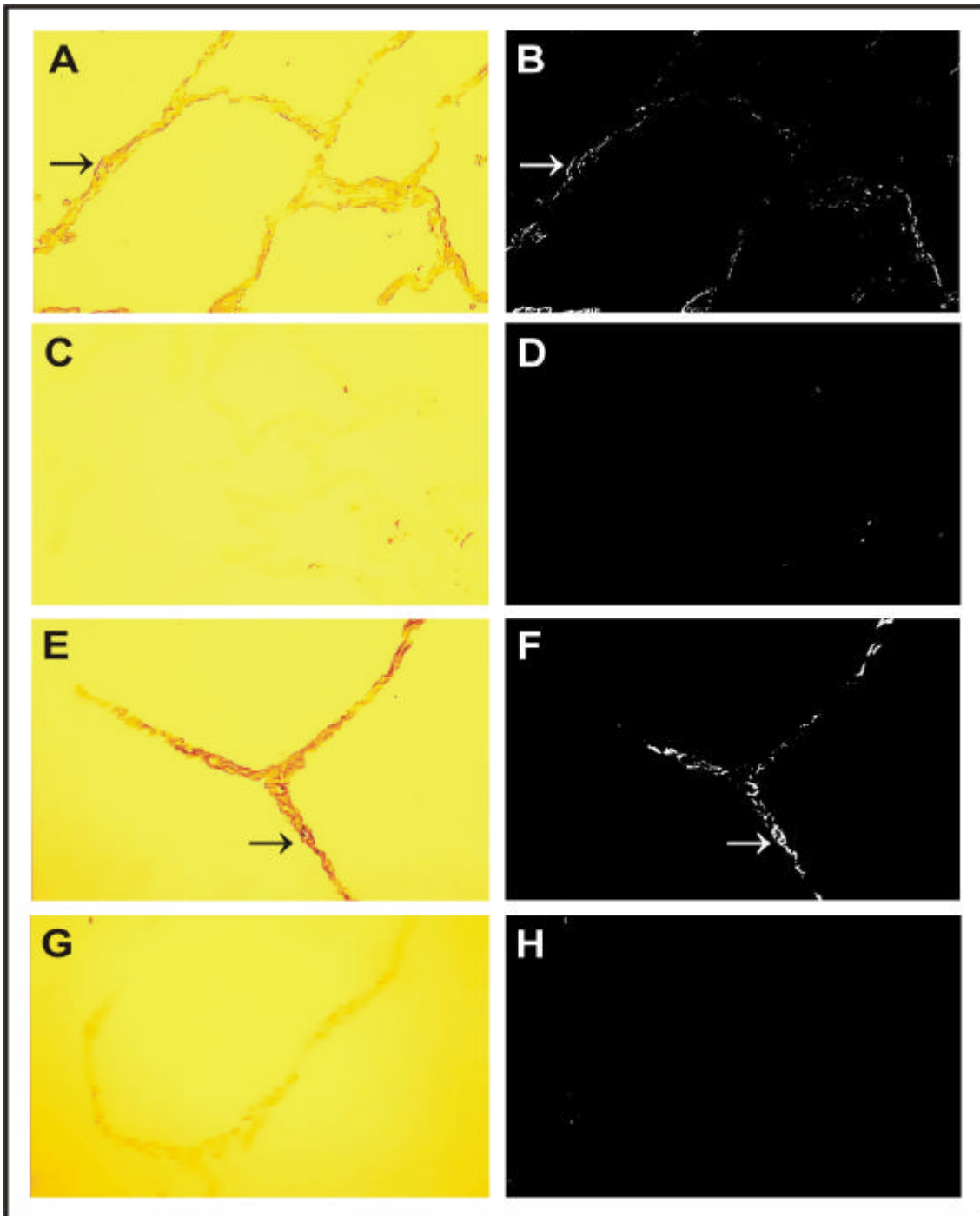


Abbildung 10: Quantifikation des Gehaltes an kollagenen Fasern: Lichtmikroskopische Bilder von Alveolarsepten einer CF-Lunge (E,G) und einer nCF-Lunge (A,C). Die kollagenen Fasern stellen sich nach einer immunhistochemischen Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen Kaninchen IgG dunkelrot dar (Pfeile A,E). Die Bilder (B,F) zeigen die zur Flächenberechnung herangezogenen schwarz-weißen Maskimages. Die kollagenen Fasern stellen sich weiß dar (Pfeile B,F). Um eine unspezifische Bindung des 2. HRP-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen auszuschließen wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei der die Präparate nur mit dem 2. Antikörper inkubiert wurden. Die lichtmikroskopischen Bilder (C,G) und die dazugehörigen schwarz-weißen Maskimages (D,H) zeigen die Kontrollfärbung. 200fache Vergrößerung.

Die markierte weiße Fläche wurde über „Evaluate“ und „Data Histogramm“ berechnet und in μm^2 angegeben. Wie auch bei der Quantifizierung der PMN wurden pro Dünnschnitt zwischen 15 und 20 Bildausschnitte betrachtet und zunächst die Länge der Alveolarsepten ausgemessen. Dabei entsprachen 4 cm einem Marker von 50 μm . Anschließend wurde über das erstellte Makro des KS 300 die Fläche der dunkelrot dargestellten elastischen Fasern sowie die Fläche der nach der immunhistochemischen Färbung mit einem polyklonalen Antikörper ebenfalls dunkelrot gefärbten kollagenen Fasern in μm^2 berechnet. Der über Threshold eingegebene Rotton, zur Berechnung des Elastin- und Kollagengehaltes, wurde für jeden Färbedurchgang optimiert, da es bei jeder Färbung zu geringen Abweichungen der Farbintensität der elastischen und kollagenen Fasern kam. Zur Überprüfung der immunhistochemischen Färbung wurde für jedes Präparat eine Kontrolle mitgeführt, bei der nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurde.

Um keine falsch positiven Ergebnisse zu erhalten, wurde bei der mikroskopischen Einstellung der Präparate zur Quantifizierung der PMN sowie des Elastin- und Kollagengehaltes darauf geachtet, dass die zu beurteilenden Bilder keine Gefäßanschnitte enthielten, da die PMN über die Blutbahn an den Ort der Entzündungsreaktion gelangen und sich folglich an Gefäßanschnitten vermehrt aufhalten und Gefäße reichlich elastische und kollagene Fasern enthalten.

2.15. Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz zur Darstellung von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop. Sowohl für die Darstellung von *S. aureus* als auch für *P. aeruginosa* wurden aus 13 CF-Patientenlungen jeweils 2 Paraffinschnitte sowie 2 Gefrierschnitte aus unterschiedlichen Lungenlappenbereichen hergestellt. Nach der Färbung wurden bei 200facher mikroskopischer Vergrößerung pro Dünnschnitt jeweils 10 Gesichtsfelder ausgewertet. Auf allen Bildern waren keine Bakterien nachweisbar.

