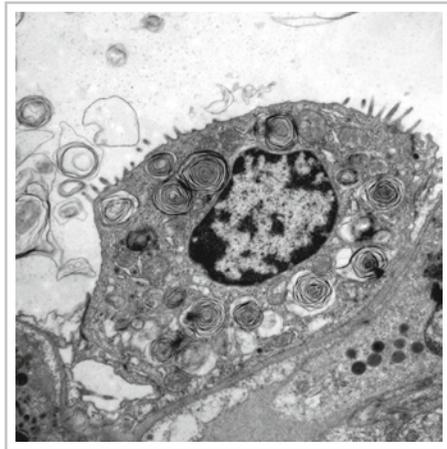


Allometrie des intrazellulären Surfactants der Lunge bei Säugetieren

André Franz Wirkes



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Allometrie des intrazellulären Surfactants
der Lunge bei Säugetieren**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

**André Franz Wirkes
aus Langen**

Gießen 2012

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
AG Elektronenmikroskopie, Prof. Dr. med. Christian Mühlfeld
der Medizinischen Fakultät der Universität Gießen**

Gutachter: Prof. Dr. C. Mühlfeld

Gutachter: Prof. Dr. Dr. T. Braun

Tag der Disputation: 27.06.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau der Säugetierlunge	1
1.2 Allometrie	3
1.3 Alveolarepithelzellen Typ II	4
1.4 Surfactant	5
1.5 Studienziel	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Menschliche Lungen und Tierlungen	8
2.2 Stereologie	9
2.3 Lichtmikroskopie	11
2.4 Elektronenmikroskopie	16
2.5 Statistik	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Lichtmikroskopische Ergebnisse	20
3.2 Elektronenmikroskopische Ergebnisse	27
4. Diskussion	35
4.1 Methodenkritik	35
4.1.1 Fixierung der Lungen	35
4.1.2 Stereologische Analysen	38
4.1.2.1 Genauigkeit und Präzision	39
4.1.3 Probenentnahme: Quelle des systematischen Fehlers	40
4.1.4 Datenerhebung: von 2D auf 3D schließen	42
4.1.5 Lichtmikroskopie	43
4.1.6 Elektronenmikroskopie	45
4.2 Ergebnisdiskussion	46
4.2.1 Die Physiologie der Lunge	46
4.2.2 Unterschiede der Meeres- und Landsäuger	48
4.2.3 Eine dünne Schicht Surfactant	49
4.2.4 Allometrie der postnatalen Entwicklung	50

4.2.5 Symmorphosis	51
4.2.6 Surfactant und Oberflächenspannung	52
4.2.7 Surfactant unter pathologischen Zuständen	54
4.2.8 Atemfrequenz und Surfactant-Zusammensetzung	55
4.2.9 Klinisch-therapeutische Relevanz	56
4.2.10 Lamellenkörper	57
4.2.11 Das Nachleben des Lamellenkörpers	59
4.2.12 Morphometrische Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies	60
5. Zusammenfassung	63
6. Abkürzungsverzeichnis	64
7. Abbildungsverzeichnis	65
8. Tabellenverzeichnis	66
9. Referenzen	67
Anhang	
I. Publikationen	84
II. Erklärung zur Dissertation	85
III. Danksagung	86
IV. Lebenslauf	87

1. Einleitung

1.1 Aufbau der Säugetierlunge

Das Körpergewicht landlebender Säugetiere reicht von wenigen Gramm bei der Etruskerspitzmaus bis zu mehreren Tonnen beim Elefanten. Die Lungen landlebender Säugetiere haben trotz dieser großen Spannweite von sechs Potenzen im Körpergewicht einen ähnlichen Aufbau. Der Luftweg führt über Nase und Mund/Maul in die Trachea, die mit Knorpelspannen aufgespannt ist. Von dort an folgt der Aufbau einem dichotomen Teilungsmuster, das mit der Teilung der Trachea in zwei Hauptbronchien, anders gesagt den Bronchien erster Generation, beginnt (Weibel u. Gomez 1962). Dieses dichotome Teilungsmuster setzt sich über etwa 23 Generationen fort. In diesem Verlauf teilen sich Bronchien in terminale Bronchiolen auf, die nun keinerlei Knorpelanteile mehr aufweisen. Ab der 15. Generation treten erste alveolenähnliche Aussackungen auf (Weibel 2009). Die Bronchiolen teilen sich dann in Ductus alveolares und diese schließlich, in der 15. bis 23. Generation, in die fast sphärischen Alveolen (Weibel u. Gomez 1962, Mercer et al. 1987, Weibel 2009). Die menschliche Lunge verfügt über durchschnittlich 480 Mio. Alveolen (Ochs et al. 2004a), die traubenförmig angeordnet sind und im Lichtmikroskop einer Honigwabe gleichen. Ihre Oberfläche misst in der menschlichen Lunge etwa 130 m² (Weibel u. Gomez 1962, Ochs 2006, Weibel 2009). Diese Oberfläche ist die Gasaustauschfläche für den eingeatmeten Sauerstoff und den im Blut transportierten CO₂. Unter ihr verläuft ein engmaschiges Netz von ca. 280 Mrd. kleiner Kapillarsegmente (Weibel u. Gomez 1962), durch die der vom Blut aufgenommene Sauerstoff in die Venae pulmonales und darüber zum Herzen gelangt, von wo aus er dem Körperkreislauf zugeführt wird. Die Kapillaren verlaufen innerhalb des Septums zwischen zwei Alveolen und sind somit von beiden Seiten dem Gasaustausch zugänglich (Weibel 2009). Die Luft-Blut-Schranke, die die Diffusionsbarriere für den Sauerstoff darstellt, wird durch drei aufeinander liegende Schichten gebildet: Durch sehr flache, weit auslaufende Zellen, Alveolarepithelzellen des Typs I (AE1-Zellen), ein schwach ausgebildetes Interstitium und das Endothel der Kapillaren. Zusätzlich wurde festgestellt, dass das in den Kapillaren befindliche Blutplasma der Diffusionsbarriere hinzugerechnet werden muss (Weibel 1993, Weibel 2009). Ihre Dicke variiert unter den Säugetieren zwischen einigen hundert Nanometern bis wenigen Mikrometern (Gehr et al. 1978, Maina u. West 2005, Weibel 1993). Die alveoläre Oberfläche wird in den Lungen landlebender Säugetiere zu 96% von den AE1-Zellen und zu 4% von Alveolarepithelzellen Typ II (AE2-Zellen) gebildet (Castranova et al. 1988, Williams 2003). Diese Oberfläche ist von verschiedenen Zellen wie Makrophagen besiedelt (Abb. 2.2).

Die Struktur der Säugetierlunge muss in ihrem Aufbau den mechanischen Belastungen der Ein- und Ausatmung standhalten (Mead 1961) und gleichzeitig optimale Bedingungen für den Gasaustausch bieten (Maina u. West 2005). Die Lunge wird umgeben von einer feinen Haut, der Pleura visceralis. Zwischen dieser und der Pleura parietalis, welche die innere Brustwand auskleidet, befindet sich ein Spalt, der beim Menschen mit wenigen Millilitern seröser Flüssigkeit gefüllt ist. Die beiden Blätter werden über die Adhäsionskräfte der Flüssigkeit zusammengehalten, sind dabei aber frei verschieblich. Bei der Einatmung wird mittels Muskelarbeit des Zwerchfells und der Interkostalmuskulatur der Brustkorb verbreitert. Da die beiden Pleurae adhäsiv miteinander verbunden sind, wird damit auch die Lunge gedehnt. Durch diese Volumenzunahme entsteht ein Unterdruck zur extrakorporalen Außenwelt, wodurch schließlich Luft einströmen kann. Die Ausatmung hingegen findet passiv statt: Die Lunge verfügt im schwach ausgebildeten Interstitium, das auch für die Stabilität der Lunge verantwortlich ist, über elastische Fasern. Durch die elastische Rückstellkraft dieser Fasern wird, sobald sich die Einatemmuskeln entspannen, die Lunge zusammengezogen und die Luft strömt aus (Ochs u. Weibel 2008). Darüber hinaus ist die Lunge ein Organ, das zu jeder Zeit der Außenwelt exponiert ist und muss deshalb mit einem ausgeklügelten Abwehrsystem gegen Pathogene wie Mikroorganismen oder toxische Substanzen ausgestattet sein (Bienenstock 1984). Aufgrund ihrer sphärischen Form besitzen Alveolen eine Oberflächenspannung (Clements et al. 1958), die bei jeder Ausatmung zu einem Kollaps der Alveolen und längerfristig zu Atelektasen führen würde (Neergard 1929). Deshalb besitzt die Lunge ein System von AE2-Zellen, deren Hauptfunktion in der Produktion eines oberflächenaktiven Agens (Mason u. Shannon 1997, Griese 1999) aus Phospholipiden und Proteinen, dem Surfactant, besteht, welches in der Lage ist, durch Reduktion der Oberflächenspannung den Kollaps zu verhindern (Reifenrath u. Zimmermann 1973).

In Bezug auf ihre Funktion als Gasaustauscher sind quantitative Informationen auf die strukturellen Zusammenhänge der Lunge von besonderem Interesse. Anatomische beziehungsweise morphometrische Parameter sind das Lungenvolumen, die alveoläre Oberfläche, die Dicke der Diffusionsbarriere und die Verteilung und Morphologie der Zellen, die am Aufbau der Oberfläche und Barriere beteiligt sind. Interessante physiologische Parameter sind die Atemfrequenzen und die Diffusionskapazität für Sauerstoff (im Abschnitt Diskussion, Seite 46-48 erläutert), die von den morphologischen Eigenschaften der Lunge abhängen. Um Beziehungen zwischen Struktur und Funktion besser darzustellen und Vergleiche zwischen Spezies zu erlauben, sollten erhobene Parameter mit einem weiteren, uniform gewählten Vergleichspunkt in Beziehung gestellt werden. Hierbei bietet sich das Körpergewicht an.

1.2 Allometrie

Taylor und Weibel (1981) stellten die Hypothese auf, dass lebende Organismen sinnvoll konstruiert seien, d.h. dass Form und Funktion eines Organs oder Organsystems in Beziehung zueinander stehen und den physiologischen Bedürfnissen der Spezies gemäß ihres Energiebedarfs, Lebensraums und ihrer Lebensumstände angepasst sind. Diese Theorie nannten sie „Symmorphosis“ (vgl. Weibel 2000). Dieser Begriff schließt drei Punkte ein. Der strukturelle Aufbau ist 1.) ein begrenzender Faktor der maximalen physiologischen Parameter 2.) optimiert an die jeweiligen Lebensbedingungen, unter denen der Organismus seine Funktion aufrechterhält und 3.) anpassungsfähig an sich ändernde Lebensbedingungen und – räume (Taylor u. Weibel 1981). Bestätigung dieser drei Punkte findet sich bei einem Blick auf einige pathophysiologische Vorgänge. Zum Beispiel beim Lungenemphysem kommt es durch den Verlust von Alveolen und Kapillaren zu massiven Einschränkungen im Gasaustausch (Coxson et al. 1999). Die alveoläre Fläche ist im Umkehrschluss also im Gesunden an den Organismus optimal angepasst, sodass sie den für den Organismus benötigten Sauerstofftransfer gewährleistet (Weibel 2009). Einen anderen pathophysiologischen Mechanismus zeigt die Lungenfibrose, bei der durch Vermehrung des normalerweise schwach ausgebildeten Interstitiums der Alveolarsepten die Diffusionsbarriere verdickt wird, die Sauerstoffdiffusion also vermindert. So kann über die dickere Diffusionsbarriere pro Zeiteinheit also weniger Sauerstoff ins Blut diffundieren, was in Hypoxämie und daraufhin Atemnot mündet (Gross u. Hunninghake 2001). Also ist auch die Dicke der Diffusionsbarriere, in diesem Falle das Interstitium beim Gesunden an die Anforderungen des Organismus angepasst (Weibel 2009). Doch ist interessant zu erwähnen, dass die von der Diffusionsbarriere abhängigen lungenphysiologischen Parameter, wie die Diffusionskapazität, bei einigen Spezies nicht nur an die Lebensbedingungen angepasst sind, sondern vielmehr Reserven aufweisen, die die schnelle Adaptation an geänderte Bedingungen erlauben (siehe Diskussion S. 47f).

Die Beziehungen von Form und Funktion zeichnen sich in allometrischen Beziehungen ab. Die Allometrie stellt also eine Methode der Analyse dar, die strukturelle oder funktionelle Parameter gegen das Körpergewicht der untersuchten Subjekte aufstellt. Mathematisch wird diese Beziehung als

$$y = aM^b$$

ausgedrückt, wobei sich die Werte für a und b empirisch ergeben haben (Lindstedt u. Schaeffer 2002). Der Exponent b ist bei logarithmischer Skalierung die Steigung der Geraden, die aus dieser Funktion entsteht.

In Bezug auf die Lungen von Säugetieren wurden schon viele allometrische Beziehungen untersucht. So stellte man Lungenvolumina [LV], alveoläre Oberfläche [S(alv)], den unter Belastung maximalen Sauerstoffverbrauch [\dot{V}_{O_2max}], die Sauerstoffdiffusionskapazität der Lunge [D_{LO_2}] und viele weitere Parameter in Beziehung zum Körpergewicht (Stahl 1967, Gehr et al. 1981, Taylor u. Weibel 1981, Weibel 1972, Weibel et al. 1981, Weibel et al. 1987). Ein Beispiel dafür ist die Atemfrequenz, die ausgedrückt mit $M^{1/4}$ bei kleinen Tieren höher ist als bei großen (Stahl 1967). Stone et al. (1992) untersuchten die allometrische Beziehung von Lungenzellen. Sie zeigten, dass die Anzahl an Zellen zum Körpergewicht mit dem Exponenten $b = 1$ steigt, d.h. zum Körpergewicht proportional. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Größenzunahme des Organs bei größeren Spezies lediglich durch mehr Zellen, nicht aber durch vergrößerte Zellen zustande kommt. Damit kann man die These aufstellen, dass Zellgrößen eher durch ihre Funktion als durch die Größe der sie beherbergenden Spezies/des Organs bestimmt wird (Stone et al. 1992). In Bezug auf die in der hier vorliegenden Studie untersuchten AE2-Zellen stellen sich nun zwei Fragen. 1.) Steigt die Anzahl der AE2-Zellen ebenfalls proportional zum Körpergewicht? Besteht also eine allometrische Beziehung in der Weise M^1 ? 2.) Existieren systematische Größenunterschiede zwischen den AE2-Zellen verschiedener Spezies?

1.3 Alveolarepithelzellen Typ II

AE2-Zellen sind kuboide, im Durchmesser etwa 9 μm messende Zellen (Holm et al. 1987), die 16% der Gesamtzahl alveolärer Zellen ausmachen (Crapo et al. 1982) und deren Charakteristikum spezielle Organellen, die Lamellenkörper (Lb) sind (Ochs 2010, Stone et al. 1992), welche das oberflächenaktive Agens Surfactant speichern (Mason et al. 1997, Griese 1999) in dicht gepackten Lamellen (Abb. 3.8), welches, wie zuvor erwähnt, effizient die Oberflächenspannung herabsetzen kann (Reifenrath u. Zimmermann 1973). In der alveolären Umgebung des Menschen befinden sich etwa doppelt so viele AE2-Zellen wie AE1-Zellen und machen ~7% der alveolären Oberfläche aus (Stone et al. 1992, Crapo et al. 1982). AE2-Zellen erfüllen neben ihrer Hauptfunktion, Surfactant zu synthetisieren, zu speichern, zu sezernieren und nach Wiederaufnahme zu recyceln (Dietl 2005, Ryan 1975, Fehrenbach 2001) einige weitere wichtige Aufgaben (Castranova et al. 1988). So zeigte sich, dass AE2-Zellen befähigt sind, Ionen und Wasser aus dem alveolären Raum zu transportieren und damit Ödemen vorzubeugen oder zu minimieren (Mason et al. 1982, Castranova et al. 1988). Als weitere Funktion der AE2-Zelle ist der Abbau von Fremdstoffen anzusehen. Dazu sind Enzyme der P450-Klasse im Stande, die in AE2-Zellen nachgewiesen werden konnten (Jones et al. 1983, Devereux et al. 1979). Sie sind weiterhin relativ resistent gegenüber oxidativem

Stress durch Sauerstoffradikale (Cross 1974, Crapo et al. 1980). Man sah, dass sie im Falle von Schäden an AE1-Zellen durch oxidativen oder mechanischen Stress zu AE1-Zellen proliferieren (Adamson u Bowden 1974, Williams 2003). Diese Eigenschaft ist nötig, da AE1-Zellen nicht in der Lage sind, sich zu teilen und mit der extremen Ausbreitung ihres Zytoplasmas – jede Zelle stellt rund 5000 μm^2 alveoläre Oberfläche - eine große Angriffsfläche für Schäden bietet (Weibel 2009). Da AE2-Zellen durch Teilung sowohl ihre eigene Zelllinie, als auch die der AE1-Zellen aufrechterhalten, sind sie für den Zellumsatz des gesamten Alveolarepithels verantwortlich (Edwards 2001). Zusammenfassend hat die AE2-Zelle also vier Funktionen: 1.) Den Surfactantmetabolismus 2.) Transport von Wasser aus dem alveolären Raum 3.) Verstoffwechslung von Fremdstoffen 4.) Die Regeneration des Lungenepithels (Castranova et al. 1988). All diese Funktionen könnten erklären, warum Stone et al. (1992) keine allometrische Beziehung zwischen der alveolären Fläche pro AE2-Zelle und dem Körpergewicht fanden. Die Werte schwankten zwischen 2.000 und 6.000 μm^2 pro AE2-Zelle. Dabei zeigten sowohl der Mensch als auch das Meerschweinchen Werte um 2.000 μm^2 , was die fehlende Beziehung der alveolären Fläche pro AE2-Zelle zum Körpergewicht deutlich macht. In der Theorie verhält es sich aber so, dass größere Tiere mit vermutlich größeren Alveolen nach dem Gesetz von LaPlace eine kleinere Oberflächenspannung haben und damit weniger Surfactant benötigen würden, dessen Metabolismus eben die Hauptfunktion der AE2-Zelle ist. Also sollte eine geringere Zahl an AE2-Zellen pro Einheit alveolärer Oberfläche in den größeren Tieren anzutreffen sein (Stone et al. 1992). Doch die Surfactantproduktion ist eben nur eine von mehreren Funktion der AE2-Zelle, sodass angenommen werden darf, dass ihre Anzahl pro Einheit alveolärer Fläche nicht alleine von ihrer Funktion als Surfactantproduzenten abhängt. Produzieren und speichern kleinere Tiere in ihren AE2-Zellen also mehr Surfactant als große Tiere?

1.4 Surfactant

C. C. Macklin beschrieb 1954 als Erster, dass die alveoläre Oberfläche mit einem dünnen, „mukösen“ Film überzogen ist. Er vermutete, dass dieser Film aus dem Inhalt der Lb in AE2-Zellen stammt, was später von Askin u. Kuhn (1971) bestätigt wurde. Es konnte beobachtet werden, dass Surfactant aus den Lb mittels regulierter Exozytose in den alveolären Raum sezerniert wird (Ryan et al. 1975). Als stärkster physiologischer Stimulus wurde dafür die Zelldehnung unter der Atmung identifiziert (Edwards 2001). Wenige Jahre nach der Erstbeschreibung des Surfactant wurde anhand von bronchoalveolärer Lavage-Untersuchungen (BAL) verschiedener Säugetierspezies mittels Infrarot-Absorptions-Spektroskopie gezeigt, dass der Hauptbestandteil aus dem Phosphatidylcholin Lecithin, also

Phospholipiden bestand (Pattle u. Thomas 1961). Schließlich stand fest, dass Surfactant aus Nicht-Serum-Proteinen, Phospholipiden und neutralen Lipiden besteht (Reifenrath u. Zimmermann 1973). Kurze Zeit später konnte man beobachten, dass der Hauptbestandteil der Lipide Palmitoyl-Phosphatidylcholin war (Sanders u. Longmore 1975). Heutiger Stand ist, dass die größten Anteile der Lipidzusammensetzung von Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPE), Palmitoylmyristoyl-PC (PMPC) und Palmitoylpalmitoleoyl-PC (PPPC) gebildet werden (Bernhard et al. 2001). Die mit Abstand größte Fraktion bildet dabei das DPPE. Bei 37° C Körpertemperatur ist es in kristallinem Zustand. Durch Interaktionen mit ungesättigten Phospholipiden und Cholesterin wird es jedoch flüssig, womit es seine Funktion erfüllen kann (Daniels u. Orgreig 2003). Hauptfunktion des DPPE ist die des Surfactants im Allgemeinen, und zwar das Herabsetzen der in den Alveolen herrschenden Oberflächenspannung. Dies geschieht, wenn DPPE im Zuge der Atmung und damit der Verkleinerung der Alveolen komprimiert wird und dadurch Wassermoleküle aus dem Alveolus herauspresst (Schürch et al. 1978, Daniels u. Orgreig 2003).

Weiterer Bestandteil des Surfactants sind Apolipoproteine, die Surfactant Proteine (SP) A, B, C und D. Die Surfactant Proteine A und D (SP-A, SP-D) sind hydrophil und werden auf einem von der Lb-Exozytose autonomen Weg sezerniert. Als Hauptfunktion wird beiden die Abwehr von Erregern und Allergenen zugesprochen, wobei SP-A für die Funktion des Surfactants und SP-D für dessen Homöostase wichtig zu sein scheinen (Haagsman 1998, Reid 1998, Ochs 2010, Malhotra et al. 1993, Wang et al. 1996). Die Surfactant Proteine B & C (SP-B, SP-C) sind hydrophob. Sie befinden sich in den Surfactant-speichernden Lb und werden mit deren Inhalt zeitgleich sezerniert (Dietl u. Haller 2005, Dietl et al. 2010). Ihre Funktion besteht in der Ausbildung und Stabilisierung eines oberflächenaktiven Surfactantfilms durch Interaktion mit den Lipiden (Cochrane u. Revak 1991 Qanbar et al. 1996). Alle Proteine zusammen machen in dem aus BAL-Flüssigkeit gewonnenen Surfactant 10% des Gesamtgewichts aus (Goerke 1998). Diese Ausführungen machen klar, dass es ein intrazellulär, in Lb gespeichertes Surfactantvorkommen und das sezernierte, intraalveoläre Surfactant gibt, die voneinander unterschieden werden müssen (Fehrenbach 2001, Ochs 2010).

Bisher gibt es nur wenige Daten zur Menge des Surfactants in der Lunge. Es wurde gezeigt, dass die benötigte Surfactantmenge eine Funktion des Quotienten aus Atemzugvolumen zu funktionaler Residualkapazität, des Radius der Alveolenkrümmung und der Compliance der Brustwand ist, sodass aus sinkendem Verhältnis aus Atemzugvolumen und funktioneller Residualkapazität ein niedrigerer Bedarf an Surfactant resultiert (Stone et al. 1992). Dies wirft

die Frage auf, ob die Menge an Surfactant auch von anderen Parametern, wie der Atemfrequenz, der alveolären Oberfläche oder dem Körpergewicht abhängt.

1.5 Studienziel

Anhand der vorangegangenen Ausführungen geht hervor, dass nur wenig bekannt ist über allometrische Beziehungen des Surfactants der Lunge. Wenn die Anzahl der Lungenzellen mit dem Körpergewicht proportional steigt (Stone et al. 1992), trifft das dann auch auf die Fraktion der AE2-Zellen zu? Wenn die Hauptfunktion dieser Zellen die Surfactantproduktion ist, welches die Oberflächenspannung innerhalb der Alveolen senkt, brauchen kleinere Spezies, die vermutlich kleinere Alveolen besitzen, mehr Surfactant-produzierende Zellen oder schafft es die gleiche Anzahl an Zellen, mehr Surfactant zu produzieren? Haben sie deshalb größere Volumina? Wenn der Quotient von Atemzugvolumen zu funktioneller Residualkapazität die benötigte Menge an intraalveolären Surfactant beeinflusst (Stone et al. 1992) und die Einatmung der stärkste Stimulus für die Surfactantsekretion ist, bestehen dann auch Zusammenhänge zwischen der Atemfrequenz und der Surfactantmenge? Sprich, erhöht eine hohe Atemfrequenz eines kleinen Säugers den intraalveolären Surfactantumsatz durch die erhöhte Häufigkeit der Dehnung des Films und macht damit einen größeren intrazellulären Vorrat nötig? Ist die Surfactantproduktion an die alveoläre Oberfläche gemäß der „Symmorphosis“ angepasst? Finden sich allometrische Beziehungen, die einen Vergleich zwischen verschiedenen Säugetierspezies ermöglichen? Diese Studie untersucht 12 Spezies unterschiedlicher Gewichtsklassen unter Landsäugetieren allometrisch hinsichtlich ihres pulmonalen intrazellulären Surfactantsystems. Die Ergebnisse sollen Aussagen ermöglichen über

- 1.) Die Zusammenhänge von Größe und Anzahl der Alveolarepithelzellen des Typs II in Bezug auf das Körpergewicht, die alveoläre Oberfläche und die Atemfrequenz der jeweiligen Spezies.
- 2.) Die Zusammenhänge des intrazellulären Surfactantvorkommens mit dem Körpergewicht, der alveolären Oberfläche und der Atemfrequenz der jeweiligen Spezies.