2.16. Statistische Analyse

Die Werte wurden mit dem Shapiro–Wilks–Test auf Normalität untersucht. Im Anschluss wurde der 2 schwänzige ungepaarte Student`s t–Test verwendet. p-Werte von weniger als 0,01 wurden als signifikant bezeichnet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SA) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Quantifizierung von PMN im Lungenparenchym von Patienten mit CF und einer Vergleichsgruppe von nCF-Patienten

Es wurden 11 CF-Patientenlungen und 7 nCF-Patientenlungen ausgewertet. Im Mittel wurden bei den CF-Patienten $13,05 \pm 3,12$ PMN pro mm Septum gezählt, in der Vergleichsgruppe der nCF-Patienten $4,3 \pm 1,35$ pro mm Septum. Die Anzahl der PMN im alveolaren Gewebe von CF-Patienten lag um den Faktor 3,03 höher als bei den nCF-Patienten. Es lag ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) zwischen der Anzahl der PMN in den Alveolarsepten von CF-Patientenlungen und der nCF-Patientenlungen vor. (Tab.1) (Abb.11).

Dieses Ergebnis stimmt mit der Hypothese überein, dass die emphysematischen und fibrotischen Veränderungen in den Alveolen der CF-Lungenpräparate auf eine Erhöhung der lokalen PMN-Zahlen zurückzuführen sind.

Tabelle 1: Mittelwert der Anzahl der PMN in den Alveolarsepten von 11 Patienten mit CF und von 7 nCF-Patienten pro mm Septum

	CF	Anzahl der PMN pro mm Septum	nCF
	14,6		3,1
	12,1		5,2
	13,5		3,5
	15,3		2,2
	16,9		5,8
	10,8		5,2
	15,8		5,1
	10,8		
	16,8		
	9,1		
	7,9		
Mittelwert	13,05		4,3
SA +/-	3,12		1,35

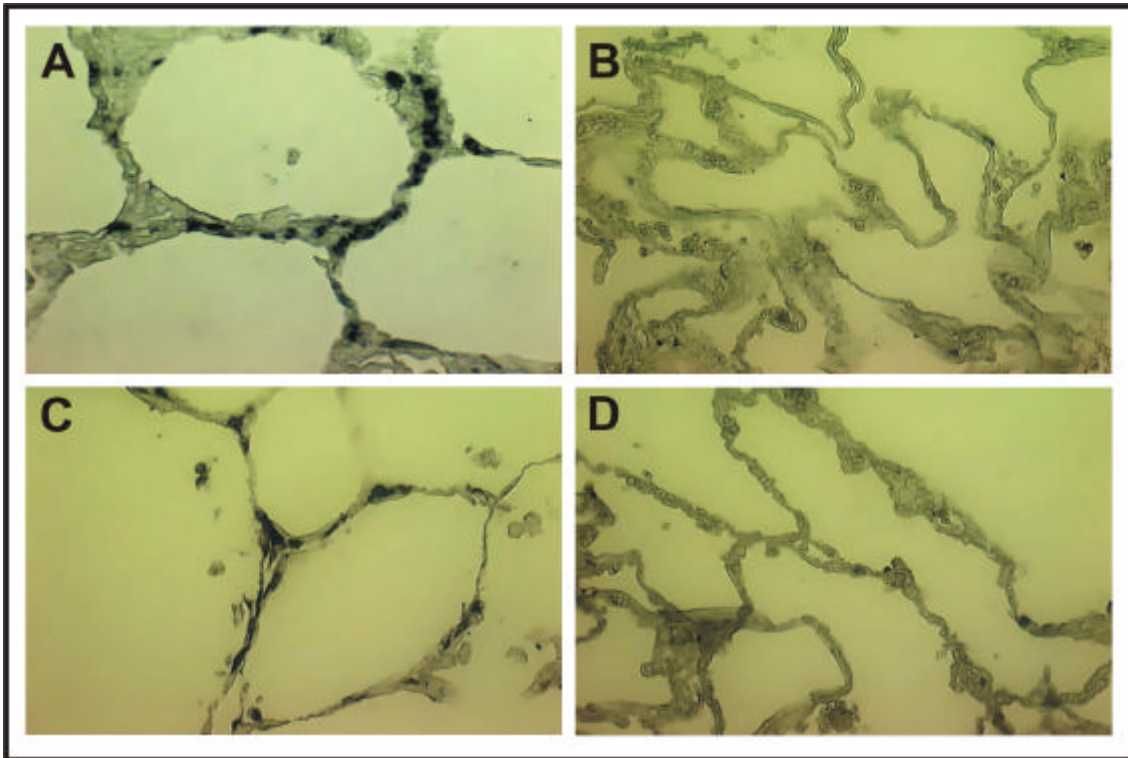


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Bilder (A-D) von Alveolarsepten einer CF- Lunge (A,C) und einer nCF-Lunge (B,D) nach immunohistochemischer Färbung. Die Anzahl der PMN ist in den Alveolarsepten der CF-Lungen deutlich höher als in den Alveolarsepten der Vergleichslungen der nCF-Patienten. 200fache Vergrößerung.

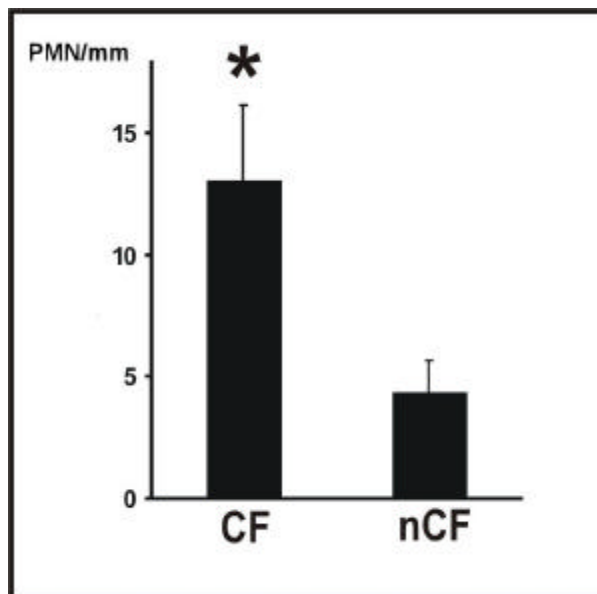


Abbildung 12 zeigt das Ergebnis des PMN-Nachweises in einem Balkendiagramm.

3.2. Quantifizierung des Gehaltes an elastischen Fasern im Lungenparenchym von Patienten mit CF und einer Vergleichsgruppe von nCF-Patienten

Es wurden 11 CF-Patientenlungen und 7 nCF-Patientenlungen ausgewertet. Der Gehalt an elastischen Fasern im alveolaren Gewebe von CF-Patienten lag um den Faktor 1,17 höher als bei den nCF-Patienten. Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,025$) zwischen dem Gehalt an elastischen Fasern im Lungenparenchym von CF-Patienten und nCF-Patienten nachgewiesen werden. (Tab. 2) (Abb. 12).

Dieses Ergebnis zeigt keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Elastinwerte zwischen CF-Patienten und nCF-Patienten und unterstützt damit nicht die Annahme eines verstärkten Elastinabbaus in den CF-Lungen. Es ist jedoch anzunehmen, dass es zu einem Elastinabbau in beiden Gruppen gekommen ist.

Tabelle 2: Mittlere Gehalt an elastischen Fasern in μm^2 in den Alveolarsepten von 11 Patienten mit CF und 7 nCF-Patienten pro mm Septum

	CF	Gehalt an elastischen Fasern in μm^2 pro mm Septum	nCF
	0,81		0,73
	0,85		0,71
	0,87		0,62
	0,89		0,68
	0,78		0,69
	0,76		0,56
	0,72		0,83
	1,06		
	0,76		
	0,9		
	0,6		
Mittelwert	0,81		0,69
SA +/-	0,12		0,09

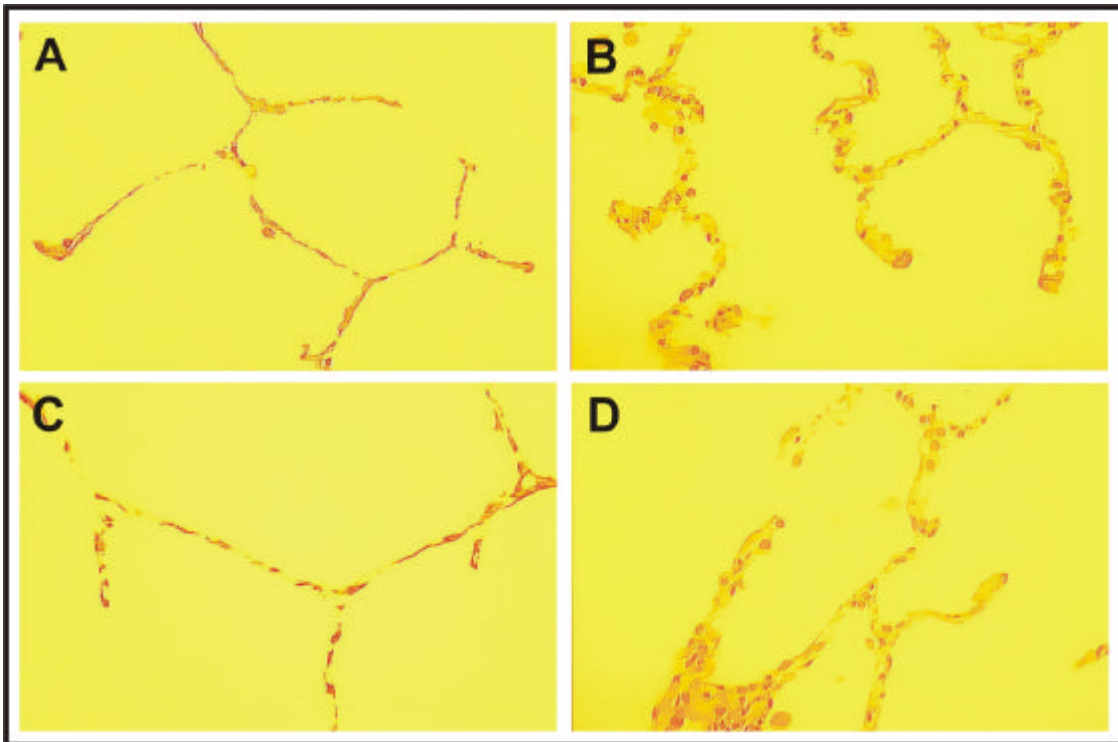


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Bilder (A-D) von Alveolarsepten einer CF-Lunge (A,C) und einer nCF-Lunge (B,D) nach der Elastica van Gieson-Färbung. Der Gehalt an Elastin zeigt sich in den CF-Lungen geringfügig höher als in den nCF-Lungen. 200fache Vergrößerung.

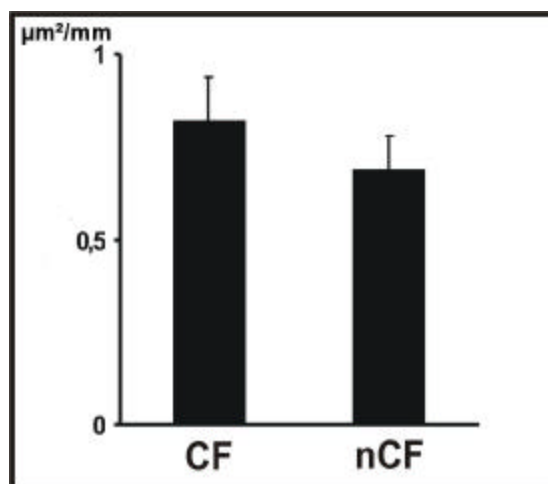


Abbildung 14 zeigt das Ergebnis des Elastin-Nachweises in einem Balkendiagramm.

3.3. Quantifizierung des Kollagengehaltes im Lungenparenchym von Patienten mit CF und einer Vergleichsgruppe von nCF-Patienten

Es wurden 11 CF-Patientenlungen und 6 nCF-Patientenlungen ausgewertet. Der Kollagengehalt lag im alveolaren Gewebe von CF-Patienten um den Faktor 1,5 höher als bei nCF-Patienten. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0005$) zwischen dem Kollagengehalt in der Lungenperipherie von CF-Patienten im Vergleich zu nCF-Patienten gezeigt werden. (Tab. 3) (Abb. 13).

Dieses Ergebnis spricht für die Annahme einer gesteigerten Kollagensynthese in den Alveolarsepten der CF-Patienten im Vergleich zu den nCF-Patienten.

Tabelle 3: Mittlere Gehalt an Kollagen in μm^2 in den Alveolarsepten von 11 Patienten mit CF und 6 nCF-Patienten pro mm Septum

	CF	Gehalt an kollagenen Fasern in μm^2 pro mmSeptum	nCF
	0,78		0,51
	1,29		0,73
	1,06		0,83
	0,72		0,56
	1,06		0,63
	0,96		0,69
	0,94		
	0,93		
	0,89		
	1,25		
	0,98		
Mittelwert	0,99		0,66
SA +/-	0,17		0,11