2. Material und Methoden

2.1 Menschliche Lungen und Tierlungen

Diese Studie wurde an Archivmaterial des Instituts für Anatomie der Universität Bern durchgeführt, das freundlicherweise von Prof. em. Ewald R. Weibel zur Verfügung gestellt wurde.

Diese Studie untersuchte 12 verschiedene Spezies, die in ihrem Körpergewicht Unterschiede von bis zu fünf Potenzen aufwiesen. Namentlich sind es Etruskerspitzmaus, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund, Ziege, Mensch, Kamel, Giraffe, Rind und Pferd. Da alle untersuchten Lungen schon einmal Teil einer Untersuchung waren, wurde die Nutzung der Tiere und ihrer Organe schon vorher einer bioethischen Beurteilung unterzogen und von einer entsprechenden Kommission genehmigt. Die Herkunft und die genauen Fixiermethoden sind den Veröffentlichungen dieser Untersuchungen zu entnehmen (Tabelle 1). Im Falle der menschlichen Lungen wurde die Nutzung in der Studie von Gehr et al. (1978) durch den Ethikrat der Universitätsklinik Bern genehmigt.

Es wurden ausschließlich adulte Tiere verwendet, sodass die untersuchten Lungen als gereift anzusehen sind (Weibel 1967). Im Allgemeinen wurden die Tiere vor der Fixierung der Lunge über intravenöse Zufuhr eines geeigneten Narkotikums in Rückenlage (Constantinopol et al. 1989, Hsia et al. 1994, Forrest u. Weibel 1975, Weibel et al. 1987) in tiefe Narkose versetzt oder schmerzlos getötet (Gehr et al. 1981). Größere Tiere wurden zusätzlich mittels Curare relaxiert (Weibel 1970). Die Lungen der Spezies Etruskerspitzmaus, Maus, Ratte, Meerschweinchen, Hund, Kamel, Giraffe, Rind und Pferd wurden anschließend alle mittels der gleichen Technik fixiert. Zunächst wurde die Trachea operativ freigelegt und kanüliert. Anschließend wurde in Folge einer medianen Laparotomie die Brustbeinspitze angehoben und das Zwerchfell zweimal punktiert, um ein Kollabieren der Lunge hervorzurufen. Das hatte zur Folge, dass der Großteil der Luft selbstständig entweichen konnte. Schließlich wurde ein Behälter mit Fixiermittel an die Trachealkanüle angeschlossen, sodass Fixiermittel in die Lunge fließen konnte. Das hier verwendete Fixiermittel war mit Kaliumphosphat auf pH7,4 gepufferter 2,5%iger Glutaraldehyd. Abhängig von der Größe des Tieres wurden Drücke von 20-30 cm H₂O oberhalb der Brust angewandt. Sobald die Lunge mit Fixiermittel gefüllt war, wurde die Trachea abgebunden und die Lunge operativ *in toto* entnommen und in gepufferte Glutaraldehydlösung eingelegt (Weibel 1970). Die Lungen der Ziegen wurden aufgrund eines unterschiedlichen Versuchsaufbaus der vorangegangenen Untersuchung in leicht abweichender Technik, nämlich mitsamt dem Mediastinum, entnommen (Weibel et al. 1987). Die menschlichen Lungen entstammen einem Zeitraum von 1971 und 1976. Bis auf einen

Herzstillstand, der im Rahmen eines kongenitalen Herzfehlers auftrat, starben alle Patienten an Hirnschäden in Folge von Schusswunden, Vekehrstraumata oder Hirnblutungen (Gehr et al. 1978). Gemäß den derzeitigen Bestimmungen wurden die Patienten durch Nummerierung unkenntlich gemacht. Die Lungen wurden wie folgt entnommen. 30 Minuten nach Todesfeststellung brachte man beide Lungen durch medioaxilläre Inzisionen (je 1 inch \approx 2,5 cm) im vierten Interkostalraum zum kollabieren. Anschließend wurden die Lungen über die vorbestehende, intensivmedizinisch angelegte, blockbare Tracheotomie mit oben genannter Fixierlösung instilliert und die Trachea geblockt. Einige Stunden danach wurden die Lungen im Rahmen der Autopsie entnommen, wobei auch jeweils die rechte von der linken Lunge getrennt wurde (Gehr et al. 1978). Von den acht Lungen, die die Arbeit von Gehr et al. (1978) umfassen, wurden zufällig fünf ausgewählt. Das Referenzvolumen aller Lungen wurde mit der Wasserverdrängungsvolumetrie ermittelt (Scherle 1970). Das hier ermittelte Volumen wurde mit 0.85 multipliziert, in etwa jenem Anteil (80-90%), den der parenchymatöse Anteil der Lunge vom Gesamtvolumen ausmacht (Pinkerton et al. 1992). Denn schließlich betraf hier stattfindende Untersuchung die AE2-Zellen, welche sich im Parenchym finden.

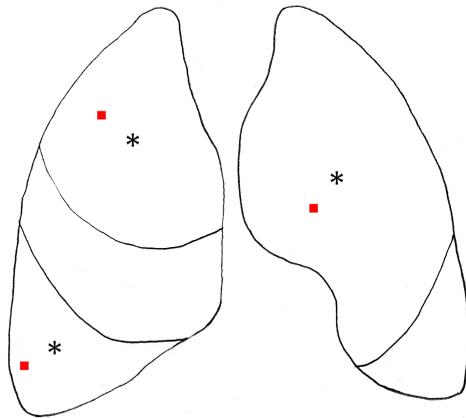
Für die elektronenmikroskopische Verwendung wurden die nach einem bestimmten System gewonnenen Präparate nach Standardschema aufbereitet. Auf besagtes System wird weiter unten in der Rubrik *Stereologie* eingegangen. Zunächst wurden die als Gewebelöcke entnommenen Präparate mehrfach und für mindestens zwei Stunden gewaschen. Die hierfür verwendeten Lösungen waren mittels Gefrierpunktsometrie auf 330 mOsm (Blutisotonie) eingestellt worden. Danach begann die Postfixierung in 1%igem Osmiumtetroxid, auf das die Kontrastanreicherung mit 2%igem Uranylacetat folgte, das zur verbesserten Wirkung mit Veronal-Acetat auf pH4,5 gepuffert wurde (Farquhar u. Palade 1965). Anschließend fand die Dehydrierung in aufsteigenden alkoholischen Lösungen statt, wobei die Startlösung eine Ethanol-Konzentration von 70% aufwies. Bevor die Einbettung in Epon 812 begann, wurden die Blöcke in Propylenoxid eingelegt, um eine geeignete Infiltrationsfähigkeit für Epon zu schaffen (Weibel 1970).

2.2 *Stereologie*

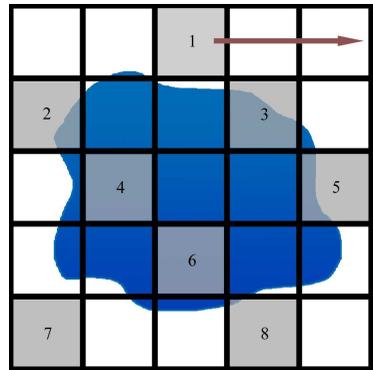
Die Stereologie bietet eine Anzahl effizienter Methoden, genaue morphometrische Aussagen über dreidimensionale, unregelmäßige Strukturen, wie zum Beispiel Alveolen oder Zellen, durch zweidimensionale Schnitte zu erhalten (rev. Weibel et al. 2007, Weibel 2009, rev. in Nyengaard u. Gundersen 2006). Im Folgenden wird auf die stereologischen Verfahren eingegangen, die in dieser Arbeit Anwendung fanden. Wichtiger Bestandteil der Stereologie ist die Randomisierung. Dieser Regel wurde zunächst Rechnung getragen, indem die Proben

der Lungen nach dem Schema des „stratified sampling“ gewonnen wurden (rev. in Nyengaard u. Gundersen 2006). Dieses Schema bedeutet, dass von jeder Tierlunge zunächst per Zufall jeweils drei Lungenlappen ausgewählt wurden. Ausschließlich aus den parenchymatösen Anteilen der Lungenlappen wurde dann zufällig jeweils eines der zuvor erwähnten Gewebelöcher von etwa 2-3 mm³ entnommen (Weibel 1970). Nach der Einbettung wurden die Blöcke mit einem Ultramikrotom geschnitten. Diese Prozedur wurde auf gleiche oder ähnliche Weise bei allen untersuchten Spezies angewandt und garantierte, dass jeder Teil des Lungenparenchyms die gleiche Chance hatte, analysiert zu werden. Die Methode der Probeauswahl und die relativ geringe Anzahl von drei Gewebelöchern pro Tier können als ausreichend angesehen werden. Denn der Fehler, der durch die Prozedur der Entnahme und der geringen Anzahl Proben entsteht, ist aufgrund der großen Unterschiede, die biologisch zwischen den hier analysierten Tieren dieser Bandbreite an Gewichtsklassen bestehen, zu vernachlässigen (Gundersen u. Jensen 1987).

Im Folgenden wurden aufeinander folgende Semidünnschnitte mit jeweils 1 µm Schnittdicke von den Blöcken angefertigt. Diese wurden benutzt, um das „physical disector“-Verfahren (Sterio 1984 und Seite 44 dieser Arbeit) anzuwenden. Die jeweils ersten und vierten Schnitte wurden zusammen auf einen Objektträger übertragen und mit Toluidinblau gefärbt. Da die Schnittdicke mit 1 µm bekannt war, war der Abstand zwischen den beiden Schnitten folglich 3 µm (Ochs 2006). Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie, mit Schnittstärken von 50-70 nm wurden angefertigt, die auf mit Formvarharz beschichtete, unbenetzte Kupferträger übertragen und mit Uranylacetat und Bleiacetat kontrastiert wurden. Für die Lichtmikroskopie wurde ein Olympus BX51 Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einer Olympus DP72 Digitalkamera und ein Computer mit newCAST-Software (Visiopharm, Horsholm, Dänemark) verwendet. Für die Transmissionselektronenmikroskopie kam ein EM 906 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer „slow-scan 2K charge-coupled device“-Kamera (TRS, Moorenweis, Deutschland) zum Einsatz. Testfelder für die stereologische Analyse wurden über „systematic uniform random sampling“ (SURS) ermittelt (Gundersen u. Jensen 1987, rev. in Nyengaard u. Gundersen 2006). Dieses Schema funktioniert nach folgendem Prinzip. Außerhalb des Präparates wird ein zufälliger Startpunkt gesetzt, von dem aus mit gleich bleibender Schrittweite Sichtfelder ausgewählt werden (Abb. 2.1) (Nyengaard u. Gundersen 2006, Mühlfeld et al. 2010).



(1)



(2)

Abb. 2.1: Schema „Stratified Sampling“. (1) Die * markieren die zufällig ausgewählten Lungenlappen. Rote Kästen stehen für Gewebeblöcke, die an zufälligen parenchymatösen Stellen entnommen werden. (2) Außerhalb des Präparates wird der Startpunkt gewählt. Dann in Schritten der Länge m , hier $m = 3$, jeweils ein Sichtfeld ausgewählt.

2.3 Lichtmikroskopie

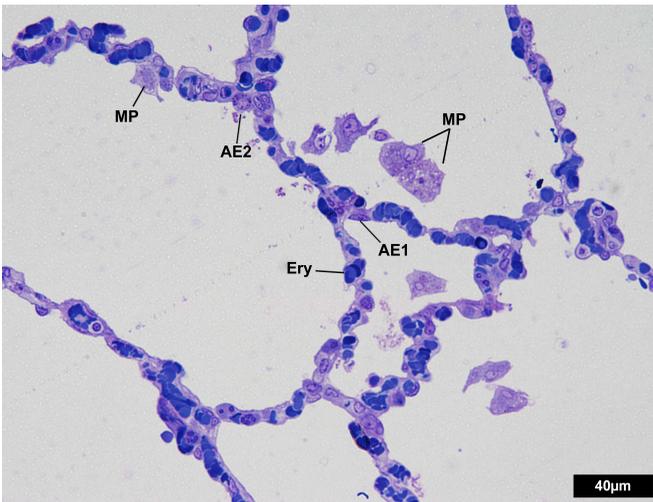


Abb. 2.2: Menschliche Alveolen mit Alveolarepithelzellen Typ 1 (AE1), Typ 2 (AE2), Makrophagen (MP) und in Kapillaren befindlichen Erythrozyten (Ery).

Lichtmikroskopisch wurde die Oberfläche des alveolären Epithels bei einer Vergrößerung von 40x durch folgende Methode eruiert. Ein Testsystem von 14 Linien (Länge $l_T = 22,18 \mu\text{m}$) wurde auf jedes Sichtfeld projiziert (Elias u. Hyde 1980). Diese Linien waren symmetrisch in Reihen angeordnet. Die Enden der Linien waren Punkte, also war dieses Testsystem ein kombiniertes Testlinien/Testpunkte-System (Weibel 1970). Somit besaß jedes Testsystem neben den 14 Linien 28 Testpunkte, die auf dem Testsystem geordnet verteilt lagen (Abb. 2.3). Dann wurden die Schnittpunkte der Linien mit alveolärem Epithel (I) und die Anzahl der Punkte (P), die auf Gasaustauschgebiete fielen, ausgezählt (Abb. 2.4). Mit den sich ergebenden Werten der Zählung konnte die Oberflächendichte des alveolären Epithels im Parenchym der Lunge $[S_V(\text{alv}/\text{par})]$ mittels der Gleichung $S_V(\text{alv}/\text{par}) = 2I/l_T$ berechnet werden, wobei L_T sich aus l_T multipliziert mit $P/2$ ergibt. (Hsia et al. 2010, Weibel 1970, Weibel 1979).

$$S_V(\text{alv}/\text{par}) = 2I/(l_T \cdot [P/2]) \quad (\text{Formel 1})$$

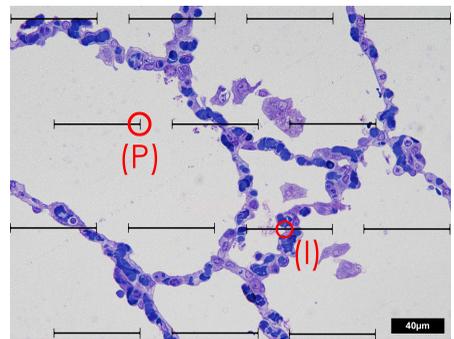
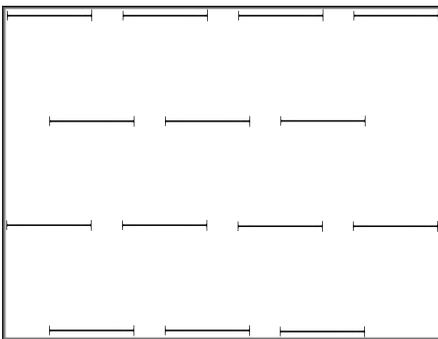


Abb. 2.3: Testlinienpunktsystem mit 14 Einheiten. **Abb. 2.4:** Anwendung auf LM Bild der alveolären Oberfläche bei 40facher Vergrößerung

Die Anzahl und das anzahlgewichtete mittlere Volumen der AE2-Zellen wurden ebenfalls bei 40facher Vergrößerung, nun aber mit Hilfe des zuvor erwähnitem „physical disectors“ und des „rotators“ ermittelt (Howard u. Reed 2005, Sterio 1984, Vedel-Jensen u. Gundersen 1993). Das Prinzip des „physical disectors“ ist, dass zwei korrespondierende Schnitte, daher „disectoren“, die ein Objekt von Interesse beinhalten, verglichen werden. Die Schnitte haben zueinander einen bekannten Abstand, die „disector“-Höhe, die jedoch kleiner ist als die anzunehmende Größe des interessierten Objekts (30-40% (Howard u. Reed 2005)). Nun werden die korrespondierenden Stellen der Schnitte, die das Objekt zeigen, zueinander eingestellt und gedreht (Abb. 2.5).

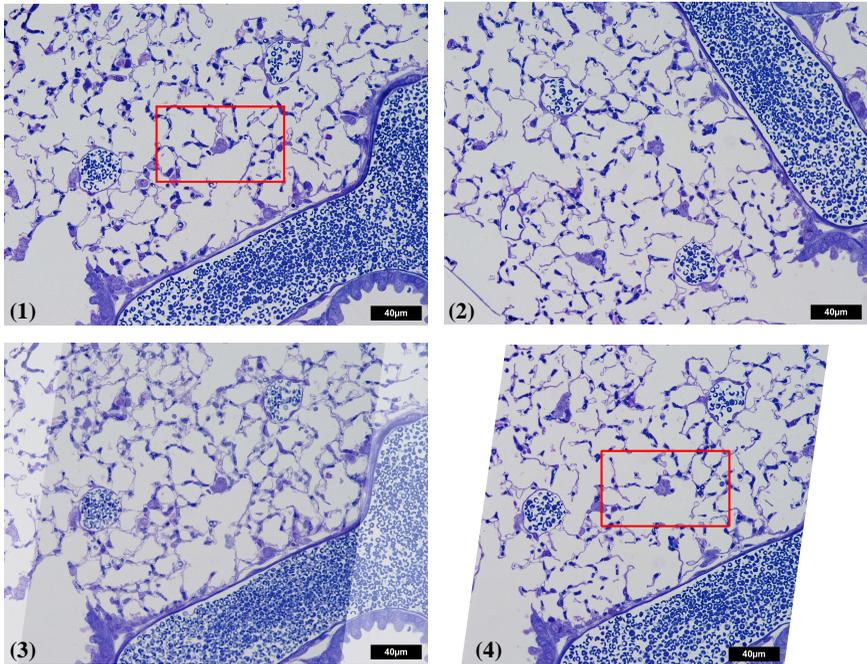


Abb. 2.5: Äquivalente Sichtfelder auf zwei Schnitten. (1) Sichtfeld auf dem Präparat A, mit einer AE2-Zelle im roten Kasten. (2) Nativbild des Äquivalenzsichtfeldes auf Präparat B. (3) Übereinanderlegen und Drehen der beiden Sichtfelder. (4) Präparat B entsprechend Präparat A angeordnet. Auch hier befindet sich die AE2-Zelle im roten Kasten.

Anschließend werden die beiden Sichtfelder miteinander verglichen. Dies geschieht, indem über beide Sichtfelder eine rechteckige Testfläche gelegt wird, die aus einer „line of inclusion“ (meist grün) und einer „line of exclusion“ (meist rot) besteht (Abb. 2.6).

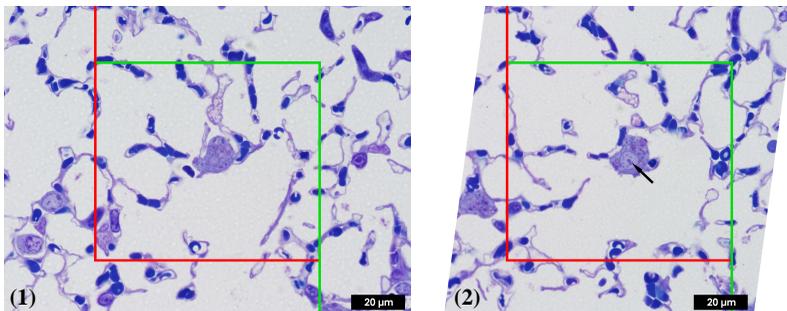


Abb. 2.6: AE2-Zellen der roten Kästen aus Abb. 2.5 bei 100facher Vergrößerung. (1) Counting Frame auf Präparat A. (2) Counting Frame auf Präparat B. Auf (2) ist ein Nucleolus zu sehen (Pfeil), der auf (1) nicht zu sehen ist.

Zellen, die von der „line of inclusion“ geschnitten werden, werden für die Zählung in Betracht gezogen. Mit der „line of exclusion“ verhält es sich umgekehrt. Ein Zählereignis ist gegeben, wenn auf einem der zwei zu vergleichenden Sichtfelder ein definiertes Merkmal zu sehen ist und auf dem anderen nicht (Sterio DC 1984, Ochs 2006). In dieser Studie wurden AE2-Zellen gezählt, wenn auf einem der Schnitte ein Nucleolus zu sehen war, auf dem anderen aber nicht (rev. Mühlfeld et al. 2010) (Abb. 2.6).

An dieser Stelle bleibt zu erwähnen, dass hier auftretende Fehler nicht in der z-Achse, jedoch aber in der x- und y-Achse dadurch auftreten, dass das Lungengewebe nicht starr ist und sich während der Übertragung auf den Objektträger verformen kann (Nyengaard u. Gundersen 2006). Mit Hilfe der newCAST-Software konnte dieser Fehler minimiert werden. Nachdem die Schnitte erst einmal grob abfotografiert waren, erlaubte es die Software, die korrespondierenden Stellen digital übereinander zu legen und eventuell stattgehabte Verzerrungen des Gewebes, ebenfalls digital, auszugleichen. Somit konnte der x/y-Achsenfehler minimiert werden. Die numerische Dichte der AE2-Zellen im Parenchym [$N_V(\text{AE2}/\text{par})$] wurde nun anhand der Formel

$$N_V(\text{AE2}/\text{par}) = Q/v(\text{dis}) \quad (\text{Formel 2})$$

berechnet, wobei Q die Gesamtzahl aller gezählten AE2-Zellen und $v(\text{dis})$ das totale Volumen des „disectors“ ist, welches sich aus der Fläche des Zählrahmens multipliziert mit der „disector“-Höhe zwischen den korrespondierenden Schnitten, in diesem Falle $3 \mu\text{m}$, und der Anzahl der „disectoren“ ergibt. Wurde eine Zelle aufgrund der Definition als Zählereignis ausgewählt, wurde anschließend ihr Volumen mit dem „Rotator“ bestimmt. Der „Rotator“ ist ein stereologisches Verfahren, welches auf der Bestimmung des Durchmessers durch den Nucleolus und der Festlegung der Zellgrenzen in einer Ebene basiert (Abb. 2.8). Das arithmetische Mittel der „Rotator“-Ergebnisse ergab das anzahlgewichtete mittlere Volumen der AE2-Zellen [$\bar{V}_N(\text{AE2})$]. Dem anzahlgewichteten Volumen liegt folgendes Prinzip zugrunde. Die Zellen werden entsprechend ihrer Volumina in Kategorien eingeteilt. So zum Beispiel könnte man definieren: Kategorie A beinhaltet Zellen der Größe 0 bis $< 300 \mu\text{m}^3$, Kategorie B Zellen von 300 bis $< 500 \mu\text{m}^3$, usw. Nun wird gezählt, wie viele Zellen jeweils in einer Kategorie sind. Die Kategorie mit den meisten Zellen fällt dann bei der Ermittlung des mittleren Volumens am stärksten ins *Gewicht*. Im Gegensatz dazu steht beim volumengewichteten mittleren Volumen im Vordergrund, wie groß das Gesamtvolumen aller in der jeweiligen Kategorie befindlichen Zellen ist. So können die Rohdaten auf zwei verschiedene Weisen bewertet werden (Abb. 2.7) (Howard u. Reed 2005). Zum besseren Verständnis folgendes Beispiel:

Zellvolumen	100 μm^3	200 μm^3	300 μm^3	400 μm^3	500 μm^3
Anzahl der Zellen	8	6	5	4	4
Gesamtvolumen der Zellen einer Größe	800	1200	1500	1600	2000

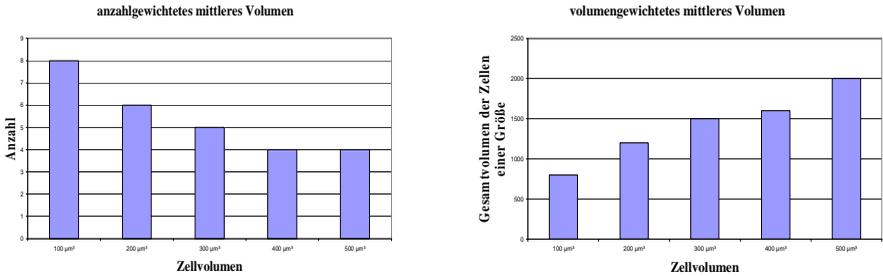


Abb. 2.7: Unterschied zwischen anzahlgewichtetem und volumengewichtetem mittleren Volumen. Man sieht, dass bei den zwei möglichen Wichtungen anhand derselben Rohdaten verschiedene Diagramme entstehen.

Die Oberflächendichte des Alveolarepithels [$S_V(\text{alv}/\text{par})$] und die numerische Dichte der Typ II-Zellen [$U_N(\text{AE}2)$] wurden mit dem Parenchymvolumen [$V(\text{par})$] multipliziert, um die alveoläre Gesamtoberfläche und Gesamtanzahl von Typ II Zellen zu erhalten (Tabelle 3).