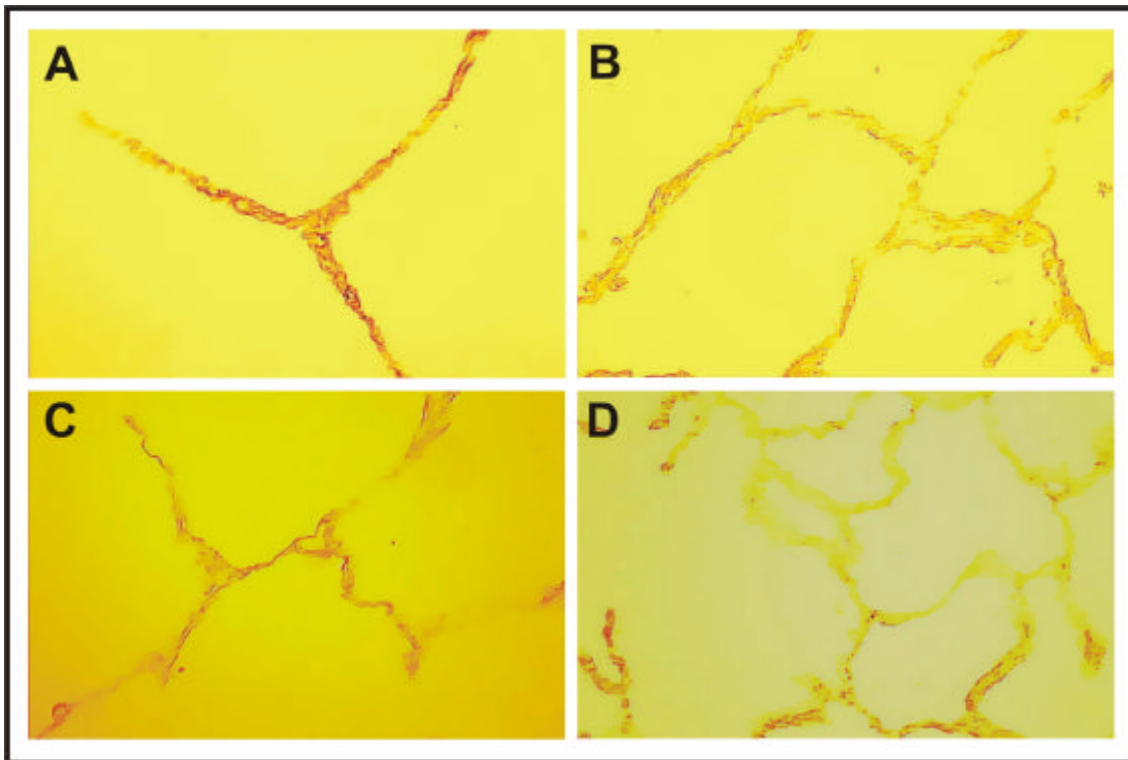


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Bilder (A-D) von Alveolarsepten einer CF- Lunge (A,C) und einer nCF-Lunge (B,D) nach immunhistochemischer Färbung. Der Gehalt an Kollagen ist in den CF-Lungen signifikant höher als in den nCF-Lungen. 200fache Vergrößerung.

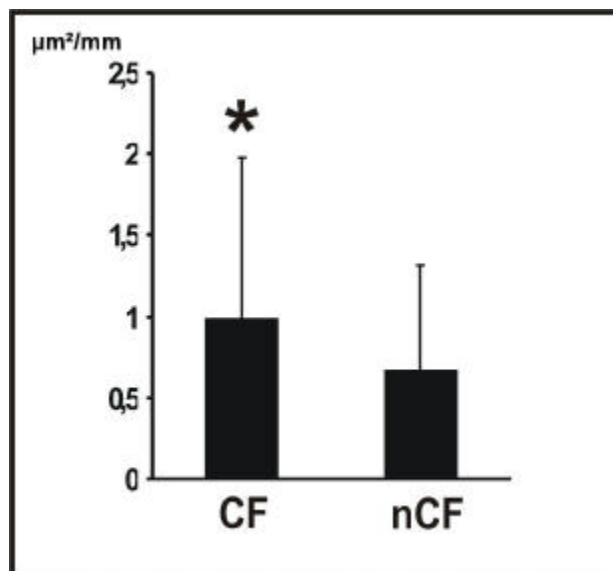


Abbildung 16 zeigt das Ergebnis des Kollagen-Nachweises in einem Balkendiagramm.

3.4. Quantifizierung der indirekten Immunfluoreszenz zur Darstellung von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*

Es wurden jeweils 26 Paraffinschnitte und 26 Gefrierschnitte auf *S. aureus* und *P. aeruginosa* untersucht. Pro Dünnschnitt wurden 10 Gesichtsfelder ausgewertet. In allen ausgewerteten Schnitten konnte weder *S. aureus* noch *P. aeruginosa* nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Lungenalveolen der CF-Patienten frei von Bakterien sind.

4. Diskussion

In der Lungenperipherie von CF-Patienten findet man strukturelle Veränderungen der Alveolen wie emphysematische Erweiterungen und fibrotisch verdickte Septen. Um zu untersuchen, ob an diesen Umbauprozessen in der Lungenperipherie den PMN eine Bedeutung zukommt, wurde die Anzahl der PMN, der Anteil an elastischen Fasern und der Kollagengehalt in den Alveolarsepten in den Lungen von CF-Patienten und nCF-Patienten quantifiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der PMN in den Alveolarsepten von Patienten mit CF um den Faktor 3 höher liegt, als in der Vergleichsgruppe der nCF-Patienten. Während jedoch der Tracheobronchialtrakt der CF-Patienten mit Bakterien, vor allem *P. aeruginosa* und *S. aureus* besiedelt ist, die den Einstrom von PMN aus der Blutbahn in das Lumen der Bronchien erklärt, sind in der Lungenperipherie keine Bakterien nachweisbar, die den Influx der PMN erklären könnten.

Bei CF findet ein zystisch-fibrotischer Umbau der Lunge [Murray und Nadel, 2000] mit Alveolardestruktion statt. Wie diese Umbauvorgänge bei CF begründet werden, ist nicht genau geklärt. Allgemein gilt, dass Entzündungen der Lungen, wie z.B. bei Pneumonien, Bronchiolitis oder Alveolitiden zu einer Aktivierung von Entzündungszellen wie PMN, Makrophagen und Granulozyten führen, die Mediatoren und Zytokine (z.B. TNF, Interleukin 6, Interleukin 8, IGF 1) abgeben und über eine Stimulation von Fibroblasten die Kollagensynthese anregen. Dabei wird funktionsfähiges Lungengewebe durch Bindegewebe ersetzt, es kommt zu einer Fibrosierung des Lungengewebes [Murray und Nadel 2000]. Auch das Emphysem stellt eine Reaktionsform der Lunge auf einen chronischen Entzündungsreiz dar. Es führt zur einer Vergrößerung der Lufträume distal der Bronchioli terminales.

Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1, TNF- α , Interleukin 6 und Interleukin 8 wirken chemotaktisch auf die PMN [Murray und Nadel 2000]. Bonfield

et al. 1995 konnten zeigen, dass die Konzentration an Interleukin 1, TNF- α , Interleukin 6 und Interleukin 8 in der bronchioalveolaren Lavage (BAL) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe deutlich erhöht waren, während das antiinflammatorisch wirkende Zytokin Interleukin 10 bei CF-Patienten erniedrigt und bei der gesunden Kontrollgruppe erhöht war. Jane Shute (Shute *et al.* 2001 unveröffentlichte Studie) konnte über eine immunhistochemische Färbung Interleukin 8, welches chemotaktisch auf PMN wirkt, in den Alveolarsepten von CF-Patienten nachweisen. Baltimore *et al.* 1989 konnte Bakterien nur in den Bronchien nachweisen, nicht aber im Lungeninterstitium. In der hier vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder *P. aeruginosa* noch *S. aureus* in den Alveolen von CF-Patienten nachweisbar sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der PMN in den Alveolarsepten von Patienten mit CF um den Faktor 3 höher liegt, als in der Vergleichsgruppe der nCF-Patienten. Man kann daraus folgern, dass die PMN in der Lungenperipherie von CF-Patienten nicht wie im oberen Tracheobronchialtrakt von Bakterien angelockt werden, sondern durch proinflammatorischen Zytokine in die Alveolarwand von CF-Patienten gelangen und die hohe Anzahl von PMN, wie sie in dieser Arbeit ermittelt wurden, erklären.

PMN sind in der Lage ihre Protease, die Elastase, abzugeben. Freie, nicht gebundene Elastase kann Elastin und andere extrazelluläre Strukturproteine des Lungengewebes abbauen [Vogelmeier 1996]. In einem Tierversuch mit Hamstern konnten Snider *et al.* 1994 zeigen, dass intratracheal verabreichte Elastase zu einer Emphysementstehung in den Hamsterlungen führt. Studien mit Elastase behandelten menschlichen Lungengewebe zeigten elektronenmikroskopisch strukturelle Veränderungen der elastischen Fasern mit einer deutlichen Verminderung der Alveolarsepten und emphysematischen Erweiterungen [Morris *et al.* 1993]. Bei dieser Untersuchung von Morris *et al.* wurde das Lungengewebe in mehreren Versuchen unterschiedlich langen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Elastasekonzentrationen ausgesetzt. Es hat sich gezeigt, dass die elastischen Fasern bei einer Inkubationszeit von 30 min und einer Elastasekonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ am stärksten angegriffen und

beschädigt waren. Viglio *et al.* 2000 konnten mit Hilfe von biochemischen Nachweisverfahren einen erhöhten Gehalt an den elastasespezifischen Abbauprodukten Desmosin und Isodesmosin im Urin von CF-Patienten nachweisen. Der mittlere Gehalt an Desmosin betrug bei gesunden Nichtrauchern $9,31 \pm 2,75 \mu\text{g} \times \text{g Kreatinin}^{-1}$ und an Isodesmosin $7,34 \pm 1,95 \mu\text{g} \times \text{g Kreatinin}^{-1}$. Bei Rauchern mit normaler Lungenfunktion zeigten sich leicht erhöhte Desmosinwerte von $11,97 \pm 2,75 \mu\text{g} \times \text{g Kreatinin}^{-1}$ und leicht erhöhte Isodesmosinwerte von $8,08 \pm 1,28 \mu\text{g} \times \text{g Kreatinin}^{-1}$. Noch höher lag der mittlere Gehalt an Desmosin und Isodesmosin bei Patienten mit exacerbierter COPD (Desmosin $17,15 \pm 2,33$ und Isodesmosin $13,67 \pm 2,87 \mu\text{g} \times \text{g Kreatinin}^{-1}$). Die Patienten mit exacerbierten COPD waren alle Raucher mit einer Raucheranamnese von 38 ± 8 pack-years. Der mittlere Gehalt von Desmosin ($23,39 \pm 2,02 \mu\text{g} \times \text{g Kreatinin}^{-1}$) und Isodesmosin ($18,14 \pm 4,11 \mu\text{g} \times \text{g Kreatinin}^{-1}$) war bei Patienten mit CF am stärksten erhöht. Die Ergebnisse von Viglio *et al.* 2000 zeigen, dass die spezifischen Abbauprodukte des Elastins, Desmosin und Isodesmosin im Urin von Rauchern, von Patienten mit einer exacerbierten COPD und von Patienten mit CF im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern erhöht sind. Die erhöhten Werte der spezifischen Elastinabbauprodukte Desmosin und Isodesmosin im Urin sprechen für eine gesteigerte Elastaseaktivität in den Lungen dieser Patienten. Elastin kommt außer in den Lungen auch in den Gefäßwänden und in der Haut vor [Viglio *et al.* 2000]. Bei den untersuchten Patientengruppen konnte eine Haut- bzw. Gefäßerkrankungen ausgeschlossen werden, so dass es sich bei den erhöhten Desmosin- und Isodesmosinwerten im Urin von Rauchern, im Urin von Patienten mit exacerbierten COPD und im Urin von CF-Patienten aufgrund der chronischen Lungenentzündung am ehesten um Elastinabbauprodukte aus der Lunge handelt.

Ein erhöhter Elastinabbau in den Alveolarsepten der Lungen von CF-Patienten würde auch mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen erhöhten Anzahl von PMN und der damit verbundenen vermutlich erhöhten Sekretion von Elastase in der Lungenperipherie von CF-Patienten übereinstimmen. Ein gesteigerter Elastinabbau durch die Elastase würde auch die Emphysementstehung in der

Lungenperipherie bei CF-Patienten erklären [Morris *et al.* 1993]. In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil an elastischen Fasern in der Lungenperipherie von CF-Patienten und dem Anteil an elastischen Fasern der nicht an CF-erkrankten Kontrollgruppe festgestellt werden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass es sowohl in der Gruppe der CF-Patienten als auch in der Kontrollgruppe der nCF-Patienten zu einem Elastinabbau gekommen ist und dass der Elastin Gehalt in beiden Gruppen annähernd gleich erniedrigt ist. Auch die Untersuchungen von Viglio *et al.* 2000 zeigen, dass die spezifischen Abbauprodukte des Elastins Desmosin und Isodesmosin sowohl bei Rauchern als auch bei Patienten mit CF deutlich erhöht waren. Bei CF-Patienten ist der gesteigerte Elastinabbau in der Lungenperipherie durch die hohen Zahlen an PMN erklärbar und der damit verbundenen erhöhten Freisetzung von Elastase. Bei den nicht an CF-erkrankten Patienten handelte es sich um Bronchialkarzinompatienten mit einer langjährigen Raucheranamnese. Zigarettenrauch führt zu einem chronischen Entzündungsreiz und induziert durch eine gesteigerte Freisetzung von Elastase durch die PMN eine Elastindegeneration [Renz-Polster und Braun. Innere Medizin, Urban & Fischer, 1999]. Zusätzlich führt Zigarettenrauch zu einer Inaktivierung von α_1 -Antitrypsin, so dass das Proteasen-Antiproteasen-Gleichgewicht gestört ist [Herold, Innere Medizin, 2003] und zu einer Elastindegeneration führt. Ein erhöhter Elastinabbau im Alter ist physiologisch und begünstigt die Entwicklung eines Altersemphysem. Im Mittel sind die nCF-Patienten $58 \pm 9,6$ Jahre, so dass das höhere Alter der nCF-Patienten für einen gesteigerten physiologischen Elastinverlust spricht [Zöllner, Innere Medizin, Springer-Verlag 1991].

Ein Parameter, der mit einem gesteigerten Elastinverlust einhergeht, ist FEV_1 . Die FEV_1 ist das forcierte expiratorische Volumen, welches in der ersten Sekunde mit maximaler Anstrengung ausgeatmet werden kann. Die FEV_1 ist bei obstruktiven, restriktiven Lungenerkrankungen und beim Emphysem erniedrigt. [Renz-Polster und Braun. Innere Medizin, Urban & Fischer, 1999].