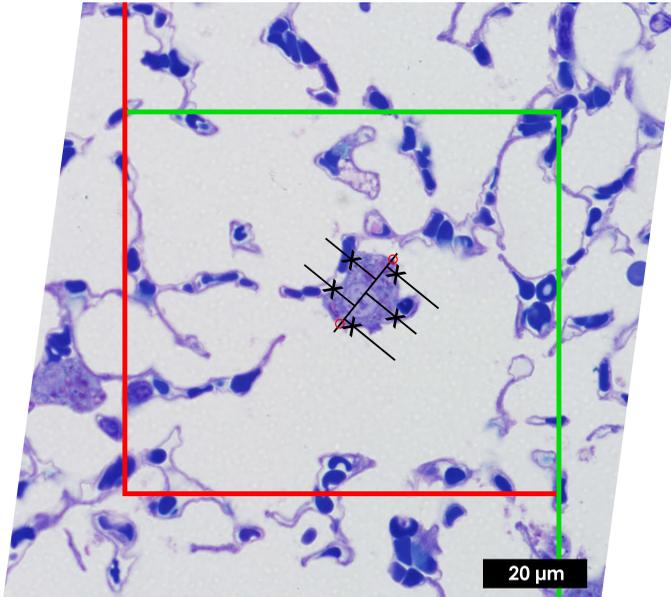


Abb. 2.8: Der „Rotator“. Eine Linie wird durch den Nucleolus gezogen, die so ausgerichtet ist, dass sie die breiteste Stelle der AE2-Zelle durchzieht (rote Kreise). Von dieser Linie gehen orthogonale Strahlen, in diesem Falle 5, ab. Die Schnittpunkte der Strahlen mit der Zellmembran werden markiert (x). Aus diesen Punkten wird das Volumen der Zelle ermittelt.

2.4 Elektronenmikroskopie

Zunächst wurden die Präparate bei einer Vergrößerung von 4.646fach mäanderförmig abgefahren, um beim Fund einer AE2-Zelle auf 7750fache Vergrößerung umzuschalten und diese zu fotografieren. Anschließend wurde mit Photoshop ein digitalisiertes Linientestsystem über die EM-Bilder gelegt. Das hier verwendete Testsystem hatte 36 Linien und folglich 72 Punkte und wurde im Folgenden benutzt, um die Volumendichten der subzellulären AE2-Zellkompartimente Lamellenkörper (Lb), Zellkern (Ncl), Mitochondrien (Mit) und „Rest“ (Res) mittels Punktzählmethode (Weibel 1979) zu erheben. Hierbei wurden also die auf das Testfeld projizierten Punkte, die auf besagte Kompartimente fielen, gezählt [P(comp)] (Abb. 2.9).

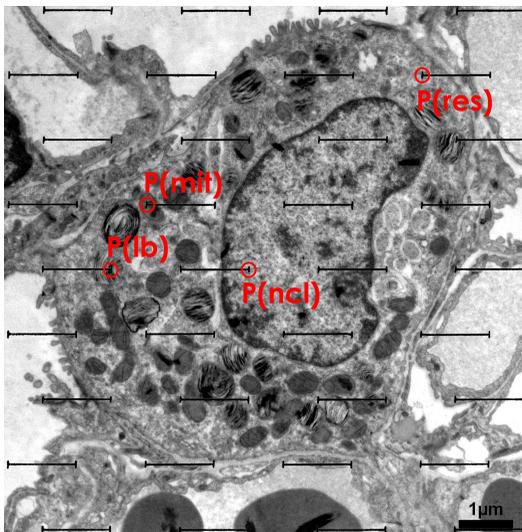


Abb. 2.9: Es werden alle Punkte gezählt, die auf entsprechende Kompartimente fallen, wie Lb [P(lb)], Mitochondrien [P(mit)], Nucleus [P(ncl)] und Zytoplasma [P(res)]. Rote Kreise markieren exemplarische Punkte.

Die Volumendichte oder Volumenfraktion eines Kompartiments [$V_V(\text{comp}/\text{ref})$], also der Anteil des Kompartiments bezogen auf das Referenzvolumen (ref), wurde mit Hilfe der Formel

$$V_V(\text{comp}/\text{ref}) = P(\text{comp})/P(\text{ref}) \quad (\text{Formel 3})$$

errechnet, wobei $P(\text{ref})$ die Summe aller Punkte ist, die eine AE2-Zelle trafen (Tabelle 4 & 5). Die Oberflächendichte der Lb wurde ebenfalls bei einer Vergrößerung von 7.750fach ermittelt. Dies geschah mit derselben, oben beschriebenen Methode, die zur Erfassung der alveolaren Epithelfläche auf lichtmikroskopischer Ebene genutzt wurde (Hsia et al. 2010, Weibel 1970, Weibel 1979). Hierbei wurde also ebenfalls das 36-Linien-Testsystem

angewandt und Schnittpunkte der Linien mit der begrenzenden Membran der Lb und Punkte, die auf Lb fielen, gezählt. Anschließend wurden die Werte mit der Formel

$$S_V(Lb/AE2) = 2/l_f \cdot (P/2) \quad (\text{Formel 4})$$

erhoben. Ein zuverlässiger Parameter für die Größe eines Objektes, in unserem Falle des Lb, ist das Volumenoberflächenverhältnis (Weibel 1970, Ochs et al. 2004a). Dieses wird durch die Division von Volumendichte (Syn. Volumenfraktion) durch Oberflächendichte der Lb ermittelt.

$$V_S\text{-ratio}(Lb) = V_V(Lb/AE2)/S_V(Lb/AE2) \quad (\text{Formel 5})$$

Da sich der Nenner (v) herauskürzt, ist das Volumenoberflächenverhältnis unabhängig von der Größe des Referenzvolumens und proportional zum Durchmesser der Strukturen, vorausgesetzt diese weisen keine nennenswerten Formänderungen auf (Schmiel et al. 1991, Weibel 1979). Das volumengewichtete mittlere Volumen der Lb wurde mittels der „point-sampled intercepts“ Methode (Gundersen u. Jensen 1985) gemäß der Formel

$$V_V(Lb) = (\pi/3)l_0^3 \quad (\text{Formel 6})$$

erhoben. Der Wert l_0^3 ergibt sich aus der Analyse der AE2-Zellbilder mit dem 36-Linien-Testsystem in Kombination mit einem so genannten „Ruler“, nicht zu verstehen als metrisches Lineal. Dieser „Ruler“ ist ein nichtlinear aufgebautes Maß, das in 15 verschiedene Klassen unterteilt ist (Abb. 2.10[1]). Wenn nun der Punkt einer Linie des Testsystems auf einen Lb fiel (Abb. 2.10[2]), so legte man entlang dieser Linie den „Ruler“ an (Klassenereignis [Class]). Der Startpunkt der „Ruler“-Linie sollte auf der begrenzenden Membran des Lb zu liegen kommen. Die gegenüberliegende Membran des Lb markierte den Klassenwert, der notiert werden sollte (Abb. 2.10[Vergrößerung]). Jeder Klasse kam eine entsprechende Längenzuordnung (Class middle length [CML]) zu (Tabelle 5). l_0^3 entspricht nun der Summe aller Klassenereignisse, die jeweils mit ihrer Längenzuordnung multipliziert wurden und anschließend durch die Summe der Klassenereignisse dividiert wurden:

$$l_0^3 = \sum(\text{Class} \cdot \text{CML}) / \sum \text{Class} \quad (\text{Formel 7})$$

Dieses Ergebnis entspricht dem volumengewichteten mittleren Volumen eines Lb.

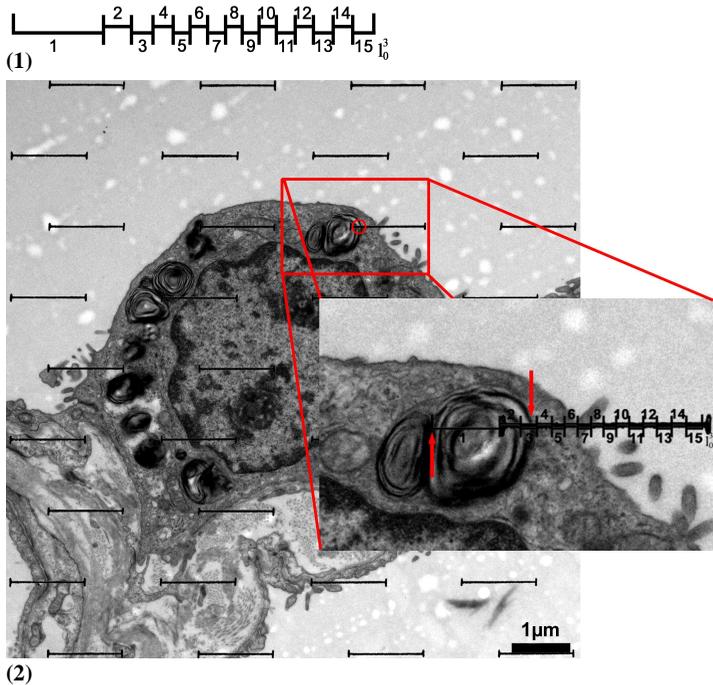


Abb. 2.10: (1) In 15 Klassen aufgeteilter „Ruler“ zur Bestimmung des volumengewichteten mittleren Volumens der Lb. (2) Schnitt einer Testlinie mit einem Lb (roter Kreis). (**Vergrößerung**) Anlegen des „Rulers“ entlang der Testlinie. Rote Pfeile markieren die Begrenzungsmembran des Lb, die gleichzeitig die Messpunkte des „Rulers“ sind. In diesem Beispiel findet sich ein Class 3 Lb.

Tabelle 1: „Ruler“-Klassen

Klasse	Mittlere Länge der Klasse
1	0.22
2	0.71
3	1.29
4	1.98
5	2.77
6	3.68
7	4.81
8	6.16
9	7.68
10	9.5
11	11.66
12	14.13
13	17.13
14	20.63
15	24.72

„Ruler“-Klassen und ihre Längenzuordnung.

2.5 Statistik

Die Statistik wurde mithilfe SPSS 18.0 (IBM) erhoben. Die Gruppen wurde mittels Kruskal-Wallis-ANOVA und anschließendem Mann-Whitney U -Test auf signifikante Unterschiede untersucht. In manchen Fällen war eine paarweise statistische Testung nicht möglich, da die Probenanzahl, z.B. von der Spezies Giraffe, zu gering waren. Die offensichtlich bestehenden Unterschiede zwischen den Spezies sind als biologisch relevant anzusehen, auch wenn die Voraussetzung zur Anwendung des U -Tests manchmal nicht gegeben war. Die allometrischen Beziehungen wurden als $y = aM^b$ unter Verwendung der Modulkurve, welche mit der SPSS-Software kompatibel ist, ausgedrückt. Hierbei ist M das Körpergewicht, a und b sind freie Parameter. Das Grundprinzip allometrischer Beziehungen ist der Vergleich der Beziehung des Körpergewichtes zu den anderen biologischen Größen.

Um den Regressionskoeffizienten R^2 zu erheben, wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Die nichtlinearen Korrelationen zwischen den stereologischen Messwerten und Körpergewicht/Atemfrequenz wurden mit Spearman's rho-Test erhoben, welcher einen Korrelationskoeffizienten (r) und ein Signifikanzmaß (P) lieferte. Die Atemfrequenzen verschiedener Spezies, die zur Berechnung von Regressionen und Korrelationsanalysen verwendet wurden, entnahmen wir der Literatur (Gehr et al. 1980, Jürgens et al. 1996, Burri et al. 1976, Drorbraugh 1960, Vock u. Weibel 1993, Forrest u. Weibel 1975, Kolb 1980, Weibel 1972, Hsia et al. 1994, Weibel et al. 1987, Krause et al. 2009, Gehr et al. 1978, Gehr et al. 1981, Schroter et al. 1978, Vogelnest u. Ralph 1997, Hales u. Findlay 1968, Butler 1993). Signifikanzniveau war $P < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Lichtmikroskopische Ergebnisse.

Bei der Bearbeitung der Präparate bei 40facher Vergrößerung waren ohne weitere Hilfsmittel schon einige Unterschiede zu erkennen. Hierzu zählen die Größenunterschiede der Alveolen, wesentlich größere AE2-Zellen bei der Etrusker-Spitzmaus im Vergleich zu den anderen Spezies und Riesen-Lb beim Meerschweinchen, die als zum Zytoplasma kontrastreiche Vesikel deutlich zu erkennen waren (Abb. Riesen-Lb).

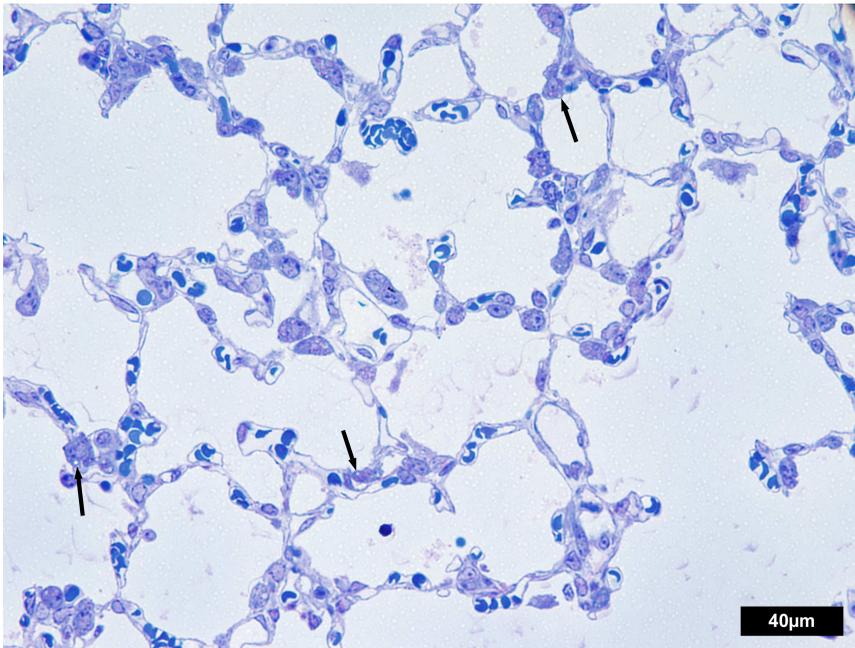


Abb. 3.1: Die Pfeile markieren Riesen-Lb, die als Vakuolen im Zytoplasma imponieren.

Mit der Lichtmikroskopie wurden die Werte für alveoläre Oberfläche, Anzahl der AE2-Zellen und Volumen der AE2-Zellen erhoben. Auf Basis dieser konnten weitere Werte, wie die numerische Dichte der AE2-Zellen und verschiedene Korrelationen zum Körpergewicht und/oder zur Atemfrequenz, erhoben werden. Im Folgenden wird auf jeden der Punkte eingegangen.

Die für die Berechnungen benötigten Werte für Körpergewicht und Lungenvolumen wurden in der vorangegangenen Untersuchung, aus der die Präparate stammen, erhoben (Tabelle 2).

Die Werte für die alveoläre Oberfläche reichten von $\sim 0,01 \text{ m}^2$ bei der Etrusker-Spitzmaus bis hin zu $\sim 1.600 \text{ m}^2$ beim Pferd und waren ähnlich den Werten der Studien, die in Tabelle 2 aufgeführt sind. Die hier auffallende Potenz ($1.6 \cdot 10^5$) führte zu der Annahme, dass eine Beziehung zum Körpergewicht vorhanden sein könnte (respektive $1.7 \cdot 10^5$). Gegeneinander aufgetragen korrelierte die alveoläre Oberfläche signifikant mit dem Körpergewicht und umgekehrt mit der Atemfrequenz (Abb. 3.3).

Die Gesamtanzahl der AE2-Zellen variierte zwischen $6.7 \cdot 10^5$ bei der Spitzmaus und $1.7 \cdot 10^{11}$ beim Pferd. Die Korrelation mit dem Körpergewicht war signifikant und hatte eine ähnliche Steigung ($M^{1,03}$ – nicht signifikant anders als 1) wie die Korrelation zwischen alveolärer Oberfläche und Körpergewicht ($M^{0,99}$ – nicht signifikant anders als 1). Die AE2-Zellzahl korrelierte wiederum umgekehrt mit der Atemfrequenz (Abb. 3.4).

Dazu im Gegensatz korrelierte das mittlere Volumen der AE2-Zellen weder mit Körpergewicht noch mit Atemfrequenz und zeigte eine Spannweite von $500 - 600 \mu\text{m}^3$ bei den meisten Spezies (Abb. 3.5). Drei Spezies zeigten höhere AE2-Zellvolumina von $900 - 1.300 \mu\text{m}^3$. Namentlich sind dies die Etrusker Spitzmaus, das Meerschweinchen und der Mensch. Dies kann schon augenscheinlich der Abb. 3.7 entnommen werden. Abb. 3.2 zeigt eine Auswahl von Säugetieralveolen.

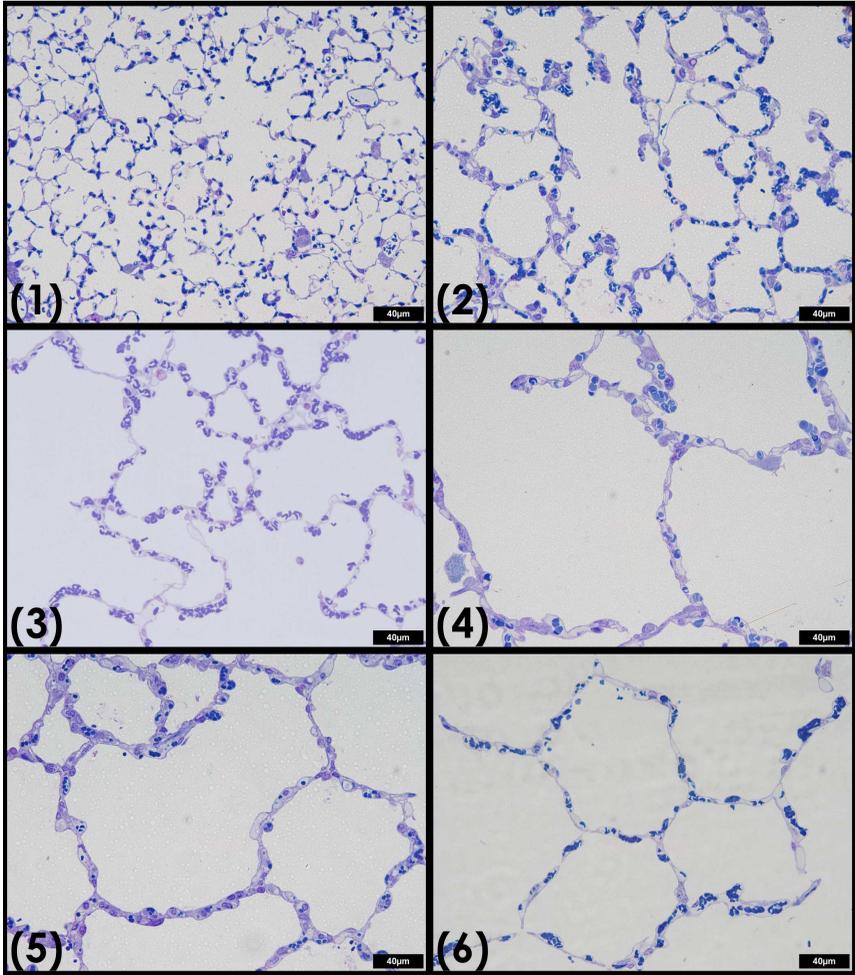


Abb. 3.2: Alveolen verschiedener Säugetierspezies bei 40facher Vergrößerung. (1) Etruskerspitzmaus, (2) Ratte, (3) Hund, (4) Mensch, (5) Giraffe und (6) Pferd.

Tabelle 2: Allgemeine Daten

Spezies	Anzahl Tiere		Körpergewicht (g)	Lungenvolumen (ml)	alveoläre Oberfläche (m ²) S(alv, par)	Atemfrequenz Atemzüge/min	Referenzen
	n						
Eitruskerspitzmaus	3	2,67 ± 0,37	0,103 ± 0,025	0,010 ± 0,004	661	Gehr et al. 1980, Jürgens et al. 1996	
Maus	5	41,66 ± 2,2	1,364 ± 0,057	0,100 ± 0,013	154	Burri et al. 1976, Droorbraugh 1960	
Ratte	3	307,67 ± 20,5	8,49 ± ,83	0,453 ± 0,05	80	Vock u. Weibel 1993, Droorbraugh 1960	
Meerschweinchen	5	472,4 ± 11,9	15,17 ± 0,94	0,880 ± 0,17	120	Forrest u. Weibel 1975, Kolb 1980	
Kaninchen	6	3.558,33 ± 1.263	79,2 ± 29,8	4,176 ± 1,44	38	Weibel 1972, Droorbraugh 1960	
Hund	5	25.960 ± 2.740	1.408 ± 161	48,6 ± 6,0	22	Hsia et al. 1994, Droorbraugh 1960	
Ziege	5	27.660 ± 6.693	1.742 ± 320	65,6 ± 9,5	20	Weibel et al. 1987, Krause et al. 2009	
Mensch	5	79.800 ± 10.733	4.380 ± 950	113 ± 36,8	15	Gehr et al. 1978, Droorbraugh 1960	
Kamel	2	231.750 ± 3.889	15.900 ± 1.979	439 ± 30,6	10	Gehr et al. 1981, Schroter et al. 1978	
Giraffe	1	383.000 ± N/A	21.000 ± N/A	850 ± N/A	12	Gehr et al. 1981, Vogelnest u. Ralph 1997	
Rind	3	473.667 ± 21.007	25.600 ± 6.261	951 ± 183	20	Constantinopol et al. 1989, Butler et al. 1993	
Pferd	3	446.667 ± 61.889	46.467 ± 1.754	1.578 ± 677	14	Constantinopol et al. 1989, Hailes u. Findlay 1968	

Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. Die Proben der Tiere dieser Studie stammen aus der ersten, die Atemfrequenzen aus der zweiten Angabe der Referenzen. Körpergewicht und Lungenvolumina wurden aus den entsprechenden Referenzen entnommen.

Im Mittel zeigen sich pro Quadratmillimeter (mm²) alveolärer Oberfläche zwischen den Spezies starke Unterschiede in der Dichte der AE2-Zellen. So variierten die Werte zwischen ~70 und ~160 Zellen pro mm² alveolärer Oberfläche. Drei Spezies zeigten unter 100 Zellen pro mm² alveolärer Oberfläche, nämlich Etruskerspitzmaus, Maus und Kaninchen (Tabelle 3). Eine Korrelation mit dem Körpergewicht oder der Atemfrequenz besteht nicht (Abb. 3.6).

Tabelle 3: Stereologische Daten der Alveolarepithelzelle Typ II

Spezies	Numerische Dichte der AE2-Zellen	Anzahl AE2-Zellen in der Lunge (x10 ⁶)	Anzahlgewichtetes mittleres Volumen der AE2-Zelle (µm ³)	AE2-Zellen pro mm ² alveolärer Oberfläche
	$N_V(AE2/par)$	$N(AE2,lung)$	$v_N(AE2)$	$N(AE2/S[alv])$
Etruskerspitzmaus	7,77 ± 1,40	0,66 ± 0,11	1303,9 ± 28,38	73,1 ± 22,7
Maus	6,44 ± 1,10	7,45 ± 1,24	619,9 ± 75,48	73,8 ± 12,9
Ratte	7,51 ± 2,62	54 ± 4,6	609,9 ± 4,2	120,1 ± 13,1
Meerschweinchen	10,09 ± 3,0	130 ± 39,96	941,9 ± 76,22	148,0 ± 32,9
Kaninchen	6,01 ± 1,40	422 ± 16,8	622,2 ± 94,56	94,8 ± 16,7
Hund	5,57 ± 1,46	6.762 ± 2.315	560,6 ± 53,81	139,7 ± 48,4
Ziege	4,45 ± 0,56	6.596 ± 1.579	532,6 ± 68,13	100,2 ± 15,3
Mensch	4,62 ± 1,33	16.689 ± 5.189	915,2 ± 59,43	157,5 ± 44,8
Kamel	5,34 ± 1,09	71.262 ± 5.684	614,4 ± 42,29	163,1 ± 24,3
Giraffe	5,91 ± N/A	105.400 ± N/A	588,4 ± N/A	124,0 ± N/A
Rind	4,24 ± 0,42	119.100 ± 18.160	548,7 ± 41,15	126,2 ± 10,6
Pferd	5,49 ± 0,69	167.300 ± 25.271	611,3 ± 72,34	115,0 ± 31,4

Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung.

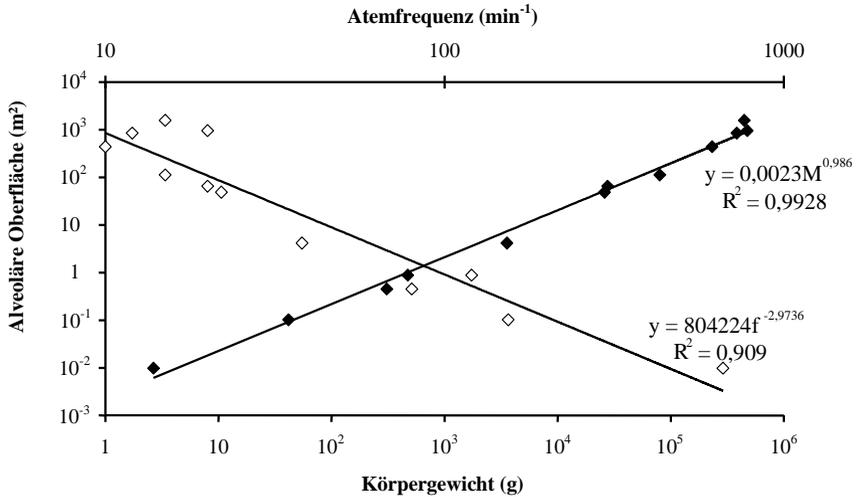


Abb. 3.3: Korrelation zwischen alveolärer Oberfläche und dem Körpergewicht (M; ♦); zwischen alveolärer Oberfläche und der Atemfrequenz (f; ◇). Regressionsformeln und Regressionskoeffizienten (R²) sind für M und f angegeben.