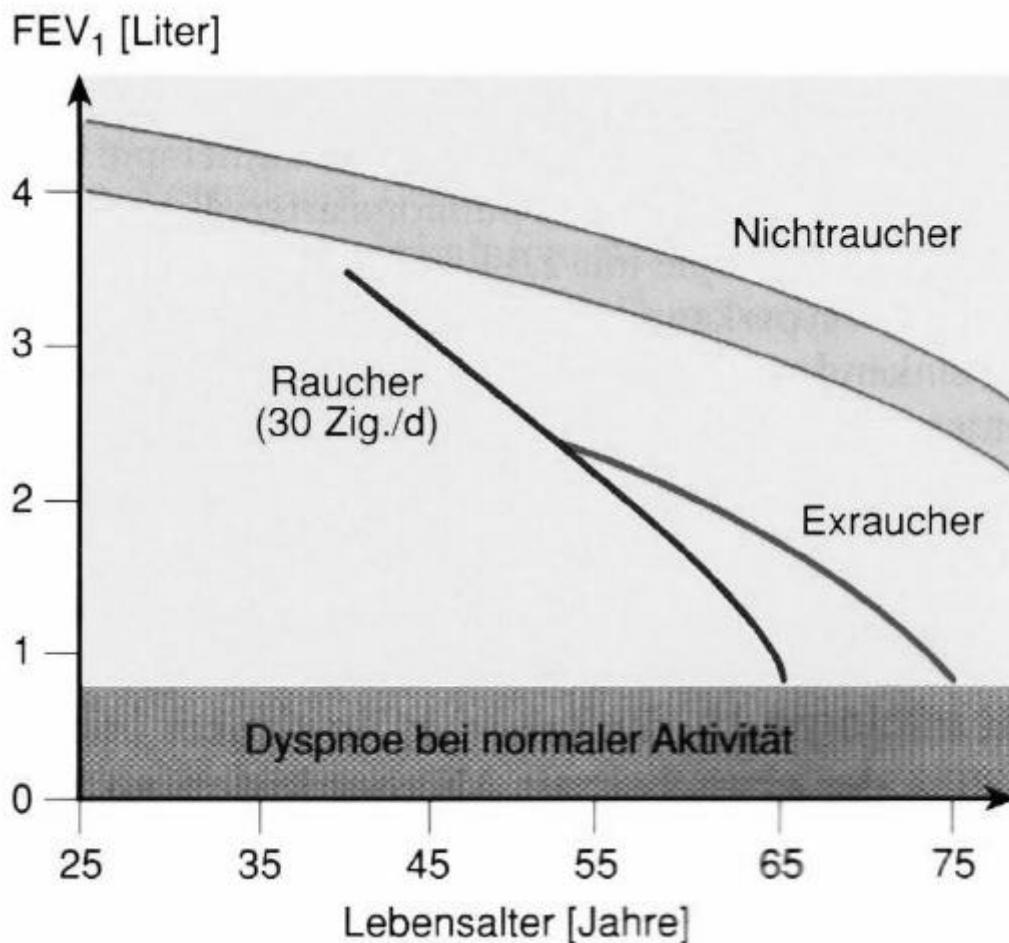


Abbildung 17: Abnahme des Lungenfunktionsparameters FEV₁ in Abhängigkeit vom Alter. Darstellung für Nichtraucher, Raucher und Exraucher [aus Classen, Diehl, Kochsiek, Innere Medizin, Urban&Schwarzenberg 1998].

Lucey *et al.* 1998 konnte zeigen, dass dem Elastinabbau eine gesteigerte Kollagen- und Elastinsynthese entgegen wirkt. In einem Tierversuch mit Hamsterlungen konnte gezeigt werden, dass durch Schweinepankreaselastase induzierte Emphyseme in den Hamsterlungen mit einer Verminderung des Elastingehaltes einhergehen, jedoch wurde der Ausgangswert des Elastins nach einer Erholungsphase von 30 Tagen wieder erreicht. Bei der histologischen Beurteilung der elastischen Fasern im Alveolarbereich zeigten sich jedoch auch noch nach der Erholungsphase von 30 Tagen, trotz der vermehrten Expression der mRNA des Elastins und des Kollagens, starke strukturelle Veränderungen der Alveolarsepten.

Der in dieser Arbeit ermittelte Kollagengehalt war in den Lungen der CF-Patienten um den Faktor 1,5 höher als in den Lungen der nicht an CF-erkrankten Kontrollgruppe. Daraus lässt sich schließen, dass es in den Lungen der CF-Patienten zu einer gesteigerten Kollagensynthese im Vergleich zu den nicht an CF-erkrankten Kontrollgruppe kommt. PMN sind nicht nur in der Lage Elastase zu sezernieren, sondern als Entzündungszellen führen sie nach einer Gewebeschädigung auch zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren [Murray und Nadel 2000], die über eine Stimulierung von Fibroblasten und epithelialen Zellen die Kollagensynthese anregen [Murray und Nadel 2000]. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, war die Anzahl der PMN in den Alveolarsepten von Patienten mit CF um den Faktor 3 höher als in der Kontrollgruppe der nicht an CF-erkrankten Patienten. Da die PMN in der Lage sind die Kollagensynthese anzuregen, ist die erhöhte Anzahl der PMN in den Alveolarsepten der CF-Patienten eine Erklärungsmöglichkeit für die gesteigerte Kollagensynthese in den Lungen von CF-Patienten. Es ist anzunehmen, dass es auch in den Alveolarsepten der Kontrollgruppe zu einer leicht gesteigerten Kollagensynthese gekommen ist. Die Tumorerkrankung, die langjährige Raucheranamnese sowie der verminderte Elastingehalt sprechen für eine Anregung der Kollagensynthese, die jedoch in ihrer Ausprägung wahrscheinlich nicht so stark ist wie bei CF.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist in den Alveolarsepten von CF-Patienten die Anzahl der PMN, trotz steriler Umgebung, und der Kollagengehalt signifikant erhöht. Der Elastingehalt ist in den Lungen von CF-Patienten im Vergleich zu den Lungen der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Es ist jedoch anzunehmen, dass es in beiden Gruppen zu einem vermehrten Elastinabbau gekommen ist.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die PMN, angelockt durch proinflammatorische Zytokine in die Alveolen der CF-Patienten, über eine Elastase-induzierte Gewebeschädigung des Lungenparenchyms zu einer Destruktion der

Alveolarsepten mit nachfolgendem Lungenemphysem führen und über eine gesteigerte Kollagensynthese zu einer Fibrosierung der Lunge beitragen.

Meine Ergebnisse sind leider noch nicht ausreichend, um einen definitiven Zusammenhang zwischen dem Entzündungsgeschehen und der Destruktion der Alveolarsepten in den Lungen von CF-Patienten darzustellen. Um diesen Zusammenhang besser darstellen zu können wäre es sinnvoll, einen histologischen Vergleich von Lungenpräparaten einer CF-Gruppe und einer gesunden, nicht-rauchenden Kontrollgruppe durchzuführen, die auch im Lebensalter annähernd übereinstimmen. Weiterhin wäre es sinnvoll, histologische Verlaufsuntersuchung von Lungenpräparaten von Patienten mit CF durchzuführen. Angefangen im Säuglingsalter, über Kindes –und Jugendalter bis hin zum Erwachsenen, um so den Verlauf der Lungenerkrankung und das morphologische Korrelat der Lungenerkrankung besser darstellen zu können. Diese Untersuchungen sind aus ethischen Gründen jedoch nicht durchführbar.

5. Zusammenfassung

Die chronische bakterielle Infektion in der Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) bewirkt eine chronische Entzündung mit fibrotischen und bronchiectatischen Veränderungen in den Bronchien. Über den Pathomechanismus, der dem gleichzeitigen entzündungsbedingten Umbau des Alveolargewebes zu Grunde liegt, ist nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in den Alveolarsepten von CF-Patienten polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) zu einem gesteigerten Umsatz der Kollagen – und der Elastinfasern führen und dadurch eine periphere Lungendestruktion bewirken können.

In den Alveolarsepten im Lungengewebe von 11 CF-Patienten und von 7 nCF-Patienten wurde die Zahl der PMN mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die neutrophile Elastase bestimmt. Weiterhin wurde der Gehalt an Kollagen mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen Kollagen Typ I und die Elastinkonzentration mit der Elastica van Gieson-Färbung quantifiziert. Der Nachweis von Bakterien erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die lichtmikroskopische Auswertung wurde mit Hilfe eines Image-Analysers und des Kontron-Imaging-Systems durchgeführt.

In den Septen von CF-Patienten ($13,05 \pm 3,12$ PMN/mm) waren dreimal mehr PMN nachweisbar als in den Septen der Kontrollgruppe ($4,30 \pm 1,35$ PMN/mm, $p < 0,0001$). Der Kollagengehalt ($0,99 \pm 0,17$ vs. $0,66 \pm 0,11 \mu\text{m}^2/\text{mm}$) war um einen Faktor von 1,5 erhöht ($p < 0,0005$), während die Elastinkonzentration ($0,81 \pm 0,12$ vs. $0,69 \pm 0,09 \mu\text{m}^2/\text{mm}$) nicht signifikant verändert war. Bakterien waren in sämtlichen untersuchten Präparaten aus der Lungenperipherie nicht nachweisbar.

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest	doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest	einfach destilliertes Wasser
ARDS	Adult respiratory distress syndrom
CF	Cystische Fibrose
nCF	nicht an cystischer Fibrose erkrankte Personen
Cy3	Anti-Maus- Indocarbocyanin 3
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DAB	3,3 –Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
HRP	horse radish Peroxidase
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PDGF	Thrombozyten abgeleiteter Wachstumsfaktor
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
SLPI	humaner sekretorischer Leukozytenproteaseninhibitor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β

7. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Übersicht über die einzelnen Abschnitte der unteren Atemwege	9
Abbildung 2: Histologischer Schnitt von Alveolen	10
Abbildung 3: Septum interalveolare und Blut – Luftschanke	11
Abbildung 4: Ausschnitt über den Querschnitt eines Bronchus	12
Abbildung 5: Histologischer Schnitt von Alveolen mit einem Lungenemphysem.	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kollagensynthese	19
Abbildung 7: Darstellung der elastischen Fasern mittels der Elastica van Gieson-Färbung.	29
Abbildung 8: Quantifikation von PMN	33
Abbildung 9: Quantifikation des Gehaltes an elastischen Fasern	34
Abbildung 10: Quantifikation des Gehaltes an kollagenen Fasern	35
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Bilder von Alveolarsepten einer CF-Lunge und einer nCF-Lunge zur Darstellung des Ergebnisses des PMN-Nachweises	39
Abbildung 12: Graphische Darstellung des Ergebnisses des PMN-Nachweises in einem Balkendiagramm	39
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Bilder von Alveolarsepten einer CF-Lunge und einer nCF-Lunge zur Darstellung des Ergebnisses des Elastingehaltes	41
Abbildung 14 Graphische Darstellung des Ergebnisses des Elastin-Nachweises in einem Balkendiagramm	41

Abbildung 15: Lichtmikroskopische Bilder von Alveolarsepten einer CF– Lunge und einer nCF–Lunge zur Darstellung des Ergebnisses des Kollagengehaltes	43
Abbildung 16 Graphische Darstellung des Ergebnisses des Kollagen- Nachweises in einem Balkendiagramm	43
Abbildung 17: Abnahme des Lungenfunktionsparameters FEV ₁ in Abhängigkeit vom Alter	49

8. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Mittelwert der Anzahl der PMN in den Alveolarsepten von 11 Patienten mit CF und von 7 nCF-Patienten pro mm Septum	38
Tabelle 2: Mittlere Gehalt an elastischen Fasern in μm^2 in den Alveolarsepten von 11 Patienten mit CF und 7 nCF-Patienten pro mm Septum	40
Tabelle 3: Mittlere Gehalt an Kollagenen in μm^2 in den Alveolarsepten von 11 Patienten mit CF und 6 nCF-Patienten pro mm Septum	42

9. Literatur

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle, 1995, Verlagsgesellschaft mbH.

Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathological study. Am J Dis Child 1938; 56:334-340.

Anderson MP, Rich DR, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. Science 1991; 251:679-682.

Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W, Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1995; 20:63-70.

Baltimore RS, Christie CDC, Smith GJW. Immunohistopathologic localization of Pseudomonas aeruginosa in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. Am Rev Respir Dis 1989; 140:1650-61

Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thomson S, Howard PW, Maurer RA, Mulligan R, Smith AE, Welsh MJ. Identification and regulation of the CFTR-generated chloride channel. J Clin Invest 1991; 88:1422-1431.

Birrer P, McElvany NG, Rudeberg A, Wirz-Sommer C, Liechti-Gallati S, Kraemer R, Hubbard R, Crystal RG. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150:207-213.

Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. Cystic Fibrosis. In the metabolic basis of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. McGraw-Hill, Inc., New York 1989; 2649-2680.

Boat TF, Cheng PW, Leigh ME. Biochemistry of mucus. In airway secretion, edited by Tamaotsu Takishima and Sanae Shimura 1994; Vol.72:217-288.

Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152:2111-8.

Boucher R, Stutts M, Knowles M, Cantely L, Gatzky J. Na^+ Transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. J. Clin. Invest. 1986; 78:1245-1252.

Curran RC, Crocker J. Atlas der Histopathologie, Springer-Verlag, 2000.

Classen, Diehl, Kochsiek. Innere Medizin, Urban & Schwarzenberg, 1998

Devra P. Rich, Matthew P. Anderson, Richard J. Gregory, Seng H. Cheng, Sucharita Paul, Douglas M. Jefferson, John D. McCann, Katherine W. Klinger, Alan E. Smith, Micheal J. Welsh. Expression of cystic fibrosis transmembrane airway epithelial cells. *Nature* Sept. 1992; Vol 347:358-363.

Davis PB, Drumm M, and Konstan MW. Cystic Fibrosis. *Am J Resip Crit Care Med* 1996;154:155-162.

Döring G, Knight R and Bellon G. Immunology of cystic fibrosis. In *Cystic Fibrosis*. Hodson ME, Geddes D, editors. Chapman and Hall, London. 1995; 99-129.

Döring G, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphnuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol* 1995; 154:4842-50

Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, Rennard SI, Crystal RG. Antielastases in the human alveolar structures. Implications for the protease – antiprotease theory of emphysema. *J Clin Invest* 1981; Vol: 889-898.

Götz MH, Burghuber OC, Salzer – Muhar U, Woloszczuk W, Weissel M, Hartter E. Cor pulmonale in cystic fibrosis. *J R Soc Med*.1989; 82 (Suppl 16):26 – 31.

Goldstein W, Döring G. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1986;134: 49-56.

Gibson and Cooke. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing piocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23:545-549.

Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 44:35-51.

Greiling, Gressner. *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*, Schattauerverlag, 1994.

Herold G, *Innere Medizin* 2003

Hodson ME., Geddes DM. *Cystic fibrosis*. Chapman and Hall, London 1995.

Junquera und Carneiro. *Histologie*, Springer-Lehrbuch, 1991.

Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accuroso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am Respir Crit Care Med*1995; 151:1075-1082.

Knowles MR, Gatzky J, Boucher R. Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 1983; 71:1410-1417.

Knowles MR, Olivier K, Boucher RC. Pharmacologic modulation of salt and water in the airway epithelium in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* 1995; 151:S65-S69.

Koch C, Hoiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*.1993; 341:1065-1069.

Konietzko, Wendel, Wiesner. *Erkrankungen der Lunge*. Walter de Gruyter-Verlag 1995.

Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: Onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 1997; 24:137-142.

Kraemer R. Assessment of functional abnormalities in infants and children with lung disease. *Agents Actions* vol 1993;40.

Lamblin G, Aubert JP, Perini JM, Klein A, Porchet N, Degand P, Roussel P. Human respiratory mucins. *Eur Respir J* 1992;5:247-256.