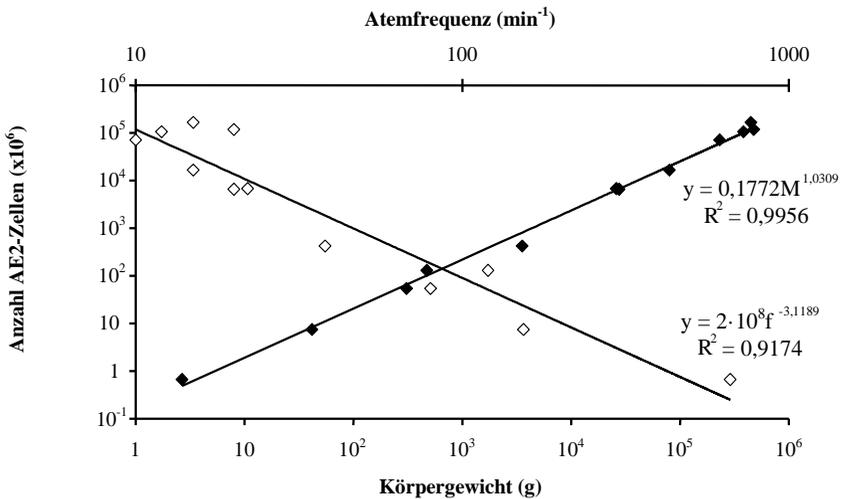


Abb. 3.4: Korrelation zwischen der Anzahl der AE2-Zellen und dem Körpergewicht (M; ♦); der Anzahl der AE2-Zellen und der Atemfrequenz (f; ◇). Regressionsformeln und Regressionskoeffizienten (R²) sind für M und f angegeben.

3.2 Elektronenmikroskopische Ergebnisse

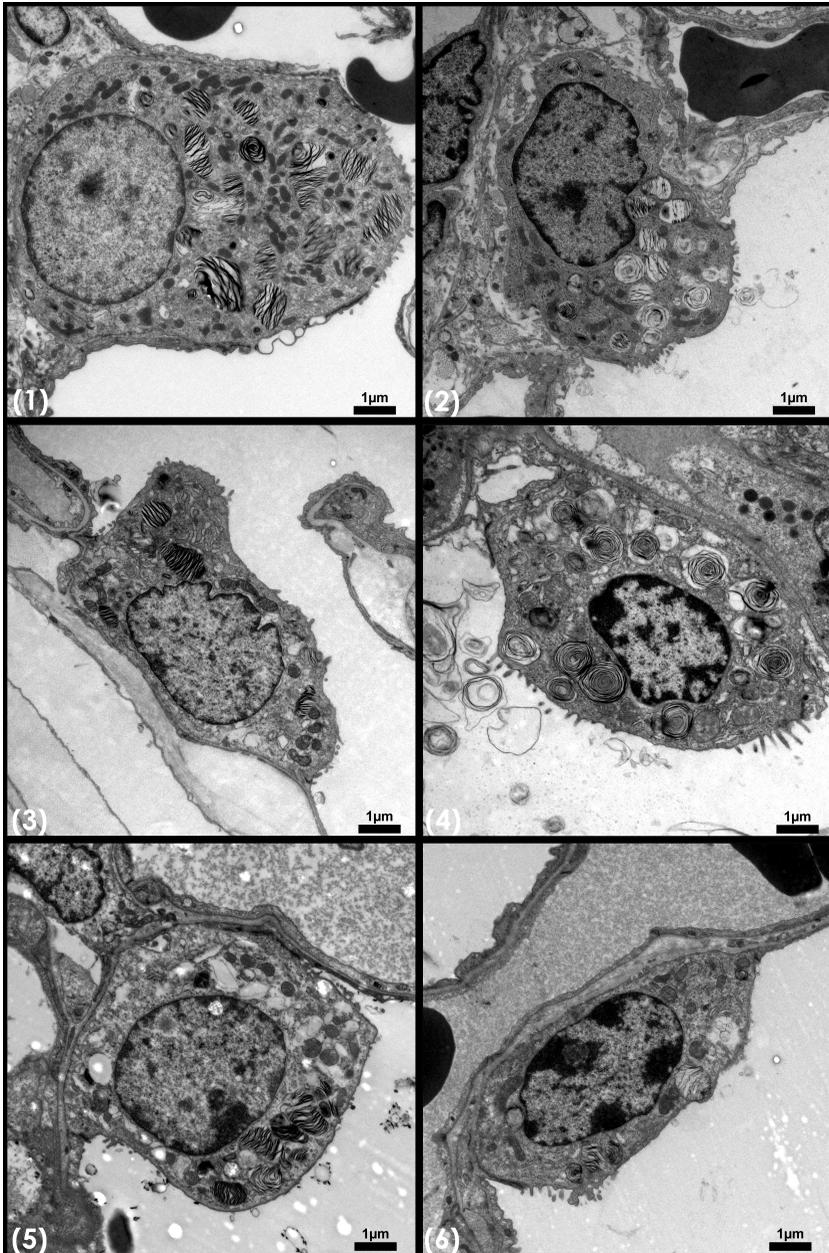


Abb. 3.7: AE2-Zellen verschiedener Säuger bei 7750facher Vergrößerung. (1) Etruskerspitzmaus, (2) Ratte, (3) Hund, (4) Mensch, (5) Giraffe und (6) Pferd.

Abb. 3.7 zeigt die Ultrastruktur von AE2-Zellen von sechs der zwölf untersuchten Spezies. Hierbei sind insbesondere die morphologischen Unterschiede der Lb ohne weiteres ersichtlich. In allen untersuchten Spezies konnten zwei unterschiedliche Typen von Lb beobachtet werden. 1.) Lb, deren Lamellen in konzentrischer Weise organisiert waren. 2.) Jene mit parallel angeordneten Lamellen. In menschlichen Zellen überwogen deutlich jene Lb mit konzentrisch angeordneten Lamellen, während parallel angeordnete Lamellen durchweg selten zu finden waren. Dies unterscheidet sich deutlich von den anderen untersuchten Spezies, deren Großteil (~80%) an Lb parallel angeordnete Lamellen hatten. Die Dichte der Lamellen innerhalb der Lb erschien bei allen beobachteten Spezies ähnlich zu sein, obwohl Unterschiede in der Qualität der Fixierung eine genaue Beurteilung schwierig gestalteten. Abgesehen von dem zuvor quantitativ erhobenen Unterschied in der Größe der Lb fiel nur noch ein Merkmalsunterschied der Lb zwischen den Spezies auf. Die Lb des Menschen weisen häufig einen peripher gelegenen Projektionskern (Abb. 3.8) auf, von dem die Lamellen ausgehen.

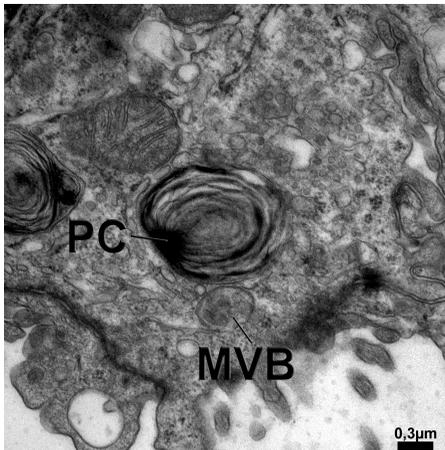


Abb. 3.8: Menschlicher Lb mit Projektionskern (PC) und darunter liegendem multivesikulären Körper (MVB). Die Lamellen der Lb sind dicht gepackt.

Mit Hilfe des EM wurden quantitativ die Werte für das mittlere Volumen der Gesamtheit der Lb innerhalb der AE2-Zellen, die Volumenfraktion der Lb am Gesamtvolumen der AE2-Zellen, das Gesamtvolumen der Lb im Lungenparenchym, die Oberflächendichte der Lb, das Volumenoberflächenverhältnis und das volumengewichtete mittlere Volumen einzelner Lb erhoben.

Für das Volumen der Lb pro AE2-Zelle $[V(Lb,AE2)]$ konnte eine Spannweite von 80 - 100 μm^3 in den meisten Spezies beobachtet werden. Dies errechnete sich aus der Volumenfraktion der Lb am Gesamtvolumen der AE2-Zelle multipliziert mit den mittleren Volumina der AE2-

Zellen jeder Spezies. Auch konnten dieselben Ausnahmen wie zuvor bei den Zellvolumina beobachtet werden, nun aber zuzüglich des Hundes. Bei diesen Spezies maßen die Volumina 120 bis 140 μm^3 , wobei jedoch bei der Spitzmaus die größten Volumina mit Werten größer 200 μm^3 beobachtet werden konnten. Dabei stellt sich allerdings die Volumenfraktion der Lb am Gesamtzellvolumen bei der Spitzmaus nicht höher als bei den anderen untersuchten Spezies dar (18%, siehe Tabelle 4), weshalb angenommen werden darf, dass dieses Ergebnis lediglich auf die größeren Zellvolumina der AE2-Zellen zurückzuführen ist. Die Volumenfraktionen für die Lb bei den anderen Spezies schwankten meist zwischen 14% und 18%, wobei der Hund mit $\sim 21\% \pm 2\%$ und das Meerschweinchen mit $\sim 28\% \pm 4\%$ die höchsten Werte präsentierten. Keiner dieser Werte zeigte eine signifikante Korrelation mit dem Körpergewicht oder der Atemfrequenz (Abb. 3.9). Die gesammelten stereologischen Daten für die Lb sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Die Volumenfraktionen der anderen untersuchten Zellkompartimente präsentierten sich wie folgt. Die Mitochondrien nahmen Fraktionen zwischen 3% und 6% ein, wobei die Maus mit 9% und das Pferd mit 10% die höchsten Werte zeigten. Der Anteil des Nukleus belief sich meist auf Werte zwischen $\sim 20\%$ und $\sim 30\%$, wobei die Giraffe lediglich einen Anteil von 17% präsentierte. Dabei ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der geringen Probenanzahl der Giraffe keine Signifikanz angegeben werden kann. Die Volumenfraktionen dieser Kompartimente und die des restlichen Zytoplasmas korrelierten weder mit dem Körpergewicht noch der Atemfrequenz der jeweiligen Spezies signifikant. Die Werte sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Als das Gesamtvolumen der Lb [$V(\text{Lb,par})$] errechnet wurde, ermittelt aus den Werten der mittleren Lb-Volumina pro AE2-Zelle [$V(\text{Lb/AE2})$] und der Gesamtzahl der AE2-Zellen [$N(\text{AE2,par})$], verdeutlichte sich eine enge Korrelation mit dem Körpergewicht. Wieder wurde eine umgekehrte Beziehung mit der Atemfrequenz festgestellt (Abb. 3.10). Die Steigung für die allometrische Beziehung des Gesamtvolumens der Lb ähnelte stark der der allometrischen Beziehung der alveolären Oberfläche (vgl. Abb. 3.3 & 3.10). Darüber hinaus steht das Gesamtvolumen der Lb in enger Beziehung mit der alveolären Oberfläche (Abb. 3.11).

Die Oberflächendichte der Lb [$S_V(\text{Lb/AE2})$] maß bei fast allen Spezies Werte zwischen 0,4 und 0,7 μm^{-1} , wobei diesmal das Kamel die Ausnahme mit fast 1 μm^{-1} bildete. Das Volumenoberflächenverhältnis (V_S -Ratio) variierte zwischen 0,15 und 0,19 μm beim Kamel beziehungsweise bei der Giraffe und bis zu 0,43 μm beim Hund (Tabelle 3). Die volumengewichteten mittleren Volumina [$\bar{V}(\text{Lb})$] zeigten Werte, welche zwischen 0,6 und 1,6 μm^3 schwankten, wobei sowohl das Meerschweinchen als auch das Pferd Werte über 2

μm^3 präsentierten. Keiner dieser Werte zeigte eine signifikante Beziehung mit dem Körpergewicht oder der Atemfrequenz. Ein Beispiel in Bezug auf das Volumenoberflächenverhältnis zeigt Abb. 3.12.

Die Tabellen 2, 3 und 4 beinhalten Sammlungen der Daten, die in dieser Studie für jede Spezies in Bezug auf allgemeine Charakteristika, AE2-Zellen und Lb erhoben wurden. Tabelle 5 zeigt die Volumenfraktionen der anderen untersuchten Zellkompartimente. Die Tabellen 6.1 und 6.2 bieten einen Überblick über die Korrelationsanalysen der stereologischen Daten mit Körpergewicht (Tabelle 6.1) und Atemfrequenz (Tabelle 6.2).

Tabelle 4: Stereologische Daten der Lamellenkörper

Spezies	Volumenfraktion Lb in AE2-Zellen (%)	Lb-Volumen pro AE2-Zelle (μm^3)	Lb-Volumen der Lunge (mm^3)	volumengewichtetes mittleres Volumen (μm^3)	Lb	Oberflächendichte der Lb (μm^{-2})	Volumen-Oberflächen- Verhältnis der Lb (μm)
	$V_V(Lb/AE2)$	$V(Lb,AE2)$	$V(Lb,lung)$	$v_V(Lb)$		$S_V(Lb/AE2)$	$V_V\text{-Ratio}(Lb)$
Etruskerspitzmaus	$18,8 \pm 3,2$	$238,5 \pm 43,2$	$0,156 \pm 0,016$	$1,060 \pm 0,243$		$0,50 \pm 0,08$	$0,367 \pm 0,058$
Maus	$15,0 \pm 2,2$	$94,6 \pm 20,9$	$0,708 \pm 0,189$	$0,726 \pm 0,321$		$0,54 \pm 0,10$	$0,284 \pm 0,041$
Ratte	$16,3 \pm 1,9$	$98,7 \pm 11,4$	$5,318 \pm 0,507$	$0,835 \pm 0,121$		$0,56 \pm 0,12$	$0,247 \pm 0,019$
Meerschweinchen	$27,8 \pm 4,2$	$142,0 \pm 17,7$	$18,592 \pm 6,382$	$2,257 \pm 0,501$		$0,67 \pm 0,05$	$0,225 \pm 0,025$
Kaninchen	$15,6 \pm 3,4$	$98,4 \pm 25,6$	$39,936 \pm 18,63$	$1,498 \pm 0,873$		$0,43 \pm 0,12$	$0,377 \pm 0,049$
Hund	$21,4 \pm 2,2$	$120,5 \pm 19,0$	$847,7 \pm 414,3$	$1,710 \pm 0,581$		$0,50 \pm 0,07$	$0,434 \pm 0,069$
Ziege	$16,1 \pm 2,5$	$85,7 \pm 12,3$	$557,6 \pm 116,8$	$1,206 \pm 0,392$		$0,47 \pm 0,05$	$0,348 \pm 0,044$
Mensch	$14,8 \pm 2,7$	$146,8 \pm 39,3$	$2,399 \pm 628,5$	$0,803 \pm 0,155$		$0,48 \pm 0,09$	$0,339 \pm 0,076$
Kamel	$12,2 \pm \text{N/A}$	$86,6 \pm 22,2$	$6,110 \pm 1,093$	$0,624 \pm 0,228$		$0,99 \pm 0,17$	$0,146 \pm 0,052$
Giraffe	$15,7 \pm 4,5$	$71,7 \pm \text{N/A}$	$7,562 \pm \text{N/A}$	$0,703 \pm \text{N/A}$		$0,66 \pm \text{N/A}$	$0,186 \pm \text{N/A}$
Rind	$17,7 \pm 4,0$	$94,0 \pm 31,1$	$11,570 \pm 5,286$	$1,464 \pm 0,115$		$0,54 \pm 0,14$	$0,232 \pm 0,085$
Pferd	$16,8 \pm 1,4$	$98,7 \pm 14,3$	$14,187 \pm 6,470$	$2,112 \pm 0,694$		$0,75 \pm 0,28$	$0,315 \pm 0,032$

Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Tabelle 5: Volumenfraktionen

Spezies	Mitochondrien	Nukleus	Zytoplasma (Rest)
	%	%	%
Etruskerspitzmaus	6,1 ± 0,8	19,1 ± 1,4	56,0 ± 2,2
Maus	10,0 ± 1,1	24,9 ± 2,9	50,1 ± 2,8
Ratte	6,2 ± 0,3	27,0 ± 0,6	50,5 ± 1,6
Meerschweinchen	5,9 ± 0,8	22,3 ± 3,1	44,0 ± 2,4
Kaninchen	3,4 ± 0,4	30,9 ± 2,4	50,1 ± 2,3
Hund	3,3 ± 0,3	26,7 ± 2,0	48,6 ± 2,6
Ziege	3,5 ± 1,0	29,5 ± 3,0	51,0 ± 4,4
Mensch	5,5 ± 0,4	24,7 ± 0,8	55,0 ± 3,0
Kamel	6,2 ± N/A	17,8 ± N/A	63,8 ± N/A
Giraffe	4,3 ± 0,4	24,7 ± 3,5	55,3 ± 3,3
Rind	3,9 ± 0,4	28,1 ± 0,4	50,3 ± 4,5
Pferd	9,3 ± 1,6	19,8 ± 5,7	54,1 ± 3,3

Volumenfraktion der Zellkompartimente Mitochondrien, Nukleus und restlichem Zytoplasma. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung

Tabelle 6.1: Korrelationsanalyse mittels Spearmans Rho-Test mit dem Körpergewicht

Korrelation mit dem Körpergewicht (M)	<i>r</i>	<i>P</i>
Alveoläre Oberfläche	1,0	<0,01
Anzahl AE2-Zellen	0,986	<0,01
Lb-Volumen	0,986	<0,01
Mittleres Volumen der AE2-Zelle	-0,538	0,071
Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Lb	0,332	0,297

Tabelle 6.2: Korrelationsanalyse mittels Spearmans Rho-Test mit der Atemfrequenz

Korrelation mit der Atemfrequenz (f)	<i>r</i>	<i>P</i>
Alveoläre Oberfläche	-0,87	<0,01
Anzahl AE2-Zellen	-0,874	<0,01
Lb-Volumen	-0,874	<0,01
Mittleres Volumen der AE2-Zelle	0,425	0,169
Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Lb	0,425	0,165

Die *r*-Werte geben die Stärken der Korrelationen an. Die *P*-Werte geben die statistischen Signifikanzen der Korrelationen an.

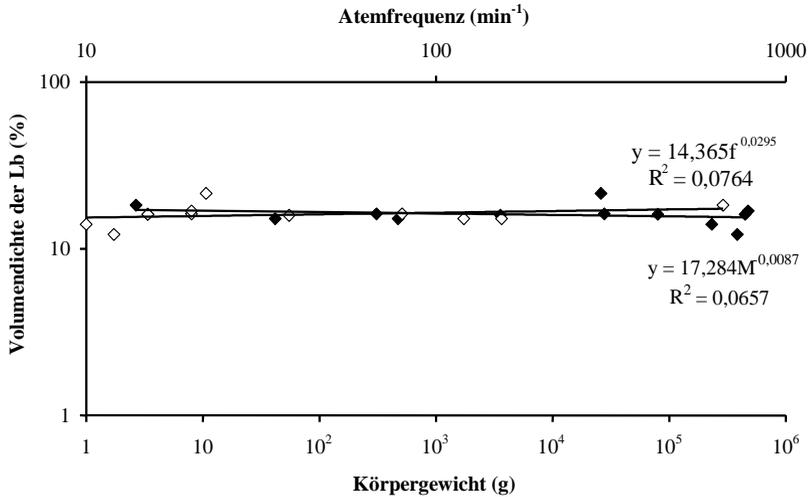


Abb. 3.9: Korrelation zwischen der Volumenfraktion der Lb vom AE2-Zellvolumen und dem Körpergewicht (M;♦); der Volumenfraktion der Lb vom AE2-Zellvolumen und der Atemfrequenz (f;◇). Regressionsformeln und Regressionskoeffizienten (R²) sind für M und f angegeben.

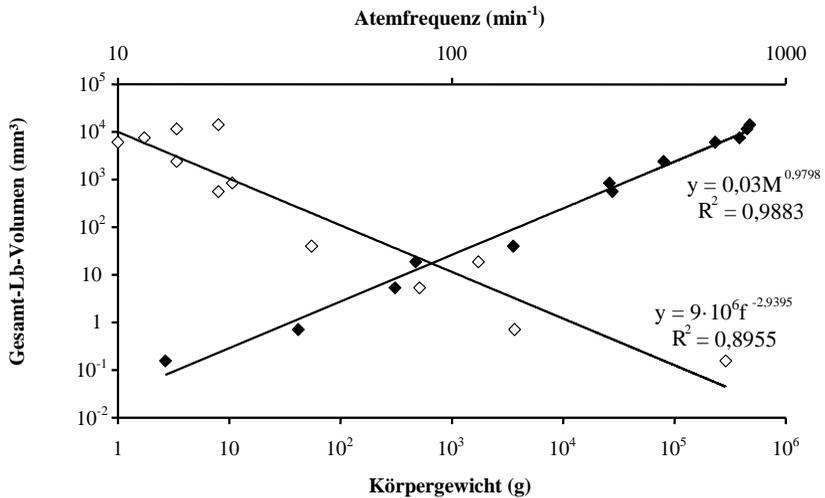


Abb. 3.10: Korrelation zwischen dem Gesamtvolumen der Lb in der Lunge und dem Körpergewicht (M;♦); dem Gesamtvolumen der Lb in der Lunge und der Atemfrequenz (f;◇). Regressionsformeln und Regressionskoeffizienten (R²) sind für M und f angegeben.

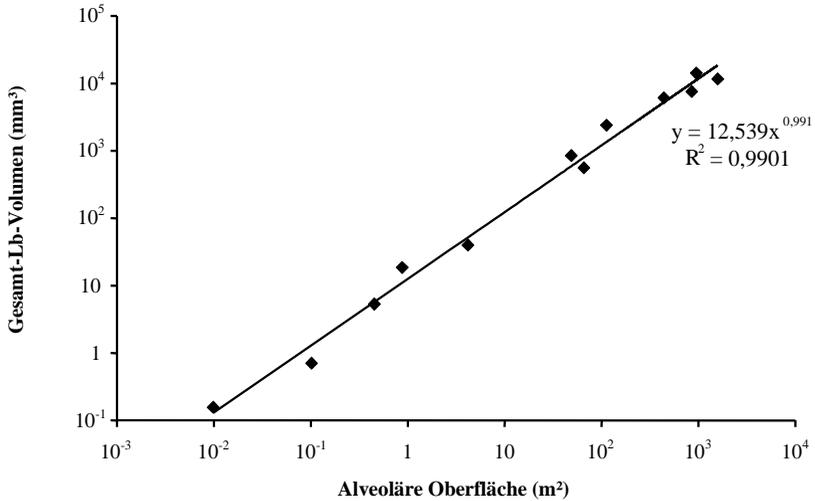


Abb. 3.11: Korrelation zwischen dem Gesamtvolumen der Lb in der Lunge und der alveolären Oberfläche. Regressionsformel und Regressionskoeffizient (R^2) sind angegeben. Es besteht eine signifikante Korrelation.

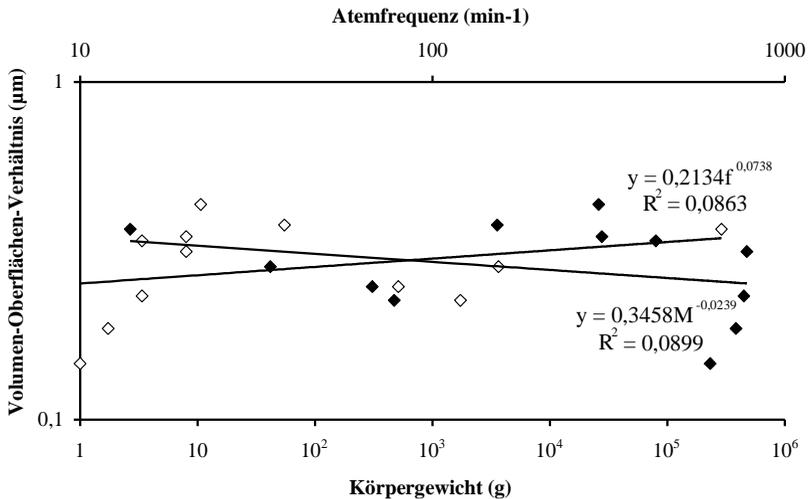


Abb. 3.12: Korrelation zwischen dem Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Lb und dem Körpergewicht (M; ♦); dem Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Lb und der Atemfrequenz (f; ◇). Regressionsformeln und Regressionskoeffizienten (R^2) sind für M und f angegeben.

4. Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Fixierung der Lungen

Die Fixierung der Lungen wurde in den Studien vorgenommen, aus denen die Präparate stammen.

An die Fixierung der Lunge für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen werden verschiedene Anforderungen gestellt. Das Lungenvolumen, die Struktur des Parenchyms, der Alveolen und Kapillaren, die Ultrastruktur der Zellen und ihrer subzellulären Kompartimente, das kapilläre Blut, die Oberflächenbeschichtung mit Surfactant und die DNA/RNA der Zellen sollen erhalten bleiben (Hsia et al. 2010). Keine der für die Lungenfixierung existierenden Methoden kann alle Prämissen gleichzeitig ermöglichen. Entsprechend muss die Auswahl der geeigneten Fixierung auf Basis des Studienziels erfolgen (Hayat 2000, Kiernan 1999). Es besteht die Möglichkeit der chemischen Fixierung und der Gefrierfixierung. Letztere ist für morphometrische Erhebungen in der Elektronenmikroskopie ungeeignet. Hierbei wird die Lunge offen gelegt und mit einem Gefriermittel übergossen, sodass sie in kürzester Zeit gefroren ist (Mazzone et al. 1978). Neben signifikanter Gewebeschrumpfung (Mazzone et al. 1980) zeigten Weibel et al. (1982) jedoch in einer Evaluation dieser Methode für die Lungenfixierung, dass die Ultrastruktur des Lungengewebes starke Unregelmäßigkeiten bis hin zu Zerreißen aufwies und damit unbrauchbar war.

Als Methode der Wahl zur Fixierung der Lunge für morphometrische Studien ist also die chemische Fixierung anzusehen. Die bewährtesten Fixiermittel für chemische Fixierung finden im Folgenden ihre Auflistung. Formaldehyd, ein Aldehyd dessen korrekte Bezeichnung Methanal ist, ist gut geeignet für lichtmikroskopische, immunhistochemische Untersuchungen, da es die Antigenität von Proteinen nicht gänzlich zerstört (Griffiths 1993, Skepper 2000). Für elektronenmikroskopische Untersuchung ist der Formaldehyd allein allerdings nicht geeignet, da er das Lungengewebe nicht festigt und es so beim Schneiden des Gewebes zu Verformungen kommt, die die morphometrischen Untersuchungen verfälschen. Darüber hinaus wird die Ultrastruktur der Zellen nicht gut fixiert (Hsia et al. 2010). Glutaraldehyd, ein fünfwertiger Alkohol, hat die Fähigkeit, sich zu vernetzen und damit eine schnelle, mechanisch belastbare Stabilisierung des Gewebes herbeizuführen (Sabanti et al. 1963, Kiernan 2000). In wässriger Lösung formt Glutaraldehyd verschieden große Polymere, von denen die kleinen Polymere das Gewebe rasch infiltrieren (Kiernan 2000). Für elektronenmikroskopische Studien ist mit Kaliumphosphat, HEPES oder Cacodylat auf pH7,4

gepuffertes, 2,5%iges Glutaraldehyd das Standardfixiermittel (Hsia et al. 2010). Bei kurz andauerndem Kontakt mit dem Gewebe erhält die Fixierung die Semipermeabilität der Zellmembranen, weshalb die Osmolarität der Pufferlösung genau bedacht werden muss (Mathieu 1978). Es ist deshalb bei Anwendung von Glutaraldehyd mit einer Zellschrumpfung zu rechnen, unabhängig von der Isotonie der Lösung (Iqbal u. Weakley 1974). Nach einigen Stunden Kontakt mit Glutaraldehyd wird schließlich auch die Semipermeabilität gehemmt (Kiernan 2000).

Als Möglichkeiten der Applikation bestehen die Instillierung des Fixiermittels über den Luftweg oder die Perfusion mit Fixiermittel über das pulmonale Gefäßsystem (Hsia et al. 2010). Kann die Lunge nicht *in toto* entnommen werden, besteht noch die Möglichkeit über direkte intrapulmonale Injektion von Glutaraldehydlösung kleinere Probenmengen zu entnehmen (Hsia et al. 2010). Die Instillierung über den Luftweg bewahrt die Alveolarseptenstruktur und das kapillare Blut, spült jedoch das intraalveoläre Surfactant davon, woraufhin es sich unvorhersagbar an anderer Stelle wieder ablagert. Sie ist mit einem konstanten Druck (20–25 cmH₂O) und hohem Durchlauf auszuführen, was die Alveolen offen hält, die Struktur der Lunge bewahrt und ein gleichmäßiges Eindringen der Fixierlösung ins Gewebe ermöglicht (Mühlfeld et al. 2007, Hsia et al. 2010). Dies wiederum macht später eine fehlerfreie Erhebung der alveolären Oberfläche möglich (Weibel 1970). Die Glutaraldehyd-Lösung ist hierbei zum Blutplasma isoosmolar zu halten (Weibel 1984). Das Gewebe wird bei Kontakt mit der Glutaraldehydlösung praktisch sofort fixiert. Artefakte können hierbei entstehen, wenn die Fixierung bei laufendem Kreislauf vorgenommen wird und sich hinter schon fixierten Kapillaren Erythrozyten stauen und dadurch das Kapillarendothel eine Aufwölbung aufweist (Hsia et al. 2010, Gil et al. 1979).

Die Perfusionsfixierung erhält das intraalveoläre Surfactant, das kapilläre Blut jedoch wird durch die Fixierlösung ersetzt. Hierbei muss zum Offenhalten der Alveolen ein konstanter intrapulmonaler Druck aufgebaut werden (Bachofen et al. 1982, Gil et al. 1979). Die Fixierung findet *in situ* oder an isolierten Lungen statt, wobei der Einfluss über eine Kanüle in der Pulmonalarterie und der Ausfluss über eine Kanüle im linken Herzvorhof geschehen. Das Gefäßbett wird zuvor mit einer gepufferten, iso-osmolaren Lösung vom Blut befreit (Bachofen et al. 1982). Die Perfusion läuft unter stetem Durchfluss mit einem dem intrapulmonalem Druck angepassten Perfusionsdruck mit zum Blutplasma hypertoner Lösung (Hsia et al. 2010). Die Osmolarität wird mit 3% Dextran auf 510 mOsm justiert. Dem Glutaraldehyd anschließend wird die Lunge mit 1% Osmiumtetroxid, danach mit 0,5% Uranylacetat mit Dextran (Bachofen et al. 1982) und schließlich direkt im Anschluss mit 70-

100%igem Ethanol perfundiert (Oldmixen et al. 1985). Das Fixiermittel gelangt allerdings manchmal nicht gleichmäßig in alle Lungenanteile, sodass häufig Unterschiede in der Erhaltung des Gewebes und des Surfactantfilms bestehen (Gil u. Weibel 1969). Direkt nach der Perfusionsfixierung kann die Lunge sofort geschnitten werden (Hsia et al. 2010).

Für beide Fixiermethoden gilt, dass sie bei optimalen Bedingungen gute Ergebnisse bei der Fixierung des Lungengewebes erzielen (Hsia et al. 2010). In der hier vorliegenden Studie wurde die Instillierung von isotoner, mit Kaliumphosphat auf pH7,4 gepufferte Glutaraldehydlösung über den Luftweg als Methode gewählt (Weibel 1970). Für die Luftweginstillierung spricht, dass über diesen Weg das Fixiermittel unmittelbar mit den AE2-Zellen in Verbindung gebracht werden konnte und sie somit schnellstmöglich fixiert wurden. Damit ist ein naher Zustand am *in vivo* Zustand anzunehmen. Aufgrund der Wahl dieser Methode musste das Gewebe für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen weiter bearbeitet werden.

Die Postfixierung der Lunge findet statt, nachdem die nach der Instillierung präparierten Lungen 24 Stunden in Glutaraldehydlösung lagen. Die Postfixierung wird zunächst mit Osmiumtetroxid durchgeführt. In isotoner Pufferlösung bindet es an ungesättigte Phospholipide (Riemersma 1968, Gil 1985) und führt so zu einer Stabilisierung und Erhöhung der Elektronendichte von Biomembranen. Die Pufferlösung sollte hierbei kein Phosphat enthalten, da das zu elektronendichten, granulären Artefakten entlang von Gefäßwänden, Erythrozytenmembranen und alveolärer Oberfläche führt (Gil u. Weibel 1968). Ein weiterer Bestandteil der Postfixierung ist das Uranylacetat, das auch zur Kontrastverstärkung eingesetzt wird. Es bindet Phosphodiestergruppen gesättigter Phospholipide und stabilisiert damit Membranen (Huang et al. 1988). Zur Stabilisierung von Lb werden die Gewebeproben en bloc für längere Zeit in einer wässrigen Lösung mit Uranylacetat behandelt (Fehrenbach et al. 1991, Ochs et al. 1994).

Ethanol oder Aceton entzieht dem Gewebe Wasser und denaturiert verschiedene Proteine, insbesondere der elastischen Fasern der Lunge, wodurch die Probe an mechanischer Stabilität gewinnt (Oldmixen et al. 1985).

Bezüglich der Einbettung zeigten sich die besten Ergebnisse für Elektronenmikroskopie (EM) und hochauflösender Lichtmikroskopie (LM) mit Epoxidharzen (EponTM Resin 828), da hier die Gewebeschrumpfung weniger als 5% beträgt (Weibel u. Knight 1964, Hanstede u. Gerrits 1983, Mühlfeld et al. 2010). Alternativen dazu sind Glykol-Methacrylat (nur LM) und Paraffin. Letzteres ist deswegen nachteilig, da es vor allem in Verbindung mit einer Formalin-Fixierung zu unvorhersagbarer massiver Gewebeschrumpfung führt (Hsia et al. 2010).

Aufgrund der aufgeführten Eigenschaften entschloss man sich in dieser Studie für die Verwendung von in EponTM eingebetteten Präparaten.

4.1.2 Stereologische Analysen

Das Ziel dieser Studie war geknüpft an die Erhebung verschiedener quantitativer Parameter. So zum Beispiel die Bestimmung von Zellzahl und -volumina von AE2-Zellen und deren subzellulären Strukturen, insbesondere der Surfactantspeicherstätten, der Lb. Um vergleichbar mit Arbeiten von Weibel oder Gil zu sein, wählte man für diese Studie Landsäugetiere aus, deren Ursprung zum Teil afrikanisch war, wie die Giraffe. Da für wissenschaftliche Untersuchungen keine wahllose Anzahl an Giraffenproben verfügbar ist, wurden Proben aus Tieren verwendet, die schon für die Wissenschaft, d.h. zu früheren Studien zur Verfügung standen. Das Mittel der Wahl zur Erhebung quantitativer Eigenschaften erster Ordnung wie Volumen, Oberfläche, Länge, Partikelzahl und -größe (Ochs 2006, Weibel 1979), ist die Stereologie.

Die Stereologie hat eine lange Geschichte (Cruz-Orive 1987). Schon 1635 fand Cavalieri, dass anhand mehrerer Schnitte (2D) eines Objektes das mittlere Volumen (3D) dessen erhoben werden kann. Seither ist das „Cavalieri-Prinzip“ etabliert (Hsia et al. 2010). In der hier vorliegenden Studie wurde jedoch das Volumen jeder Lunge durch ein einfacheres Verfahren, die Wasserverdrängungsmethode (Scherle 1970) erhoben. Im Jahr 1777 zeigte George Leclerc Comte de Buffon, dass eine Nadel, die in ein Gitternetz gesteckt wird, die Linien des Gitternetzes mit einer Wahrscheinlichkeit proportional zur Nadellänge und des Abstandes zwischen den Gitternetzlinien kreuzt. „Buffons Nadel“ führte zur Möglichkeit, in Schnitten die Gesamtlänge und Oberfläche unregelmäßiger Objekte zu bestimmen (Tomkeiff 1945, Saltykov 1946). Dieses Grundsystem fand in der hier vorliegenden Arbeit mittels Linientestsystemen Anwendung. Nach den Überlegungen von Auguste Delesse (1847) ist das „Delesse Prinzip“ entstanden, nachdem die Volumenfraktion eines Objektes in einem Referenzvolumen gleichzusetzen ist mit der Flächenfraktion des Objektes von der Gesamtfläche eines Schnittes durch jenes Referenzvolumen, wobei der Schnitt jedoch so dünn sein muss, dass er als zweidimensional angesehen werden kann (Weibel et al. 1966). Dieses Prinzip wurde im Laufe der Zeit mehrfach modifiziert, bis hin zur vereinfachten „point counting“ Methode (Thompson 1930). Diese Methoden und ihre Modifizierungen dienen der Quantifizierung der Eigenschaften Länge, Oberfläche und Volumen von Objekten innerhalb eines dreidimensionalen Raumes anhand zweidimensionaler Schnitte durch eben diesen Raum (Hsia et al. 2010). Die Anzahl von Partikeln wurde in der Zeit vor 1984 anhand der „Modell-

basierten“ Stereologie mit Testebenen ermittelt. Diese Verfahren benötigen eine Vorstellung von Größe, Form und Orientierung des Partikels im Raum und sind somit durch mögliche Falschannahmen dieser Eigenschaften fehlerbehaftet (Mayhew 1991). Im Jahr 1984 wurde schließlich durch Sterio DC die „model-basierte“ durch die „design-basierte“ Stereologie abgelöst und Partikelanzahl und deren Größe nicht mehr anhand von Testebenen bestimmt. Vielmehr zeigte er den „physical disector“, welcher mit einem Testvolumen, bestehend aus zwei Schnitten bekannten Abstands zueinander arbeitet (Howard u. Reed 2005, Sterio 1984). Im Übrigen sei hier erwähnt, dass Sterio DC ein Anagramm von „disector“ ist. Auf einzelne stereologische Prinzipien wird im Folgenden eingegangen.

4.1.2.1 Genauigkeit und Präzision

Zunächst einmal müssen die Begriffe Genauigkeit und Präzision diskriminiert werden. Genauigkeit einer Erhebung beschreibt, in wie weit die ermittelten Werte dem „wahren Wert“ entsprechen. Eine von systematischen Fehlern freie Methode liefert *genaue* Werte, sie ist also mit einer bestimmten Standardabweichung dem „wahren Wert“ nahe. Quellen des systematischen Fehlers sind Fehler in der Gewebefixierung, der Probenentnahme und der Datenerhebung (Hsia et al. 2010). Präzision beschreibt die Streuung um einen erhobenen Mittelwert. Präzise Daten haben eine geringe Standardabweichung, besagter Mittelwert entspricht jedoch nicht zwangsläufig dem „wahren Wert“. Eine Methode, die mit systematischen Fehlern behaftet ist, liefert unter Umständen sehr präzise Werte, diese sind aber *ungenau*. Die Ungenauigkeit ist am Ende der Studie nicht zu erkennen, der erhobene Wert wird als wahr angesehen (Howard u. Reed 2005). Im Falle einer Methode, die so gestaltet wurde, dass sie keine systematischen Fehler beinhaltet, können die *genauen* Werte zusätzlich *präzise* werden, indem mehr Arbeit in Form von Erhöhung der Tier- und Probenanzahl investiert wird. Für die quantitative Erhebung organischer und zellulärer Strukturen ist also eine genaue Methode mit adaptierbarer Präzision wünschenswert (Howard u. Reed 2005, Hsia et al. 2010). Die Anzahl der Tiere (meist drei bis fünf) pro Spezies und der Gewebelöcke, auf die man sich in der vorliegenden Studie beschränkte, ist als ausreichend anzusehen, ein hinreichend präzises Ergebnis zu erzielen. Im Allgemeinen wird eine Tieranzahl von mindestens fünf statistisch empfohlen (Cruz-Orive & Weibel, 1990). Die Abwägung von Kosten, in Form von Zeit und Aufwand, gegen Nutzen, in Form von Präzision (Shay 1975) führten schließlich zu der Entscheidung, wie viele Gewebelöcke pro Tier entnommen werden (je drei).

Die Stereologie besteht aus zwei Schritten. 1.) Das „Sampling“, also die Probenauswahl und 2.) „estimation“, also die Erhebung der Werte (Hsia et al. 2010, Ochs 2006, Weibel 1979). In Zusammenhang mit den vorher genannten Begriffen Genauigkeit und Präzision ergibt sich nun Folgendes. Wenn auf den Stufen Gewebefixierung, Probenentnahme und Analyse keine Fehler entstehen, so bietet die Stereologie eine Methode, die genaue und mit entsprechendem Aufwand auch präzise Werte liefert (Howard u. Reed 2005). Für die Vermeidung der Fehler existieren bereits etablierte stereologische Vorgehensweisen, sodass die Stereologie a priori als frei von systematischen Fehlern angesehen werden kann (Howard u. Reed 2005).

4.1.3 Probenentnahme: Quelle des systematischen Fehlers

Bei der Probenentnahme aus dem fixierten Gewebe sind zwei wesentliche Aspekte zu beachten: 1.) Die Lokalisation und 2.) die Orientierung der Schnitte.

Lokalisation: Von besonderem Interesse ist die zufällige Probenauswahl („random sampling“) (Mayhew 1991). Diese gewährleistet, dass jeder Teil eines Organs mit derselben Wahrscheinlichkeit als Schnitt in die Analyse eingeht und die Schnitte, trotzdem nur ein verschwindend geringer Teil des Organs untersucht werden kann, repräsentativ sind. Nur dadurch ist der Ausschluss systematischer Fehler möglich (Hyde et al. 2007).

Im Falle der Lunge stehen im Wesentlichen drei einfache Methoden zur Verfügung, um randomisierte Proben zu erhalten. 1.) Beim „Independent uniform random sampling“ sei die Lunge in eine Anzahl N Schnitte gleicher Dicke geteilt. Jedem der Schnitte wird eine Zahl zwischen 1 und N zugewiesen. Nun wird per Zufall sofort eine Zahl gewählt, wie man Proben aufnehmen will (n) und der entsprechende Schnitt wird der Untersuchung zugeführt (Nyengaard u. Gundersen 2006). Das Wort „uniform“ impliziert, dass alle Teile der Lunge dieselbe Chance haben, ausgewählt zu werden (Stuart 1984). 2.) Beim „systematic uniform random sampling“ (SURS) wird wie folgt verfahren. Ein in Lokalisation und Orientierung zufälliger Schnitt wird von der Lunge angefertigt, auf den weitere, schichtdickengleiche, parallele Schnitte angefertigt werden. Aus der Gesamtzahl dieser Schnitte wähle man im Abstand m weitere Schnitte, also jeden m ten Schnitt, wobei der erste Schnitt, den man wählt, ein zufällig zwischen 1 und m ausgewählter Schnitt ist (Abb. 4.1) (Mayhew 1991, Nyengaard u. Gundersen 2006).

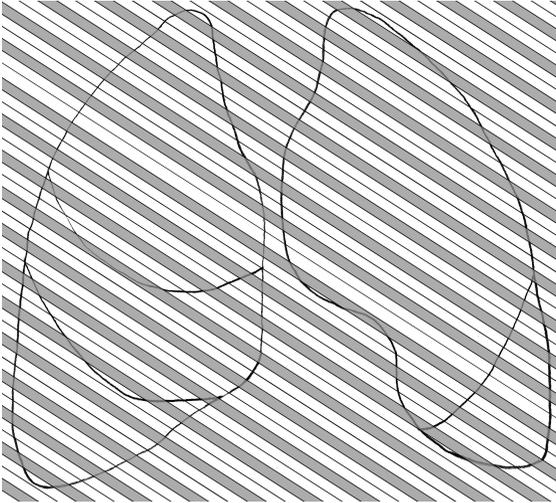


Abb. 4.1: SURS. Lunge in schichtdickengleiche Schnitte unterteilt. Im Abstand $m=3$ wurden Schnitte für die Untersuchung ausgewählt (grau unterlegt). An der Lungenbasis der rechten Lunge wurde der zweite Schnitt (Zahl zwischen 1 und $m=3$) als Erstauswahl gewählt.

Diese Methode garantiert, dass die ausgewählten Schnitte nicht zu eng beieinander liegen. In den tieferen Ebenen, also vom Schnitt zum Gewebblock, vom Gewebblock zum LM-/EM-Präparat, können die Prinzipien des SURS wiederholt werden. Dies bedeutet, dass auf die zuvor gewählten Schnitte ein Rasternetz gelegt wird (Abb. 2.1 [2]), von dem jedes m te Raster vom zufällig als Startpunkt gewählten Raster für die Gewinnung eines Gewebblockes verwendet wird. Diese Methode erzielt den Vorteil, dass größere Schnitte auch mehr Gewebelöcke ergeben, sodass ihre Fraktion am Gesamtvolumen gewahrt bleibt (Weibel et al. 2006).

3.) Bei der „stratified uniform random sampling“ Methode werden im Falle der Lunge zunächst zufällig einige der vorhandenen Lungenlappen („strata“) ausgewählt, die anschließend nach dem Prinzip des SURS weiter bearbeitet werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass Ergebnisse aus den Lungenlappen auf die Gesamtlunge übertragbar sind und somit die Anzahl der Proben reduziert werden kann (Nyengaard u. Gundersen 2006, Weibel et al. 2006). Aufgrund der genannten Vorteile wurde eben dieses Verfahren für die hier vorliegende Studie verwendet.

Orientierung: Es muss Beachtung finden, dass verschiedene Organe aufgrund der so genannten Isotropie auf verschiedene Weise gehandhabt werden müssen. Isotropie bedeutet, dass die untersuchten Objekte innerhalb des Organs in einer zufälligen und homogenen Anordnung liegen (Elias u. Hyde 1980), wie zum Beispiel Alveolen. Sie besitzen also im Raum keine Präferenz bezüglich Orientierung und Anordnung. Hier liefert jeder in seiner Richtung zufällig gesetzter Schnitt dieselben Eigenschaften des Gewebes (Elias u. Hyde

1980). Anisotropes Verhalten zeigt zum Beispiel die Trachea, deren Struktur eine vertikale Richtung verfolgt (Hsia et al. 2010). Um auch hier randomisierte Schnitte zu erhalten, kann man die Methoden des „orientators“ oder „isectors“ anwenden (Mattfeldt et al. 1990, Nyengaard u. Gundersen 1991). Für größere Objekte, wie die Trachea, ist der „orientator“ geeignet. Hierbei wird das Objekt auf eine Winkeluhr gelegt, und eine zufällige Zahl zwischen eins und 99 gewählt. Diese Auswahl gibt den Winkel an, in dem das Organ geschnitten wird. Als nächster Schritt wird das Organ auf eine cosinus-gewichtete Winkeluhr gelegt, mit der zuvor entstandenen Schnittfläche nach unten und die Prozedur wiederholt. Nun ist der Schnitt in allen drei Dimensionen des Raumes isotrop (Mayhew 1991, Mühlfeld et al. 2010).

Die Methode des „isectors“ ist für kleinere Proben geeignet. Hier wird die Probe in sphärischer Form in Agar gebettet, anschließend rollen gelassen und per Zufall zum Stoppen gebracht. Die Position, in der sich die Probe dann befindet, wird beibehalten und die Probe eingebettet. Alle zentralen Schnitte dieser Probe sind nun ebenfalls isotrop (Mühlfeld et al. 2010). Da die Gasaustauschregion der Lunge als isotrop anzusehen ist (Elias u. Hyde 1980, Weibel et al. 2006), entfielen diese Methoden in der vorliegenden Studie.

4.1.4 Datenerhebung: von 2D auf 3D schließen

Es stellt sich das Problem dar, dass in einem Schnitt eines dreidimensionalen Körpers eine Dimension aller im Schnitt vorhandenen Strukturen verloren geht. Sprich, es stellen sich Strukturen, die ein Volumen haben, also dreidimensional sind, im Schnitt als zweidimensionale Fläche, eine Fläche (2D) als Linie (1D), eine Linie (1D) als Punkt (0D) dar. Nun möchte man aber anhand der Schnitte Rückschlüsse auf die tatsächlichen Dimensionen der Strukturen ziehen. Die Stereologie bietet die Lösung für dieses Problem. Das Prinzip ist hierbei, dass die Dimension des beobachteten Objekts mithilfe eines Testsystems auf drei Dimensionen erweitert wird. D.h., wenn man ein Volumen (3D) messen möchte, so verwendet man dafür eine Punktzählmethode (0D). Eine Fläche (2D) ermittelt man mit einem Linientestsystem (1D), eine Länge (1D) ermittelt man mit einer Testebene (2D) und eine Partikelanzahl (0D) mit einem Testvolumen (3D). So ergibt sich aus der Dimension des Objektes und des Testsystems stets 3D (Howard u. Reed 2005, Hsia et al. 2010). Erhebungen in der Stereologie werden häufig in Form von Quotienten angegeben (Ochs 2006, Howard u. Reed 2005, Hsia et al. 2010). So werden keine Volumina und Flächen als solche erhoben, sondern Volumen- oder Oberflächendichten, d.h. Volumen oder Fläche in einem Referenzvolumen/einer Referenzfläche (Weibel 1979). Entsprechendes gilt für Längen

(Längendichte) und Anzahl (numerische Dichte). Bei diesen Werten ist es von höchster Wichtigkeit, den Referenzraum zu kennen (Howard u. Reed 2005). Viele Arbeiten früherer Zeit ergaben fehlerhafte Interpretationen, da sich die Autoren in ihren Aussagen auf die Dichten allein stützten. Die Volumendichte (im Falle dieser Studie Lb-Volumen pro μm^3 AE2-Zellvolumen) ist in ihrer Aussagekraft nicht gleichzusetzen mit dem absoluten Volumen (Lb-Volumen pro ganzer AE2-Zelle). Zwei verschiedene AE2-Zellen können also das gleiche Volumen an Lb beinhalten, ist die eine AE2-Zelle jedoch volumengrößer als die andere, so ist ihre Volumendichte an Lb kleiner, obwohl sie dasselbe tatsächliche Volumen an Lb beherbergt. Dies wurde von Braendgaard und Gundersen (1986) als Referenzfalle („reference trap“) bezeichnet. Angaben von Ergebnissen sollten also stets als Absolutwert erfolgen (Ochs 2006).

4.1.5 Lichtmikroskopie

Die alveoläre Oberfläche der in dieser Studie verwendeten Tiere wurde anhand eines Liniensystems ermittelt. Hierbei zeigt sich wieder das Vorgehen nach dem 3D-Prinzip. Eine Fläche (2D) wird mit einem Liniensystem (1D) ermittelt. Da dies eine Erhebung von 2D-Schnitten ist, die auf 3D-Eigenschaften schließen lässt, muss man sich folgendes Konstrukt im Raum vorstellen. Legt man ein Liniensystem, das in Reihen und symmetrisch angeordnet ist, in diesen Raum, so hängt die Häufigkeit, dass ein Objekt von der Linie geschnitten wird, von dessen Volumen und seiner Ausrichtung im Raum ab (Howard u. Reed 2005). Ein den Linien parallel angeordnetes Objekt wird weniger häufig geschnitten als ein zu den Linien orthogonal angeordnetes Objekt. D.h. die Beziehung zwischen Orientierung der Linien und Orientierung der Strukturen muss zufällig sein. Da, wie schon erwähnt, die Gasaustauschfläche der Lunge als isotrop anzusehen ist (Elias u. Hyde 1980, Weibel et al. 2006), also die Alveolen zufällig angeordnet sind, war ein Testsystem mit symmetrisch angeordneten Linien möglich. Ein symmetrisch angeordnetes Testsystem ist für den menschlichen Betrachter angenehmer anzuwenden (Elias u. Hyde 1980).

Beim Einsatz des „physical disectors“, bei dem zwei korrespondierende Schnitte miteinander verglichen werden, ist der größte Zeitaufwand mit dem Finden der korrespondierenden Sichtfelder gegeben (Sterio DC 1984, Howard u. Reed 2005). Der Einsatz des Olympus DX51 in Verbindung mit der newCAST-Software minimierte an dieser Stelle den Zeitaufwand. Die Vergrößerung, mit der gearbeitet wurde, betrug 40fach. Bei dieser Vergrößerung waren die AE2-Zellen und ihre Nucleoli sicher zu erkennen. Vorteilhaft gegenüber einer Vergrößerung von 100fach war, dass mit dem Testfeld des „disectors“ bei

40facher Vergrößerung mehr alveoläre Fläche betrachtet werden konnte als bei 100facher. Somit war die Anzahl der gezählten AE2-Zellen wie auch die daraus resultierende Präzision der Daten höher.

Der „physical disector“ hat folgendes Prinzip (Abb. 4.2). Jede Struktur hat nur eine obere Begrenzung. Werden nun zwei Schnitte bekannten Abstandes zueinander angefertigt und eine Struktur ist auf dem einen, aber nicht auf dem anderen Schnitt zu sehen, so ist davon auszugehen, dass eben jenes obere Ende innerhalb des Abstandes der Schnitte liegt. Damit ist gewährleistet, dass die Struktur nur einmal quantifiziert wird. Dieses Vorgehen macht die Methode des „physical disectors“ von Natur aus frei von systematischen Fehlern (Howard u. Reed 2005).

Disector

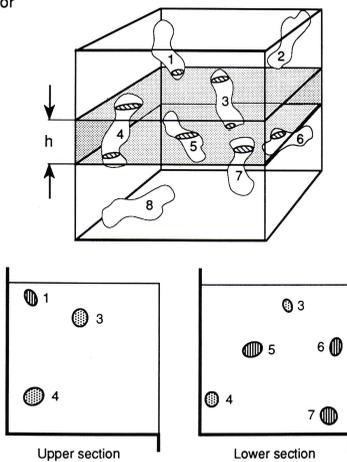


Abb. 4.2: Das „physical disector“-Prinzip. Man sieht, dass größere Objekte in beiden Schnitten wiederzufinden sind, während kleinere nur in einem Schnitt zu sehen sind. (vgl. Cruz-Orive u. Weibel 1990, Mandarin-de-Lacerda 2003)

Eine weitere „disector“-Methode, nämlich der „optical disector“ steht zur Verfügung. Der Unterschied zum „physical disector“ ist, dass hierbei nur ein Schnitt verwendet wird, der eine größere Schichtdicke besitzt und darin durch Verschiebung der mikroskopischen Fokusebene verschiedene Ebenen eingelegt werden. Dadurch werden optisch ebenfalls korrespondierende Schnitte geschaffen (West et al. 1991). Von dieser Methode wurde abgesehen, da einerseits die Struktur der Lungen, also die dünnen Alveolarsepten, für eine vielschichtige Fokussierung nicht geeignet ist und andererseits eine Vielzahl Möglichkeiten besteht, dass das Gewebe aufgrund des technischen Verfahrens homogen oder auch inhomogen verformt wird und es damit während der Untersuchung zu unkorrigierbaren Fehlern kommt (Dorph-Petersen et al. 2001).

4.1.6 Elektronenmikroskopie

Bei einer Vergrößerung von 4.646fach wurde die EM-Präparate mäanderförmig durchfahren, da bei dieser Vergrößerung das Erkennen einer AE2-Zelle anhand ihrer kuboiden Struktur und den Lb als Charakteristikum (Ochs 2010, Stone et al. 1992) zuverlässig möglich war und gleichzeitig eine ausreichende Fläche des Präparates entlang des Mäanders erfasst wurde. In den meisten Fällen konnte eine AE2-Zelle anschließend bei einer Vergrößerung von 7.750fach bildfüllend fotografiert werden. Auf EM-Basis fanden die Erhebungen der Volumina einiger Zellkompartimente, insbesondere der Lb statt. Volumina (3D) werden auf stereologischer Basis mit Punkttestsystemen (0D) erhoben (Elias u. Hyde 1980, Cruz-Orive u. Weibel 1970). Das hier verwendete Testsystem war ein Punktlinientestsystem, also symmetrisch in Reihen angeordnete Linien, deren Enden als Punkte betrachtet werden. Die Kombination erlaubt die gleichzeitige Erhebung von Oberfläche (2D mit 1D-Linien) und Volumen (Weibel 1970). Auch hier ist ein gedankliches Konstrukt im Raum hilfreich. Legt man ein Punkteraster in einen Raum, so ist die Anzahl der Punkte, die auf die Objekte im Raum treffen allein dadurch definiert, wie groß das Volumen der Objekte ist (Howard u. Reed 2005). D.h. ein großer Nukleus wird mehr Punkte in sich bergen als ein kleines Mitochondrium. Eine Isotropie muss demnach bei der Erhebung von Volumina nicht vorliegen. Mit dem kombinierten Testsystem wurde zeitgleich auch die mittlere Oberfläche der Lb bestimmt, um später die Volumen-Oberflächen-Beziehung errechnen zu können, welcher ein guter Indikator für die tatsächliche Größe eines Objektes ist (Weibel 1970).

Das mit dem EM erhobene volumengewichtete mittlere Volumen verhält sich am Beispiel der hier untersuchten Lb wie folgt im Gegensatz zum anzahlgewichteten. Wenn viele kleine Lb gefunden werden und nur wenige große, so ist das anzahlgewichtete Volumen der Lamellekörper kleiner Größe höher als das der großen Lb, bloß aufgrund ihrer höheren Anzahl. Wird jedoch dem tatsächlichen Volumen der Lb Rechnung getragen, so misst man den wenigen großen Lb proportional ebenso viel Gewicht bei wie den vielen kleinen. (Howard u. Reed 2005, Abb. 2.7). Dies stellt das volumengewichtete mittlere Volumen dar (Howard u. Reed 2005). Das volumengewichtete mittlere Volumen wird mit der „point-sampled intercept“ Methode ermittelt, die in *Material und Methoden* beschrieben ist. Dieses Verfahren kann nur an isotropen Proben stattfinden und ist frei von systematischen Fehlern (Howard u. Reed 2005, Mayhew 1991).

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Die Physiologie der Lunge

Einer der offensichtlichsten Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies landlebender Säugetiere ist das Körpergewicht, welches von wenigen Gramm bis zu mehreren Tonnen variiert. Das Körpergewicht ist die Grundlage für allometrische Erhebungen. Allometrie ist die Methode zur Darstellung von Beziehungen verschiedener physiologischer und struktureller Parameter mit dem Körpergewicht. So findet sich bei Landsäugetieren eine Spannweite des Körpergewichts in der Größenordnung von sechs Potenzen. Entsprechende Unterschiede, die zwischen den Spezies bestehen, erfordern Anpassungen, die den physiologischen Erfordernissen entsprechen. Diese Anpassungen finden sowohl auf struktureller als auch funktioneller Basis statt. Funktioneller Natur sind zum Beispiel die im Vergleich zu großen Säugern bei kleineren Säugern auftretende Erhöhung der Atem- und Herzfrequenz resultierend aus dem erhöhten Grundenergiebedarf pro Einheit Körpergewicht (Stahl 1967). Die Atem- und Herzfrequenz stehen hierbei mit dem Körpergewicht M in der Weise $M^{1/4}$ in Beziehung (Stahl 1967, Schmidt-Nielsen 1972, Lindstedt u. Calder 1981, Lindstedt 1984). Die O_2 -Diffusionskapazität der Lunge D_{LO_2} , also die Fähigkeit der Lunge, in einer gewissen Zeit eine Einheit Sauerstoff von der in den Alveolen befindlichen Luft durch die Alveolarsepten ins kapilläre Blut zu transportieren, ist dem Fick'schen Diffusionsgesetz unterworfen:

$$D_{LO_2} = S(\text{alv}) \cdot 1/\tau \cdot \Delta P_{O_2} \cdot K, \quad (\text{Formel 8})$$

wobei $S(\text{alv})$ die alveoläre Oberfläche, τ die Dicke der Luft-Blut-Schranke, ΔP_{O_2} der Partialdruckunterschied für Sauerstoff zwischen der alveolären Luft und dem kapillären Blut und K der Diffusionskoeffizient für Sauerstoff durch das Gewebe, welches die Luft-Blut-Schranke bildet, darstellt. Weibel (2009) verfeinerte die Formel.

$$D_{LO_2} = [S(\text{alv}) + S(\text{cap})]/2 \cdot 1/\tau \cdot \Delta P_{O_2} \cdot K, \quad (\text{Formel 9})$$

wobei $S(\text{cap})$ die kapilläre Oberfläche ist, die etwa 10% weniger Fläche hat als die alveoläre Oberfläche (Gehr et al. 1981) und deshalb aus beiden ein Mittelwert gebildet werden muss, um die tatsächliche Gasaustauschfläche zu erhalten.

Neben dem Lungenvolumen und der alveolären Oberfläche (Stone et al. 1992) steigt die O_2 -Diffusionskapazität proportional zum Körpergewicht bei kleinen im Vergleich zu großen

Säugetern an (Gehr et al. 1981). Dies trotz einiger Faktoren, von denen anzunehmen ist, dass sie die O₂-Diffusionskapazität beeinflussen. Zum einen wäre die stark verkürzte Zeit zu nennen, in der das in der Lunge zirkulierende Blut Kontakt mit der Luft-Blut-Schranke hat (Lindstedt 1984, Weibel et al. 1981). Zum anderen wurde in der Arbeit von Weibel et al. (1981) aufgezeigt, dass unterschiedliche ΔP_{O_2} -Werte in den Alveolen von proximal nach distal bei größeren Lungen auftauchen (Weibel et al. 1981). Die veränderten ΔP_{O_2} -Werte sind erklärbar dadurch, dass in den distalen Regionen größerer Lungen nur noch Luft ankommt, bei der schon Gasaustausch stattgefunden hat und die demnach weniger O₂ beinhaltet. Somit wird der durchschnittliche O₂-Gehalt dieser Luft gesenkt, so ebenfalls ΔP_{O_2} (Weibel et al. 1981). Als Kompensationsmechanismus findet sich in diesen Regionen niedrigen Sauerstoffpartialdruckunterschieds eine größere Diffusionskapazität. Dieser Mechanismus ließ sich auch nachweisen, indem Ratten am 23. Tag nach ihrer Geburt auf ihre Diffusionskapazität hin untersucht und in drei Gruppen unterteilt wurden. Die erste Gruppe stellte die Kontrollgruppe, die unter normalen Laborbedingungen lebten (Barometerdruck ~713 torr, P_{O₂} ~150 torr), die zweite Gruppe wuchs in den Berner Alpen auf (3.450 m Höhe, mittlerer Druck 497 torr, P_{O₂} ~100 torr) und die dritte Gruppe in einer O₂-Kammer unter 40% Sauerstoff und 60% Stickstoff (Druck: 730 torr, P_{O₂} ~290 torr). Am 44. Tag nach ihrer Geburt wurden die Ratten erneut auf ihre Diffusionskapazität hin untersucht. Das Ergebnis war eine aus den morphometrischen Daten errechnete erhöhte Diffusionskapazität bei den Ratten der Gebirgsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe (120%) und eine reduzierte Diffusionskapazität bei den O₂-Kammer-Ratten gegenüber der Kontrollgruppe (85%) (Burri u. Weibel 1971). Andererseits adaptiert sich die Diffusionskapazität der Lunge auch an verloren gegangenes Gewebe. Es zeigte sich zum Beispiel zwei Jahre nach 40%iger Pneumektomie beim Hund, dass er dennoch 70%, nicht die erwarteten 60% restliche Diffusionskapazität besaß, gemessen an der Diffusionskapazität für CO, da CO über eine höhere Affinität für Hämoglobin verfügt und damit sensitiver zu untersuchen ist (Hsia et al. 1993, Hsia 2006). Dieses Ergebnis ist weiterhin bemerkenswert, da die Kapillaren zwar größer wurden, da das verminderte Volumen des Lungenkapillarbetts den gesamten Blutfluss der Lunge aufnehmen musste, jedoch keine Gewebevermehrung stattfand (Hsia et al. 1993, Hsia et al. 2004). Darüber hinaus ist interessant zu erwähnen, dass sesshafte Spezies, wie zum Beispiel die Ziege, über eine Diffusionskapazität verfügen, die höher ist, als der unter Vollbelastung maximale O₂-Konsum benötigt. Dies könnte als Sicherheitspuffer angesehen werden, der das Anpassen an verschiedene Lebensbedingungen ermöglicht (Weibel 2000). Die Diffusionskapazität hängt aber auch maßgeblich von der Diffusionsbarriere, insbesondere ihrer Fläche und Dicke ab

(Fick'sches Diffusionsgesetz). Surfactant als oberflächenaktives Agens (Griese 1999), das von AE2-Zellen produziert, gespeichert, per Exozytose sezerniert und nach Wiederaufnahme recycelt wird (Dietl 2005, Ryan 1975, Castranova et al. 1988, Fehrenbach 2001) und der alveolären Oberfläche aufliegt, hat folglich einen Anteil an der Diffusionsbarriere. Zu diskutieren ist also, ob der Surfactantfilm an der Variabilität der Diffusionskapazität beteiligt ist. Gil und Weibel (1969) waren der Ansicht, dass der Surfactantfilm, da er lediglich 3 bis 5% der Gesamtdicke der Diffusionsbarriere ausmacht, zu vernachlässigen sei. Doch es wurde gezeigt, dass eine lipidhaltige Oberfläche, wie Membranen sie sind, ohne Surfactantbeschichtung langsamere Diffusionszeiten für Sauerstoff aufweisen, als wenn ein dichter Surfactantfilm aufliegt (Olmeda et al. 2010). Der genaue Mechanismus wird noch weiterer Forschung bedürfen. Diskutiert werden allerdings von Surfactantproteinen geformte Membranporen, die die Sauerstoffdiffusion zwischen zwei angrenzenden Membranen erleichtern (Olmeda et al. 2010). Aber nicht nur von der Umwelt, sondern auch von den körpereigenen physiologischen Parametern hängt die morphologische Struktur der Lunge ab. Gelhaar und Weibel (1973) konnten nämlich zeigen, dass die japanische Tanzmaus gegenüber der Labormaus einen um 80% erhöhten Sauerstoffbedarf hat. Dieser erhöhte Sauerstoffbedarf spiegelt sich darin wieder, dass die Tanzmaus kleinere und mehr Alveolen besitzt, die eine um 60% größere alveoläre und kapilläre Fläche und eine signifikant dünnere Luft-Blut-Schranke besitzen. Auch bei größeren Spezies wie dem Hund konnten ähnliche Anpassungen beobachtet werden (Siegwart et al. 1971). Alles in allem zeigt dies, dass die Lunge keineswegs ein statisches Organ ist und sich vielmehr an die Bedürfnisse und Lebensumstände eines Organismus anzupassen vermag. Dies entspricht der Idee der „Symmorphosis“ (Taylor u. Weibel 1981, Weibel 2000).

4.2.2 Unterschiede der Meeres- und Landsäuger

In weiteren Untersuchungsreihen belegten Weibel und Mitarbeiter (Gehr et al. 1981, Taylor u. Weibel 1981, Weibel 1972, Weibel et al. 1987) verschiedene allometrische Beziehungen einiger weiterer pulmonaler Strukturen, die für die Funktion als Gasaustauscher von Bedeutung sind. Auf ihren Ergebnissen beruhend ist auf Basis der Gleichung $y = aM^b$ der Exponent b für den maximalen Sauerstoffverbrauch kleiner als für die pulmonale Diffusionskapazität und für die alveoläre Oberfläche (Weibel 1981, Weibel 2000). Das heißt, mit zunehmendem Körpergewicht nimmt der maximal mögliche Sauerstoffverbrauch weniger stark zu als die Diffusionskapazität oder die Gasaustauschfläche der Alveolen. Dabei verhält sich der maximale Sauerstoffverbrauch zum Körpergewicht M mit $M^{0.81}$ (Weibel et al. 1981,

Taylor et al. 1981), Diffusionskapazität (Gehr et al. 1981) und alveoläre Oberfläche mit jeweils M^l (diese Arbeit, Weibel 1981). In einer älteren Studie (Tenney u. Remmers 1963) findet sich jedoch eine andere Aussage. Hier beschreiben die Autoren, dass der Exponent b für maximalen Sauerstoffverbrauch dem für die alveoläre Oberfläche gleich war. Der diskutierte Grund (Gehr et al. 1981) für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass in der Arbeit von Tenney u. Remmers Meeressäuger als Spezies der großen Gewichtsklassen verwendet wurden. Diese verfügen aber über deutlich andere Lebensbedingungen. Sie besitzen einen wesentlich niedrigeren O_2 -Bedarf, halten die Luft für mehrere Minuten an, ehe sie Atem schöpfen und sind unter Wasser höheren Außendrücken ausgesetzt (Gehr et al. 1981). Auch aufgrund anatomischer Unterschiede können systematische Fehler entstanden sein. Denn Meeressäuger besitzen wesentlich größere Alveolen, die mit einem erhöhten Blutfluss versorgt werden (Gehr et al. 1981). Dies geschieht bei den in der Studie verwendeten Meeressäugern über eine Doppelschicht Kapillaren in den alveolären Septen (Fanning u. Harrison 1974). Interessanterweise präsentieren unmittelbar postnatale menschliche Lungen auch eine Doppelschicht Kapillaren, die sie jedoch im Laufe der Entwicklung verlieren (Zeltner u. Burri 1986). Gehr et al. (1981) zeigten daher, dass der Fehler behoben werden kann, schließt man aus den Berechnungen die Meeressäuger aus. Dies führte zu einer entsprechenden Angleichung der Regressionsgeraden an die Regressionsgerade, gezeichnet anhand der Daten von Weibel (2000) unter den Landsäugetieren und zeigte darüber hinaus zwischen den Meeressäugern eine eigene, tiefer liegende Regressionsgerade und damit eine eigene Beziehung, die sich signifikant von der der Landsäugetier unterscheidet (Gehr 1981). Entsprechend dieser Erkenntnis schloss man in der hier vorliegenden Studie lediglich landlebende Säugetiere ein.

4.2.3 Eine dünne Schicht Surfactant

Diese Studie beschäftigte sich mit einem weiteren für den Gasaustausch wichtigen System - dem Surfactantsystem der Säugetierlunge. Untersucht wurde dabei das intrazelluläre Gesamtvolumen pulmonalen Surfactants, morphologisch definiert als das Gesamtvolumen der Speicherstätten, also der Lb (Askin u. Kuhn 1971, Gil u. Reiss 1973). Die Untersuchung sollte eine Antwort auf die Frage bringen, ob besagtes Gesamtvolumen mit der alveolären Oberfläche in Beziehung steht oder ob andere Parameter, von denen man weiß, dass sie die Surfactantbiologie beeinflussen, wie zum Beispiel die Atemfrequenz, das Surfactantvorkommen regulieren. Die Ergebnisse zeigen, dass die Steigung, also der Exponent b der allometrischen Gleichung $y = aM^b$ für die alveoläre Oberfläche $[S_A]$ und das

Gesamtvolumen der Lb [$V_{\text{ges}}(\text{Lb}, \text{lung})$] im Vergleich ähnlich verlaufen. Darüber hinaus besteht keine Korrelation zwischen Lb-Volumen pro Einheit alveolärer Oberfläche und Körpergewicht. Das heißt, dass ein relativ konstantes Lb-Volumen pro Einheit alveolärer Oberfläche mit einer Spannweite von 6 bis 22 mm^3/m^2 zu finden war. Diese Spannweite erscheint zunächst als groß. Doch man sollte in Betracht ziehen, dass die Studie Tiere umfasste, die ein unterschiedliches Körpergewicht in der Größenordnung von fünf Potenzen aufwiesen, deren Lebensbedingungen verschieden und deren Alter im Falle der wilden Tiere unbekannt war. Die Spannweite von 6 bis 22 mm^3/m^2 kann bei dieser Heterogenität zwischen den untersuchten Spezies durchaus als klein angesehen werden. Eine Arbeit um Clements et al. (1970) bestätigt anhand biochemischer Analysen, gewonnen aus Homogenaten elf verschiedener Spezies, diese Ergebnisse. Auch in den Lungen postnataler Ratten fand man ab Tag vier ähnliche Werte (Vidic u. Burri 1981). Hier zeigten sich Werte von 22 mm^3/m^2 an Tag vier und 23 mm^3/m^2 an Tag 21. Schmiedl et al. (2007) berichteten über ein Gesamtvolumen der Lb bei adulten Ratten von 5,16 mm^3 , ähnlich einem von uns erhobenen Wert von 5,34 mm^3 . Bezogen auf die alveoläre Oberfläche von 0,45 m^2 erhält man mit dem Wert von Schmiedl et al. ein Ergebnis von $\sim 11,5 \text{ mm}^3/\text{m}^2$, welcher in der zuvor genannten Spannweite liegt und damit dem hier vorliegenden Ergebnis, zumindest für die Ratte, ähnlich ist. Dass nur so geringe Lb-Volumina pro Quadratmeter alveolärer Oberfläche zur Verfügung stehen, könnte dadurch erklärt werden, dass die Halbwertszeit für Surfactant vier bis elf Stunden beträgt (Young et al. 1981, Wright u. Clements 1987) und damit keine übermäßig hohe Surfactantproduktion und -speicherung nötig ist.

4.2.4 Allometrie der postnatalen Entwicklung

Einige allometrische Beziehungen während der Entwicklung postnataler Lungen laufen in Episoden ab. So zum Beispiel die Zunahme der Lungenvolumina. Während bei der Ratte das spezifische Lungenvolumen, das heißt das Lungenvolumen pro Körpergewicht, in den ersten zehn Tagen postnatal relativ konstant blieb, nahm es von Tag zehn bis Tag 131 um $\sim 60\%$ ab (Burri et al. 1973, Schmiedl et al. 2007). Allometrisch ausgedrückt, war der Exponent b der Gleichung $y = aM^b$ in der ersten Phase der Entwicklung der Rattenlunge 1 und später 0,7. Beim Menschen hingegen findet sich ein ähnliches Bild. In einer Arbeit von Zeltner et al. (1986) wurden die Lungen von sieben, zumeist an Hirnverletzung oder -infektionen verstorbenen Kindern im Alter zwischen 26 Tagen und 64 Monaten untersucht. Die Lungenvolumina wurden über die Wasserverdrängungsmethode Lappen für Lappen erhoben (Zeltner et al. 1986). Das spezifische Lungenvolumen stieg im Vergleich zwischen dem ersten

Lebensmonat (ein Monat) und dem sechsten Lebensjahr (fünf Jahre, vier Monate) um ~18% an. Hier war b also zunächst ~1,14 und später 1 (siehe auch Stahl 1967). Ab diesem Zeitpunkt, also mit etwa fünf Jahren, verfügte der Patient über ein der adulten Lunge vergleichbares spezifisches Lungenvolumen von etwa 59 ml/kg (Zeltner et al. 1986). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Ausbildung der Alveolen zu einem wesentlichen Teil erst postnatal stattfindet. Diese Vermutung wird unterstützt durch Erhebungen von anderen Autoren, die die Anzahl der Alveolen bei Neugeborenen und Kindern angaben (Davies u. Reid 1970). Beim Neugeborenen finden sich um die 50 Millionen (Langston et al. 1984), während der Erwachsene über ~480 Millionen verfügt (Ochs et al. 2004a).

Im Vergleich dazu zeigt auch die Volumendichte der Lb innerhalb der AE2-Zelle in Bezug zum Körpergewicht ein ähnliches Phänomen, trägt man die Werte der Arbeit von Schmiedl et al. (2007) gegeneinander auf. Während die Volumendichte der Lb der AE2-Zellen der Ratte bei den ersten beiden Messpunkten Tag eins und Tag sieben post partum eine steile Zunahme zeigen, flacht die Steigung im Vergleich der Messpunkte Tag 14 und Tag 42 pp stark ab. Massaro et al. (1986) zeigten, dass die Volumendichte der Lb prä- und perinataler Rattenlungen stark ansteigt, während die Volumendichte der AE2-Zellen sinkt. Diese Daten sind jedoch aufgrund der „Referenzfalle“ (Braendgaard und Gundersen 1986) mit Vorsicht zu bewerten. Denn weder wurden von den Lamellenköpervolumina, noch von den AE2-Zellvolumina (als Referenzvolumen für die Lb-Volumendichte) Absolutwerte angegeben, die einen tatsächlichen Vergleich ermöglichen. Doch stichhaltig konnten Massaro et al. (1986) zeigen, dass das Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Lb ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) perinataler Ratten bis ins adulte Alter nahezu konstant bleibt. Die Studie gab Werte um $5 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ an, welche ähnlich dem in der hier vorliegenden Studie erhobenen Wert für die Ratte von $4,1 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ sind. Die spätere Studie von Schmiedl et al. (2007) zeigte, dass der Quotient zwischen Lb-Volumen und intraalveolären Phospholipiden, gewonnen aus Lungenlavageflüssigkeit, während der postnatalen Entwicklung der Rattenlunge von $0,47 \text{ mm}^3/\mu\text{mol}$ am Tag eins auf $2,74 \text{ mm}^3/\mu\text{mol}$ am Tag 42 ansteigt. Diese Veränderungen werden korrespondierend begleitet von Konzentrationssteigerungen des Surfactantproteins A im Verlauf der Entwicklung (Schmiedl et al. 2007).

4.2.5 *Symmorphosis*

Diese Darstellung perinataler Entwicklungsvorgänge zeigt, dass einige Beziehungen innerhalb einer Spezies eher von Organentwicklung, also Ontogenetik abhängen, statt allometrischer Natur zu sein. Dass hingegen allometrische Beziehungen in der Entwicklung

eines Säugetieres unterschiedlich sein können gegenüber allometrischen Beziehungen zwischen verschiedenen Säugetieren zeigte Wieser (1984) in seiner Untersuchung über den Energieumsatz. Hier konnte er beobachten, dass ein neugeborenes Säugetier innerhalb weniger Stunden post partum einen vergleichbaren Energieumsatz hatte wie ein adultes Tier einer kleineren Gewichtsklasse. Anschließend stieg der Energieumsatz im weiteren Verlauf der Entwicklung in Bezug zum Körpergewicht mit dem Exponenten $b = 1$, um ab einem kritischen Alter (Mensch 18 Monate, Rind sechs Monate, Ratte drei Wochen) mit $b = 2/3$ weiterzugehen. Dies unterscheidet sich deutlich von den Vergleichen zwischen verschiedenen Spezies, bei denen b bezüglich des Energieumsatzes $3/4$ beträgt (Kleiber 1947, Lindstedt u. Schaeffer 2002).

In Anbetracht dieser Daten gilt zu beachten, dass in der vorliegenden Studie die Beziehung des intrazellulär gespeicherten Surfactantvorkommens mit der alveolären Oberfläche interspezifisch untersucht wurde. Eine enge Beziehung der beiden Parameter war gemäß des Konzepts der „Symmorphosis“ (Taylor u. Weibel 1981) zu beobachten. D.h. die Surfactantproduktion ist auf die Fläche des Alveolarepithels abgestimmt, nicht direkt auf die Größe beziehungsweise das Körpergewicht der Spezies, was dadurch unterstrichen wird, dass von den beiden Spezies Rind und Pferd erstere die schwerere ist, letztere jedoch mehr AE2-Zellen in der Lunge aufweist – eben korrelierend zur wesentlich größeren alveolären Oberfläche. Ein in Hinblick auf die Entwicklung des Organismus intraspezifischer Vergleich konnte anhand der Tiere, die allesamt adult waren, jedoch nicht angestellt werden. Lediglich anhand besagter adulter Tiere wurde ein Versuch unternommen, die Daten intraspezifisch in Beziehung zu stellen. Jedoch konnte hierbei keine Korrelation gesehen werden. Es sei also darauf hingewiesen, dass eine klare Unterscheidung allometrischer Beziehungen *intraspezifisch* und *interspezifisch* von großer Wichtigkeit ist. Weiterhin ist von diesen Daten folgendes abzuleiten. Da das intrazellulär gespeicherte Surfactantvorkommen mit der alveolären Oberfläche korreliert, die Volumina der AE2-Zellen und die Volumenfraktionen von Lb innerhalb der AE2-Zellen jedoch nicht sehr stark variieren, ist anzunehmen, dass bei größeren Tieren die größere Menge an Surfactant lediglich mit einer erhöhten Anzahl an AE2-Zellen sichergestellt wird.

4.2.6 Surfactant und Oberflächenspannung

Während die Eingangsfrage dieser Studie beantwortet wurde, ob das Surfactantvorkommen an die alveoläre Oberfläche angepasst ist, sind folgende Ergebnisse bemerkenswert. Obwohl sowohl die Alveolen im Vergleich von Hunden, Ziegen, Ponies und Kälbern (Weibel 1987),

als auch im Vergleich von Sunis (afrikanischer Säuger mit ~3,5 kg Körpergewicht) und Gnus (~100 kg) (Gehr et al. 1981) trotz unterschiedlicher Körpergrößen und -gewichte in etwa gleich groß sind, ist es Fakt, dass Mauslungen über kleinere Alveolen verfügen als Menschenlungen. Denn die alveoläre Oberfläche der menschlichen Lunge ist ~1.000fach größer als die der Mauslunge, und gleichzeitig ist die Anzahl der Alveolen, die diese Oberfläche bereitstellen, nur 60 Mal größer in der menschlichen Lunge im Vergleich zur Mauslunge (Ochs et al. 2004a, Knudsen et al. 2009). Dies entspricht der von Mercer et al. (1994) beschriebenen allometrischen Beziehung der Alveolenzahl von $M^{0.59}$. Es ist also davon auszugehen, dass die Alveolen der Maus wesentlich kleiner sind als die des Menschen. Analog dazu findet sich eine Studie, die zeigte, dass Unterschiede in den Alveolengrößen unabhängig vom Körpergewicht bestehen. So haben etwa Katzen größere Alveolen als Hunde und im Gegensatz dazu haben Schafe in etwa gleich große Alveolen wie Ratten (Lum u. Mitzner 1987). Weibel (1967) vermutete, dass die Größe der Alveolen vielmehr als vom Körpergewicht davon abhängt, wie viel alveoläre Oberfläche für die Bedürfnisse des Organismus benötigt wird. Da die Alveolen eine nahezu sphärische Form haben (Clements et al. 1958, Mead 1957, Mercer et al. 1994), besitzen sie nach dem Gesetz von LaPlace an der Luft-Flüssigkeitsgrenze eine Oberflächenspannung (Clements et al. 1958, Mead et al. 1957), die mit abnehmendem Radius, daraus resultierender stärkerer Krümmung und kleinerer Oberfläche (Clements 1957) zunimmt. Daraus folgt die Annahme, dass die Oberflächenspannung bei den kleinen Alveolen der Maus, die mit stärkerer Krümmung vergesellschaftet ist, größer ist als bei den größeren Alveolen des Menschen. Ein Vergleich zwischen den kleinen Alveolen der Maus und den im Durchmesser bis zu viermal größeren Alveolen des Schweins zeigte, dass sowohl die Stabilität der Alveolen nach Ausatmung als auch die Oberflächenspannung trotz der Körpergewichtsspannweite von 0,03 und 50 kg ähnlich waren (Lum u. Mitzner 1987). Surfactant setzt die Oberflächenspannung der Alveolen unter Druck effizient in einen Bereich nahe 0 dyn/cm (Schürch et al. 1978, Wirtz u. Schmitz 1992). Diese Eigenschaften werden den Interaktionen zwischen den zweifach gesättigten Phospholipiden (PL) mit den ungesättigten PLs und Cholesterin zugeschrieben (Daniels u. Orgreig 2003). Hierbei ist vor allem das im Surfactant am höchsten konzentrierte (Clements et al. 1970) Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) als Hauptbestandteil der spannungssenkenden Komponenten zu nennen (Veldhuizen et al. 1998). Darüber hinaus gewährleistet Surfactant die Stabilität der Alveolen (Mendenhall u. Mendenhall jun. 1964, Reifenrath u. Zimmermann 1973, Clements et al. 1970, Pattle 1955). Deshalb muss man die Frage stellen, ob kleinere Säugetiere mit entsprechend kleineren Alveolen mehr Surfactant

pro Einheit alveolärer Oberfläche benötigen. Dabei muss jedoch eine klare Trennlinie zwischen oberflächenaktivem, intraalveolärem Surfactant und intrazellulär in Lb gespeichertem Surfactant gezogen werden (Ochs 2010). Denn der intraalveoläre Surfactantfilm, um den es bei dieser Überlegung geht, ist nicht gleichzusetzen mit dem intrazellulär gespeicherten Surfactant. Das heißt, dass zwar die Möglichkeit besteht, dass die Relation zwischen intraalveolärem und intrazellulärem Surfactant zwischen verschiedenen Spezies unterschiedlicher Körpergröße differiert, dieser Theorie in der hier vorliegenden Studie jedoch nicht nachgegangen werden konnte. Der Grund dafür war die Fixiermethode: die Luftweginstillation mit Glutaraldehyd, die das intraalveoläre Surfactant unvorhersagbar transloziert hat. Dieses Problem zeigte sich bereits in einer Studie von Kapanci et al. (1972), die versuchten, auf Basis dreier menschlichen Lungen, die mit Glutaraldehyd über den Luftweg fixiert wurden, das alveolare Surfactant zu beschreiben. Die Literatur zeigt aber, dass nach bronchoalveolärer Lavage von Maus, Ratte, Kaninchen und Hund die intrazelluläre Surfactantkonzentration zwei bis dreimal größer war, als die Konzentration des Surfactants intraalveolär, gemessen anhand der Phosphatidylcholinkonzentration in Lavageflüssigkeit (Gail et al. 1978). Im Gegensatz dazu zeigten spätere Studien, dass zumindest bei Ratten das intraalveoläre Surfactantvorkommen das intrazelluläre übersteigt (Young et al. 1981). Auch dieser Quotient könnte dadurch zu erklären sein, dass die Umsatzzeit des Surfactants vier bis elf Stunden beträgt (Young et al. 1981, Wright u. Clements 1987) und darüber hinaus das intraalveoläre Surfactant reabsorbiert und recycelt wird (Fehrenbach 2001), wodurch das geringe Volumen an intrazellulär gespeichertem Surfactant ausreicht, das intraalveoläre zu speisen.

4.2.7 Surfactant unter pathologischen Zuständen

Die bisher gezeigten Daten und aufgeführten Vergleiche bezogen sich auf primär gesunde Lungen, die die physiologischen Eigenschaften und Morphometrie des Gasaustauschapparates verdeutlichen. Verschiedene akute und chronisch krankhafte Zustände der Lunge wirken sich auf die AE2-Zellen und ihre Lb aus. Aber auch andersherum, also Störungen der Surfactantproteine (deMello et al. 1989) oder der Lb-Synthese münden in schwere respiratorische Krankheiten (Seeger et al. 1990, Ochs 2010). Dies ist schon aufgrund der Tatsache, dass Surfactant an der Abwehr von Schäden durch Mikroorganismen (O'Neill 1984, Juers et al. 1976), Partikeln (Wallace et al. 1985) und toxischen Substanzen wie Sauerstoffradikale (Cross 1974, Crapo et al. 1980) beteiligt ist, anzunehmen. Auf AE2-Zellebene sind die Reaktionen als Hyperplasie und Hypertrophie zu erkennen (Miller u Hook

1990). Störungen der Lb-Synthese können in zwei Klassen unterteilt werden: 1.) Unterentwicklung, also zu kleine Lb und 2.) Überentwicklung, also zu große Lb (Ochs 2010). Beispiele für Unterentwicklung sind der angeborene Surfactant-Protein B-Mangel (Nogee et al. 1993, DeMello et al. 1994, Clark et al. 1995), oder der ABCA3-Mangel (Shulenin et al. 2004, Fitzgerald et al. 2007, Ban et al. 2007, Hammel et al. 2007). ABCA-Proteine sind beteiligt am Transport von Lipiden zu Lb und Translokation vom Zytoplasma ins Lumen der Lb (Weaver et al. 2002). Überentwicklung von Lb können, neben Anderem, aufgrund von Surfactant-Protein-D-Mangel (Botas et al. 1998, Ochs et al. 2004b), welcher als AE2-Zellhypertrophie kombiniert mit Hyperplasie in Erscheinung tritt (Knudsen et al. 2007) oder lysosomalen Erkrankungen wie dem Hermannsky-Pudlak Syndrom (Chi et al. 1976, Guttentag et al. 2005, Nakatani et al. 2000) auftreten. Die übermäßige Lb-Synthese, die auch bei Einatmung von Lungengiften gesehen wird, ist effizienter bei Hypertrophie der AE2-Zellen als bei Hyperplasie (Miller u. Hook 1990). Die in der hier vorliegenden Studie erhobene Spannweite von ~70-100 μm^3 /Zelle der Werte für die mittleren Lb-Volumina pro AE2-Zelle wurde übertroffen von den Werten des Hundes (~120 μm^3 /Zelle) und der Menschen (~147 μm^3 /Zelle), was dahingehend zu erklären wäre, dass diese Spezies in Städten besonders hohen Konzentrationen an Lungengiften, wie Autoabgasen, ausgesetzt sind. Einen weiteren Hinweis auf diesen Mechanismus liefert eine Arbeit von Stone et al. (1992), die zeigte, dass der Quotient zwischen Alveolarepithelzellen Typ II und Typ I beim Menschen höher ist als bei vielen anderen Säugetieren. Dass Lb durch lysosomale Erkrankungen betroffen sind erklärt sich durch ihre Ähnlichkeit zu Lysosomen. Sie haben entsprechend zu Lysosomen im Lumen einen sauren pH4,5, lysosomale Enzyme (z.B. saure Phosphatase, Cathepsin C&H) und Proteine (z.B. CD63/LAMP3 und LAMP 1), weshalb sie auch als lysosomartige Organellen bezeichnet werden (Weaver et al. 2002, Schmitz u. Müller 1991).

4.2.8 Atemfrequenz und Surfactant-Zusammensetzung

Darüber hinaus wurde eine Hypothese aufgestellt, dass als physiologischer Beeinflussungsfaktor des Surfactantvorkommens neben der in der hier vorliegenden Studie deutlichen Abhängigkeit von der alveolären Oberfläche, respektive des Körpergewichts, die Atemfrequenz in Frage kommt. Die aufgeführten Daten zeigen, dass zur Atemfrequenz eine negative Korrelation für die Anzahl der AE2-Zellen, das Gesamtvolumen der Lb und die alveolären Oberfläche zu sehen war. Dies ist auf die bereits zuvor genannte allometrische Beziehung der Atemfrequenz mit $M^{-1/4}$ zurückzuführen. Bestätigung dieser Hypothese finden sich in quantitativen Analysen der Fraktionen der Surfactantbestandteile Dipalmitoyl-

Phosphatidylcholin (DPPC), Palmitoylmyristoyl-PC (PMPC) und Palmitoylpalmitoleoyl-PC (PPPC) verschiedener neugeborener und erwachsener Spezies. Hier zeigte sich, dass die Lipidzusammensetzung des Surfactant vom Entwicklungsstadium der Lunge, der Atemfrequenz (Bernhard et al. 2001) und der Spezies (Lang et al. 2005) abhängt. Bernhard et al. (2001) zeigte anhand von Phospholipidfraktionsanalysen in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit, dass bei Mäusen, Ratten und Schweinen die Konzentration sowohl von PMPC als auch von PPPC bei den hohen Atemfrequenzen von acht Tage alten Individuen gegenüber der niedrigen Atemfrequenz adulter Tiere höher war, DPPC hingegen war schwächer konzentriert. Interessanterweise wurde in der Vergangenheit auch schon eine gute Korrelation zwischen DPPC-Konzentration im gesamten Lungengewebe und alveolärer Oberfläche beobachtet, wobei sich darüber hinaus herausstellte, dass andere Phospholipide nicht mit der alveolären Oberfläche korrelierten (Clements et al. 1970, Gail et al. 1978). Diese Daten unterstützen die zuvor dargelegte Annahme, dass ein relativ konstantes Surfactantvolumen sowohl intraalveolär als auch intrazellulär pro Einheit alveolärer Oberfläche zur Verfügung steht, die variierenden Phospholipidspeziesfraktionen jedoch deutlich von der Unterschiedlichkeit physiologischer Bedürfnisse abhängt (Lang et al. 2005).

4.2.9 Klinisch-therapeutische Relevanz

Aus der klinischen Perspektive erklärt das einerseits, wie die Mortalität Neugeborener mit infantilem akut respiratorischem Distress-Syndrom (ARDS) durch die Therapie von exogen zugeführtem Surfactant um 50% gesenkt werden konnte (Long et al. 1991), da hierbei in den Lungen der Neugeborenen ein primärer Mangel an Surfactant und Surfactantprotein A besteht (Pattle et al. 1962, Grünwald 1964, Haagsman u. Diemel 2001, Schmitz u. Müller 1991). Und andererseits, warum bei einer Vielzahl von Lungenerkrankungen der therapeutische Versuch mit Surfactant, wie ARDS des Erwachsenen (Spragg et al. 2003), sauerstofftoxische (Matalon et al. 1987), ventilationsinduzierte (Novick et al. 1994) und holzrauchverursachte (Feldbaum et al. 1993) Lungenschäden und neonataler Mekonium-Aspirations-Pneumonie (Ogawa et al. 2000), sowie beim Versuch, die Resultate von Lungentransplantationen zu verbessern (Vazquez de Anda et al. 2001), die Erfolge in der Surfactantsubstitutionstherapie, besonders in Verbindung von Anwendungsfehlern hinsichtlich der Ventilationsrate während der Surfactantsubstitution (Anderson et al. 2004) stark variierten. Vor allem im Falle des adulten ARDS ist nicht das mangelnde Volumen von Surfactant pro Einheit alveolärer Oberfläche die ätiopathogenetische Komponente (Mühlfeld et al. 2010, Schmidt et al. 2001), als vielmehr eine Inaktivierung (Grünwald 1964, Pattle et al. 1962) oder pathologisch veränderte Lipid-

und Proteinkomposition des Surfactant (Hallman et al. 1982, Seeger et al. 1985) durch Schäden an AE2-Zellen, Inaktivierung von Surfactantkomponenten durch ödemassoziierte Proteine (Smith u. Spragg 1997) bis hin zur völligen Abwesenheit eines Surfactantfilms (Chase 1959) und Veränderung der Komponente durch inflammatorische Prozesse (Smith u. Spragg 1997). Es wurde gezeigt, dass nach Endothelschäden (Crapo 1987) Fibrinexsudate ins Lumen der Alveolen treten (Baird et al. 1986). Fibrin interagiert dann direkt mit der Phospholipidschicht (Seeger et al. 1985), wodurch die Viskosität des Lipidfilms herabgesetzt und damit die Funktion erheblich eingeschränkt wird (Casalis et al. 1989). Diese Daten zeigen, dass funktionelle Einschränkungen bei krankhaften Prozessen des Surfactantsystems eher nicht durch strukturelle Veränderungen, als vielmehr durch Veränderungen der biochemischen Zusammensetzung der Surfactantkomponenten und exsudativen Stoffe zu erklären sind. Somit sind sowohl weiterführende Untersuchungen über die Zusammensetzung und Interaktion verschiedener Surfactantkomponenten als auch der Surfactant-Speicherstätten von relevantem klinischen Interesse bezüglich der exogenen Surfactanttherapie.

4.2.10 Lamellenkörper

Die in dieser Arbeit untersuchten AE2-Zellen haben als deutliches Charakteristikum Surfactant speichernde, vesikuläre Organellen, die Lb (Ochs 2010, Stone et al. 1992). Die Lamellen sind dicht gepackte Phospholipide, zwischen denen nur kleine Lücken bestehen (Gil 1985), wobei diskutiert wurde, ob die Lamellenstruktur so *in vivo* existiert oder ein Artefakt der Glutaraldehyd-Fixierung darstellt (Schock et al. 1973). Doch Untersuchungen an gefrorenen Lungen zeigten ebenfalls lamellierte Körper (Kikkawa u. Manabe 1978, Lauweryns u. Gombert-Desmecht 1973, Vanhecke et al. 2010). Neben unterschiedlicher Durchschnittszahl von Lb in AE2-Zellen, wobei der Mensch im Schnitt 200-500, die Maus 50-100 Lb pro AE2-Zelle aufweist (Ochs 2006, 2010), zeigten verschiedene Studien morphologische Unterschiede auf (Kikkawa u. Spitzer 1969, Creasey et al. 1974). So weisen Lb bei verschiedenen Säugetierspezies in der Regel zwei unterschiedliche Typen auf. Der eine Typus ist aus parallel angeordneten Lamellen innerhalb der vesikulären Begrenzungsmembran aufgebaut, während der andere Typus konzentrische Lamellen aufweist, die zumindest im Falle des Menschen häufig mit einem peripher gelegenen Projektionskern vergesellschaftet sind (Abb. 3.8, Abb. 3.7) (Ochs 2010), wobei Gil (1985) vermutete, dass diese Erscheinungsbilder von der Schnittrichtung abhängen, in der die Lb getroffen sind. Falls dem nicht so ist, ist der Mechanismus, wie es zu der Anordnung als konzentrische oder parallele Lamellen kommt, noch nicht geklärt. Eine wesentliche Rolle

wird jedoch dem Surfactantprotein B und den ABCA-Proteinen zugesprochen (Brasch et al. 2004, Pérez-Gil 2008, Weaver et al. 2002). Weiterhin wird diskutiert, ob die Anordnung mit dem Reifegrad des Lb zusammenhängt (Pérez-Gil 2008). Dies führt zur Biosynthese der Lb. Die verschiedenen Lipidkomponenten werden in einer Vielzahl von Organellen synthetisiert und prozessiert. So sind sowohl Mitochondrien und Golgi-Apparat als auch das raue endoplasmatische Retikulum beteiligt (Schmitz u. Müller 1991, Daniels u. Orgreig 2003). Der Golgi-Apparat gibt seine prozessierten Produkte an multivesikuläre Körperchen (Abb. 4.3) ab, die wiederum mit Lb fusionieren und ihren Inhalt damit ins Lumen der Lb abgeben (Goerke 1998, Weaver et al. 2002).

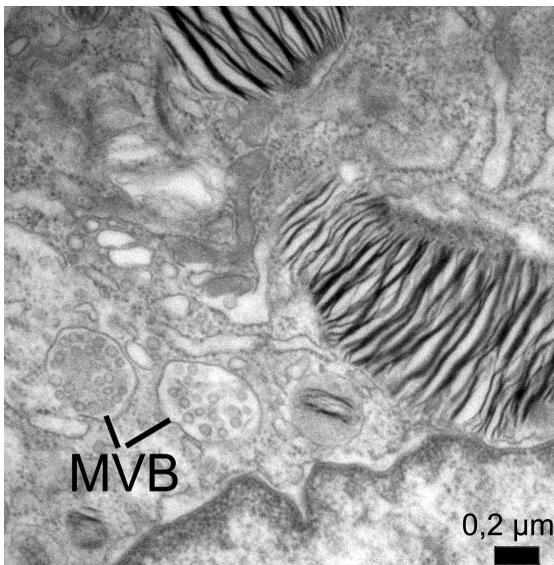


Abb. 4.3: Multivesikuläre Körperchen beim Hund.

Die Sekretion der nun kompletten Lb wird über einen zytosolischen Ca^{2+} -Anstieg getriggert. Die für die Exozytose nötige Fusion der Lb mit der Zellmembran läuft in drei Schritten ab. 1.) Die „prefusion“ Phase, in der das Lb an die Zellmembran herantritt, 2.) die Fusionsphase, in der die Begrenzungsmembran des Lb mit der Zellmembran fusioniert und 3.) die Ausbildung einer Fusionspore, eine Öffnung, durch die der Surfactant sezerniert werden kann (Dietl et al. 2010). Für die dritte Phase gilt zu erwähnen, dass die Sekretion eine Form des „Herauspressens“ ist. Hierfür wird um die Fusionspore ein Actinseil benötigt, der durch Kontraktion die Sekretion fördert (Miklavc et al. 2009). Es wurde berechnet, dass auf diese Weise etwa 10% des intrazellulär gespeicherten Surfactants pro Stunde sezerniert wird (Wright 1990). Interessanterweise zeigt sich eine deutliche Verzögerung der Reaktion auf die

zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung. Bis zum Eintreten der Fusion des Lb mit der Zellmembran nach dem Ca^{2+} -Anstieg vergehen Sekunden bis Minuten, zwischen Fusion und Sekretion Minuten bis Stunden (Haller et al. 1998, Haller et al. 2001). Die Gründe hierfür bedürfen weiterer Untersuchungen. Zumindest erklärt diese Verzögerung, warum auf vielen elektronenmikroskopischen Bildern von AE2-Zellen die Sekretion zu sehen ist, da sie mit ihrer langen Dauer wahrscheinlicher anzutreffen wird (Abb. 4.4).

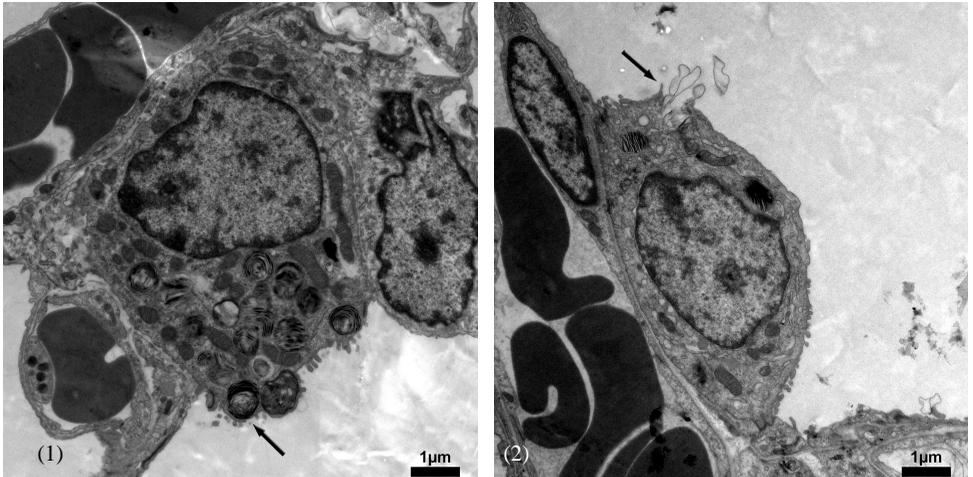


Abb. 4.4: Exozytose von Lb. (1) Prefusion-Phase, in der das Lb die Zellmembran ausstülpt. Hier beginnt die Exozytose (Maus). (2) Abgelaufene Exozytose des Lb-Inhaltes, der ins Alveolarlumen gelangt. Postfusion-Phase (Hund). Vergrößerung 7750fach.

4.2.11 Das Nachleben des Lamellenkörpers

Nachdem das Surfactant durch Exozytose in den alveolären Raum sezerniert wurde, unterzieht sich das Lipidgemisch einer Transformation. Zunächst assoziieren Lb-artige Strukturen mit Surfactant Protein A (SP-A) (Ochs et al. 2002) und formen eine Netzstruktur, die tubuläres Myelin (TM) genannt wird (Williams 1977, Daniels u. Orgreig 2003, Haagsman u. Diemel 2001, Ochs 2010). Dabei lagert sich SP-A in die Ecken dieser Netzstruktur ein, wodurch man annimmt, dass hierdurch die Stabilität gegeben wird (Voorhout et al. 1991). Aus und über dem TM entsteht das oberflächenaktive Surfactant, welches ein einschichtiger osmiophiler Phospholipidfilm ist (Gil u. Weibel 1969). Die diskutierte Möglichkeit, dass die Zweischichtigkeit – TM und Lipidfilm – ein Phänomen der Fixierung sein könnte, konnte von Untersee et al. (1971) widerlegt werden. Denaturiertes, d.h. verbrauchtes Surfactant findet sich als „unilamellar bodies“, die durch AE2-Zellen und Makrophagen aufgenommen werden können (Ochs 2010). Im Gegensatz zu Makrophagen sind AE2-Zellen dann in der Lage, das

aufgenommene Surfactant nicht nur zu eliminieren sondern auch zu recyceln. So werden 10-30% des intraalveolaren Surfactants pro Stunde ersetzt (Baritusso et al. 1981, Jacobs et al. 1982). Lb-artige Strukturen, tubuläres Myelin, Oberflächenfilm und „unilamellar bodies“ können somit als verschiedene funktionelle Entwicklungsstufen des Surfactant angesehen werden (Ochs 2010).

10% des Surfactantgewichtes wird von den Surfactant Proteinen vereinnahmt (Goerke 1998, Daniels u. Orgreig 2003). Schon Clements (1977) vermutete, dass diese Proteine daran beteiligt sind, einen Surfactantfilm zu bilden. Mit den Lb werden die in ihrem Lumen befindlichen hydrophoben Surfactant Proteine B und C (SP-B, SP-C) sezerniert (Dietl et al. 2010). Beide werden benötigt, um Lipide in den einschichtigen Film, den das Surfactant darstellt, einzubauen (Cochrane u. Revak 1991). SP-B ist vor allem dafür notwendig, in Zusammenarbeit mit dem SP-A das tubuläre Myelin zu formen (Clark et al. 1995). Es spielt darüber hinaus bezüglich der Regulierung der Oberflächenspannung die Hauptrolle unter den Surfactant Proteinen (Haagsman u. Diemel 2001). SP-A & D sind hydrophile Proteine der Kollektinfamilie (Haagsman u. Diemel 2001), die einen autonomen Exozytosemechanismus haben und deren Hauptfunktion vermutlich die Pathogenabwehr ist (Johansson u. Curstest 1997, Ochs 2010). Bestätigung dafür fand man in einer Reihe von Untersuchungen, die zeigten, dass SP-A und SP-D mit einer Vielzahl Viren, Bakterien und Pilzen (Crouch 1998, Haagsman 1998, Reid 1998) und Allergenen von Pollen (Malhotra et al. 1993) oder Milben (Wang et al. 1996) interagieren. Es wurde gezeigt, dass Makrophagen Rezeptoren sowohl für SP-A, welches zu einer vermehrten Aufnahme von Pathogenen führt, als auch für SP-D haben, welches zur Agglutination von Pathogenen führt (Haagsman u. Diemel 2001). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Juers et al. (1976), dass Surfactant die Fähigkeit von Alveolarmakrophagen, Bakterien *in vitro* zu töten, erhöht. Eine weitere diskutierte Funktion von SP-A, den intraalveolären Surfactantfilm mittels Regulation der Surfactantsekretion und -wiederaufnahme zu beeinflussen, konnte anhand von SP-A-Knock-out-Mäusen nicht bestätigt werden, die in pathogenarmen Laborbedingungen ohne SP-A bis auf leicht erhöhte Oberflächenspannungen in den Alveolen keine Defizite aufwiesen (Korfhagen et al. 1996).

4.2.12 Morphometrische Unterschiede zwischen den untersuchten Spezies

Die bisher dargestellten Beziehungen treffen auf die meisten untersuchten Spezies sehr ähnlich zu. Jedoch ist als Ausnahme zum einen die Etruskerspitzmaus zu nennen. Sie zeigte überdurchschnittlich häufig einige interessante Abweichungen. So fand man im Vergleich zu den anderen Spezies deutlich größere AE2-Zellen. Ihr Größenunterschied wurde auch in der

Studie von Stone et al. (1992) als konsistent deklariert, nachdem selbst mit erhöhter Probenanzahl die Unterschiede bestehen blieben. Ihre Größe ist physiologisch sinnvoll, denn so können die AE2-Zellen gleich in mehrere Alveolen münden (Abb. 4.5), was durch ihre besonders geringe Anzahl von AE2-Zellen pro mm^2 alveolärer Oberfläche, nämlich ~ 68 Zellen/ mm^2 in den in dieser Studie erhobenen Daten (sonst $\sim 100\text{-}150$ Zellen/ mm^2) unterstrichen wird.

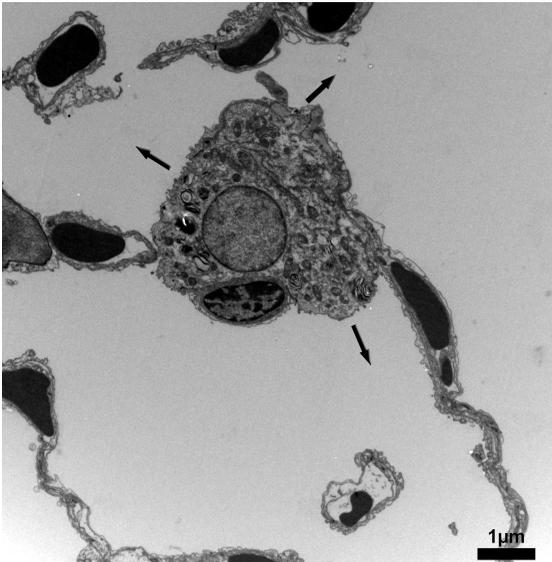


Abb. 4.5: AE2-Zelle der Etruskerspitzmaus bei 7750facher Vergrößerung. Diese Zelle mündet in drei Alveolen gleichzeitig.

Damit ist der Gesamtanteil der AE2-Zellen an der Luft-Blut-Schrankendicke möglichst gering gehalten. Neben diesen Unterschieden nimmt die Etruskerspitzmaus in anderen lungenphysiologischen Parametern eine Sonderstellung ein. So weist sie einen höheren Sauerstoffkonsum pro Einheit Körpergewicht und signifikant höhere Diffusionskapazitäten auf (Gehr et al. 1980). Selbst von anderen Spitzmausarten unterscheidet sich die Etruskerspitzmaus signifikant in einigen dieser Punkte (Gehr et al. 1980).

Weitere Spezies mit großen AE2-Zellvolumina und korrespondierend erhöhten Lb-Volumina pro AE2-Zelle waren das Meerschweinchen und der Mensch. Zumindest für den Menschen kann als Grund dieser Begebenheit die Exposition mit lungentoxischen Substanzen, wie Autoabgasen, angenommen werden (Miller u. Hook 1990, Stone et al. 1992). Für beide trifft auch zu, dass sie besonders viele AE2-Zellen pro mm^2 alveolärer Oberfläche aufweisen. Dies ist im Falle des Menschen mit derselben Noxen-Erklärung zu versehen, da AE2-Zellen Progenitoren für AE1-Zellen sind und bei erhöhter Exposition gegenüber Noxen die

Regeneration alveolären Epithels angeregt wird (Uhal 1997). Das Meerschweinchen hingegen wies noch ungeklärte Riesen-Lb auf, die sich auch in einer erhöhten Volumendichte der Lb am Zellvolumen, nämlich $27\% \pm 4,2\%$, niederschlugen.

Sowohl die Maus als auch das Pferd zeigten eine Besonderheit. Bei diesen beiden Spezies, die die meiste Laufarbeit von den untersuchten Spezies ausführen, waren die höchsten Volumendichten für Mitochondrien zu finden. Während die anderen Spezies Dichten zwischen 3 und 6% aufwiesen, zeigte sich beim Pferd $9\% \pm 1,5\%$ und bei der Maus $10\% \pm 1,1\%$.

Die Spezies Etruskerspitzmaus und Meerschweinchen zeigten in dieser Untersuchung Nuclei, die mehr als $200 \mu\text{m}^3$ im Volumen aufwiesen. Die Kerne zeigten hierbei jedoch durchschnittliche Volumendichten, bei der Etruskermaus $\sim 19\%$, beim Meerschweinchen $\sim 22\%$. Also sind die großen Kernvolumina als äquivalent zur Zellgröße zu sehen.

Beim Kaninchen hingegen nehmen die durchschnittlich $190 \mu\text{m}^3$ großen Kerne einen Anteil von $\sim 30\%$ der Zelle ein, was auf eine hohe Proteinsyntheserate deutet.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel festzustellen, ob eine Beziehung zwischen Körpergewicht und verschiedenen strukturellen Parametern des Surfactantsystems existiert. Zu diesem Zweck wurden Lungen von zwölf unterschiedlichen Säugetierspezies, einschließlich des Menschen, mit modernen stereologischen Methoden untersucht. Alles in allem zeigen die Daten, dass sowohl das mittlere Zellvolumen der AE2-Zellen als auch ihre subzelluläre Zusammensetzung unabhängig vom Körpergewicht zu sein scheinen, obwohl einige Speziesunterschiede existieren. Hier hebt sich vor allem die Etruskerspitzmaus mit ihren im Vergleich zu anderen Säugetieren wesentlich größeren AE2-Zellen hervor. Anpassungen des intrazellulären Surfactantvorkommens werden dadurch erreicht, dass proportional zum steigenden Körpergewicht die Anzahl der AE2-Zellen zunimmt, nicht aber das Lb-Volumen pro AE2-Zelle oder gar die Volumina der AE2-Zellen selbst. Unter physiologischen Umständen ist das intrazelluläre Surfactantvorkommen ein relativ konstanter Parameter, sowohl im Vergleich innerhalb einer als auch zwischen verschiedenen Spezies. Anpassungen des Surfactant an sich ändernde physiologische Erfordernisse, wie etwa Veränderungen der Atemfrequenz oder die Größe der Alveolen, geschehen am Ehesten über die biochemische Zusammensetzung des Surfactantsystems.

5. Summary

This work's target was to detect, if there is a relation between body weight and various structural parameters of the surfactant system. Therefore, twelve lungs of different mammalian species were investigated with modern stereological methods. The results show, that the mean volume of AE2-cells and their subcellular composition seem to be independent of body weight, although some interspecies differences exist. Especially the Etruscan shrew shows much higher AE2-cell volumes related to other mammalian species. Adaptation of the intracellular surfactant pool of species with higher body weight is rather associated with the increase of the AE2-cell number than with increasing Lb volumes or AE2-cell volumes. Under physiologic circumstances the intracellular surfactant pool may be considered as a relatively constant parameter, both within one and among all investigated species. Adaptation of surfactant to changing physiological requirements, such as varying breathing frequencies or alveolar size, likely come with biochemic configuration changes of the surfactant system.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb. – Abbildung

ABCA – ATP-binding cassette

AE1-Zellen – Alveolarepithelzellen Typ I

AE2-Zellen – Alveolarepithelzellen Typ II

ARDS – akut respiratorisches Distress-Syndrom

BAL – bronchoalveoläre Lavage

Ca²⁺ - Kalzium-Ionen

d.h. – das heißt

DNA – Desoxyribonukleinsäure

DPPC - Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin

EM – Elektronenmikroskop

Lb – Lamellenkörper (engl. lamellar bodies)

LM – Lichtmikroskop

Mit – Mitochondrium

MVB – multivesikuläre Körper (engl. multivesicular bodies)

Ncl – Nucleus

O₂ – Sauerstoff

PC – Projektionskern (engl. projection core)

PMPC - Palmitoylmyristoyl-Phosphatidylcholin

P_{O₂} - Sauerstoffpartialdruck

PPPC - Palmitoylpalmitoleoyl-Phosphatidylcholin

Res – Rest

RNA – Ribonukleinsäure

SP-A – Surfactantprotein A

SP-B – Surfactantprotein B

SP-C – Surfactantprotein C

SP-D – Surfactantprotein D

SURS – systematic uniform random sampling

TM – tubuläres Myelin

Vgl. – vergleiche

ΔP_{O₂} - Sauerstoffpartialdruck-Gradient

7. Abbildungsverzeichnis

	Seite
1. Kapitel 2.2 - Abb. 2.1: Schema „Stratified Sampling“.	11
2. Kapitel 2.3 - Abb. 2.2: Menschliche Alveolen.	11
3. Kapitel 2.3 - Abb. 2.3: Testlinienpunktsystem mit 14 Einheiten	12
4. Kapitel 2.3 - Abb. 2.4: Anwendung des Testsystems	12
5. Kapitel 2.3 - Abb. 2.5: Auffinden korrespondierender Stellen	13
6. Kapitel 2.3 - Abb. 2.6: „Counting frame“	13
7. Kapitel 2.3 - Abb. 2.7: anzahlgewichtetes vs. volumengewichtetes mittleres Volumen	15
8. Kapitel 2.3 - Abb. 2.8: „Rotor“-Verfahren	15
9. Kapitel 2.4 - Abb. 2.9: Punktzählmethode	16
10. Kapitel 2.4 - Abb. 2.10: „Ruler“-Methode	18
12. Kapitel 3.1 - Abb. 3.1: Riesen-Lb beim Meerschweinchen	20
13. Kapitel 3.1 - Abb. 3.2: Lichtmikroskopische Bildtafel	22
14. Kapitel 3.1 - Abb. 3.3: Korrelation alveoläre Oberfläche/Körpergewicht	25
15. Kapitel 3.1 - Abb. 3.4: Korrelation AE2-Zellanzahl/Körpergewicht	25
16. Kapitel 3.1 - Abb. 3.5: Korrelation mittleres AE2-Zellvolumen/Körpergewicht	26
17. Kapitel 3.1 - Abb. 3.6: Korrelation mittlere Anzahl AE2-Zellen pro mm ² alveolärer Oberfläche/Körpergewicht	26
18. Kapitel 3.2 - Abb. 3.7: Elektronenmikroskopische Bildtafel	27
19. Kapitel 3.2 - Abb. 3.8: Projektionskern und multivesikuläres Körperchen	28
20. Kapitel 3.2 - Abb. 3.9: Korrelation Volumenfraktion Lb am AE2-Zellvolumen/Körpergewicht	33
21. Kapitel 3.2 - Abb. 3.10: Korrelation Gesamtvolumen Lb/Körpergewicht	33
22. Kapitel 3.2 - Abb. 3.11: Korrelation Gesamtvolumen Lb/alveoläre Oberfläche	34
23. Kapitel 3.2 - Abb. 3.12: Korrelation Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Lb/Körpergewicht	34
24. Kapitel 4.1.3 - Abb. 4.1: Schema „systematic uniform random sampling“ (SURS)	41
25. Kapitel 4.1.5 - Abb. 4.2: Das „physical disector“-Prinzip	44
26. Kapitel 4.2.10 - Abb. 4.3: Multivesikuläre Körperchen	58
27. Kapitel 4.2.10 - Abb. 4.4: Exozytose von Lb	59
28. Kapitel 4.2.12 - Abb. 4.5: Dreifachmündung einer Etruskerspitzmaus-AE2-Zelle	61

8. Tabellenverzeichnis

	Seite
1. Kapitel 2.4 - Tabelle 1: „Ruler“-Klassen	18
2. Kapitel 3.1 - Tabelle 2: Allgemeine Daten	23
3. Kapitel 3.1 - Tabelle 3: Stereologische Daten der AE2-Zellen	24
4. Kapitel 3.2 - Tabelle 4: Stereologische Daten der Lb	31
5. Kapitel 3.2 - Tabelle 5: Volumenfraktionen der Kompartimente	32
6. Kapitel 3.2 - Tabelle 6.1: Korrelationsanalysen mit dem Körpergewicht	32
7. Kapitel 3.2 - Tabelle 6.2: Korrelationsanalysen mit der Atemfrequenz	32

9. Referenzen:

- Adamson IY, Bowden DH.** The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest.* 30(1): 35-42. 1974
- Anderson JC, Molthen RC, Dawson CA, Haworth ST, Bull JL, Glucksberg MR, Grotberg JB.** Effect of ventilation rate on instilled surfactant distribution in the pulmonary airways of rats. *J Appl Physiol.* 97(1): 45-56. 2004
- Askin FB, Kuhn C.** The cellular origin of pulmonary surfactant. *Lab Invest* 25: 260-268. 1971
- Bachofen H, Ammann A, Wangenstein D, Weibel ER.** Perfusion fixation of lungs for structure function analysis: credits and limitations. *J Appl Physiol.* 53(2): 528-33. 1982
- Baird BR, Cheronis JC, Sandhaus RA, Berger EM, White CW, Repine JE.** O₂ metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs. *J Appl Physiol.* 61(6): 2224-9. 1986
- Ban N, Matsumura Y, Sakai H, Takanezawa Y, Sasaki M, Arai H, Inagaki N.** ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J Biol Chem* 282(13):9628-34. 2007
- Baritussio AG, Magoon MW, Goerke J, Clements JA.** Precursor-product relationship between rAbb.it type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. Surfactant turnover time. *Biochim Biophys Acta.* 666(3): 382-93. 1981
- Bernhard W, Hoffmann S, Dombrowsky H, Rau GA, Kamlage A, Kappler M, Haitzma JJ, Freihorst J, von der Hardt H, Poets CF.** Phosphatidylcholine Molecular Species in Lung Surfactant. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25(6): 725-31. 2001
- Bienenstock J.** The Lung as an Immunologic Organ. *Annual Review of Medicine Vol.* 35: 49-62. 1984
- Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S.** Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci USA.* 29;95(20): 11869-74. 1998
- Braendgaard H, Gundersen HJ.** The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods.* 18(1-2): 39-78. 1986
- Brasch F, Johnen G, Winn-Brasch A, Guttentag SH, Schmiedel A, Kapp N, Suzuki Y, Müller KM, Richter J, Hawgood S, Ochs M.** Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 30(4): 449-58. 2004
- Brown LA, Longmore WJ.** Adrenergic and cholinergic regulation of lung surfactant secretion in the isolated perfused rat lung and in the alveolar type II cell in culture. *J Biol Chem.* 256(1): 66-72. 1981
- Burri PH, Weibel ER.** Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. II Effect of PO₂ on the growing lung. *Respir Physiol.* 11(2): 247-64. 1971

- Burri PH, Dbaly J, Weibel ER.** The Postnatal Growth of the Rat Lung. I. Morphometry. *Anat Rec.* 178(4):711-30. 1973
- Burri PH, Gehr P, Müller K, Weibel ER.** Adaptation of the growing lung to increased Vo2 I. IDPN as inducer of hyperactivity. *Respir Physiol.* 28(1): 129-40. 1976
- Butler PJ, Woakes AJ, Smale K, Roberts CA, Hillidge CJ, Snow DH, Marlin DJ.** Respiratory and cardiovascular adjustments during exercise of increasing intensity and during recovery in thoroughbred racehorses. *J Exp Biol.* 179: 159-80. 1993
- Casalis C, Herrera L, Miguel E, Garcia-Barreno P and Munico AM.** Changes in lipid fluidity and composition of lamellar bodies in respiratory distress induced by oleic acid. *Biochem. Soc. Eam.* 17: 792-794. 1989
- Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR.** The Alveolar Type II Cell: A Multifunctional Pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol.* 93(3):472-83. 1988
- Chander A, Fisher AB.** Regulation of lung surfactant secretion. *Am J Physiol.* 258(6 Pt 1): L241-53. 1990
- Chander A, Sen N, Wadsworth S, Spitzer AR.** Coordinate packaging of newly synthesized phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in lamellar bodies in alveolar type II cells. *Lipids.* 35(1): 35-43. 2000
- Chase WH.** The surface membrane of pulmonary alveolar walls. *Exp Cell Res.* 18: 15-28. 1959
- Chi EY, Lagunoff D, Koehler JK.** Abnormally large lamellar bodies in type II pneumocytes in Chediak-Higashi syndrome in beige mice. *Lab Invest.* 34(2): 166-73. 1976
- Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, Whitsett JA.** Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(17): 7794-8. 1995
- Clements JA.** Surface tension of lung extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol* 95: 170-172. 1957
- Clements JA, Brown ES, Johnson RP.** Pulmonary Surface Tension and the Mucus Lining of the Lungs - Some Theoretical Considerations. *J Appl Physiol.* 12(2): 262-8. 1958
- Clements JA, Nellenbogen J, Trahan HJ.** Pulmonary Surfactant and Evolution of the Lung *Science.* 169(945): 603-4. 1970
- Clements JA.** Functions of the alveolar lining. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 115: 67-71. 1977
- Cochrane CG, Revak SD.** Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science.* 254(5031): 566-8. 1991
- Constantinopol M, Jones JH, Weibel ER, Taylor CR, Lindholm A, Karas RH.** Oxygen transport during exercise in large mammals. II. Oxygen uptake by the pulmonary gas exchanger. *J Appl Physiol.* 67(2): 871-8. 1989

Coxson HO, Rogers RM, Whittall KP, D'yachkova Y, Paré PD, Sciruba FC, Hogg JC. A quantification of the lung surface area in emphysema using computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med.* 159(3): 851-6. 1999

Crapo JD, Barry BE, Foscue HA. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis.* 122: 123-143. 1980

Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis.* 126(2): 332-7. 1982

Crapo JD. Morphological changes in pulmonary oxygen toxicity. *Annu. Rev. Physiol.* 48: 721-731. 1987

Creasey JM, Pattle RE, Schock C. Ultrastructure of inclusion bodies in type II cells of lung, human and sub-simian. *J Physiol.* 237(2): 35P-37P. 1974

Cross CE. Editorial: The granular type II pneumocyte and lung antioxidant defense. *Ann Intern Med* 80: 409-411. 1974

Crouch EC. Collectins and pulmonary host defense. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19: 177-201. 1998

Cruz-Orive LM. Stereology: historical notes and recent evolution. *Acta Stereol* 6: 43–56. 1987

Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey *Am J Physiol.* 258(4 Pt 1): L148-56. 1990

Daniels CB, Orgeig S. Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing. *News Physiol Sci.* 18: 151-7. 2003

Davies G, Reid L. Growth of the alveoli and pulmonary arteries in childhood. *Thorax.* 25(6): 669-81. 1970

Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 10(7): 1093-5. 1993

Delesse A. Procède mécanique pour déterminer la composition des roches. *CR Acad Sci (Paris)* 25: 544–545. 1847

DeMello DE, Phelps DS, Patel G, Floros J, Lagunoff D. Expression of the 35kDa and Low Molecular