Larivee P, Rieves RD, Stewart J, Shelhamer Levine and James H. Airway inflammation and mucos hypersecretion. In *airway secretion* edited by Tamotsu Takishima and Sanae Shimura 1994; Vol 72:469-512

Lang MR, Fiaux GW, Gillooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs. *Thorax* 1984; 49:319-326.

Linnemann M, Kühl M. *Biochemie für Mediziner*, Vieweg, 1995.

Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag 1998.

Lucey EC, Goldstein RH, Stone PJ, Snider GL. Remodeling of alveolar walls after elastase treatment of hamsters. *Am J Respir Crit Care Med*, vol 1998.

Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airway disease. *Cell* 1998; 95:1005-15.

Mearns MB, Hunt GH, Rushworth R. Bacterial flora of respiratory tract in patients with cystic fibrosis, 1950 – 71. *Arch Dis Child* 1972; 47:902–907.

Meyer KC, Lewandoski JR, Zimmermann JJ, Nunley D, Calhoun WJ, Dopico GA. Human neutrophil elastase and elastase/ α_1 - antiprotease complex in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:580-585.

Morris SM, Stone PJ and Snider GL. Electron microscopic study of human lung tissue after in vitro exposure to elastase. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 851-866.

Murray and Nadel. *Textbook of Respiratory Medicine*, Saunders, 2000.

Nakamura H, Yoshimura K, McElvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992; 89:1478-1484.

O'Connor CM, Gaffney K, Keane J, Southey A, Byrne N, O'Mahoney S, Fitzgerald MX. α_1 -Proteinase inhibitor, elastase activity, and lung disease severity in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1665-1670.

Pfreundschuh und Schölmerich. *Pathophysiologie und Pathobiochemie*, Urban & Fischer, 1999

Renz-Polster und Braun. *Innere Medizin*. Urban & Fischer, 1999.

Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 1993; 264:L413-L418.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahelo R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Jannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-1072.

Rommens J, Jannuzzi M, Kerem B, Drumm M, Melmer G, Dean M, Rozmahei R, Cole J, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan J, Tsui L, and Collins F. Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumbling. *Science* 1989; 245:1059-1065.

Sallenave JM, Morgan K, Gauldie L, and Kalsheker N. Elastase Inhibitors in the lung: expression and functional relationships. In *Molecular Biology of the Lung Vol.1: emphysema and infection* 1998; 69-95.

Schiebler TH, Schmidt W. und Zilles K. *Anatomie*, Springer-Lehrbuch, 1997.

Schuster A, Ueki I, Nadel JA. Neutrophil elastase stimulates tracheal submucosal gland secretion that is inhibited by ICI 200,355. *Am J Physiol* 1995; 262:L86-L91.

Senior RM, Bielefeld DR, Abensohn MK. The effects of proteolytic enzymes on tensile strength of human lung. *Am Rev Respir Dis* 1975; Vol 111.

Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller H,D. Lehrbuch der inneren Medizin, Thiemeverlag, 1992.

Siegenthaler W, Klinische Pathophysiologie, Thiemeverlag,1994.

Snider GL, Lucey EC, Christensen TG, Stone PJ, Calore JD, Catanese A, Franzblau C. Emphysema and bronchial secretory cell metaplasia induced in hamsters by human neutrophil products. Am Rev Respir Dis 1984; Vol.129-155.

Snider GL, Ciccolella DE, Morris SM, Stone PJ, Lucey EC. Putative role of neutrophil elastase in the pathogenesis of emphysema. Ann N Y Acad Sci 1991; 624:45-59.

Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Pitfalls in antiprotease therapy of emphysema. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150. S131-7.

Stevens A, und Lowe J. Histologie des Menschen, VCH Verlagsgesellschaft 1992.

Stockley RA. α_1 - Antitrypsin deficiency. In Molecular Biology of the Lung Vol 1: Emphysema and infection 1998; 37-53.

Stone PJ, Konstan MW, Berger M, Dorkin HL, Franzblau C and Snider GL. Elastin and collagen degradation products in urine of patients with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152:157-62.

Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton RR, Schumm JW, H Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Aktos G, Brown V, Helms C, Gravins T, Parker T, Rediker K, and Donis-Keller H. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. Science 1985; 230:1054-1057.

Viglio S, Iadarola PA, Lupi R, Trisolini C, Tinelli B, Balbi V, Grassi D, Worlitzsch D, Döring G, Meloni F, Meyer KC, Dowson L, Hill SL, Stockley RA, Luisetti M. MEKC of desmosine and isodesmosine in urine of chronic destructive lung disease patients. Eur Respir J 2000; 15:1039-1045.

Virca GD, Schnebli HP. The elastase- α_1 -proteinase inhibitor balance in the lung. Schweiz Med Wschr. 1984; 114:895-89.

Vogelmeier C, Döring G. Neutrophil proteinases and rhDNase therapy in cystic fibrosis. Eur Respir J 1996; 9:2193-2195.

Vogelmeier C, Hubbard RC, Fells GA, Schnebli HP, Thompson RC, Fritz H, Crystal RG. Anti – neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. J Clin Invest 1991; 87:482-488.

Wood RE, Wanner A, Hirsch J, Farrell PM. Tracheal mucociliary transport in patients with cystic fibrosis and its stimulation by terbutaline. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111:733-738.

Zöllner, *Innere Medizin*, Springer-Verlag, 1991.

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gerd Döring am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Gerd Döring danke ich für die Überlassung des Themas, sein ständiges Interesse an dieser Arbeit und seine vielfache Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Konrad Botzenhart danke ich für die Ausstattung des Arbeitsplatzes.

Für die Bereitstellung von CF-Lungenmaterial danke ich Scott Randell vom CF/Pulmonary Research and Treatment Centre in Chapel Hill, University of North Carolina, USA und Herrn Dr. Godehard Friedel von der Klinik Schillerhöhe der Landesversicherungsanstalt Württemberg, Stuttgart-Gerlingen, für die Bereitstellung von nCF-Lungenmaterial.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Wittenberg aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen für die Möglichkeit zur Arbeit am Schlittenmikrotom und für seine Einweisung der verschiedenen Färbemöglichkeiten.

Bei Frau Dr. Martina Ulrich und Herrn Dr. Dieter Worlitzsch möchte ich mich für die gute Betreuung, für ihre Hilfe und Ihr Interesse an dieser Arbeit bedanken.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Greiner, Simone
Geburtsdatum und -ort: 28. Januar 1974 in Schorndorf
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980-1984 Grundschohle Plüderhausen
1984-1990 Realschohle Plüderhausen
1990-1993 Staatliches Aufbaugymnasium Schwäbisch Gmünd

Berufsausbildung:

September 1993-
September 1995 Ausbildung zur medizinisch-technischen Assistentin
an der medizinisch-technischen Akademie Esslingen

Auslandsaufenthalt:

November 1995-
September 1996 Au –pair in Kokomo, Indiana, USA

Studium:

Wintersemester1996/97: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Freien Universität Berlin
September 1998: Physikum
August 1999: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1999: Wechsel an die Eberhard-Karls- Universität Tübingen
Januar 2000: Beginn der Promotion bei Herrn Prof. Dr. G. Döring,
am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelt-
Hygiene der Universität Tübingen
April 2002: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29. April 2003: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung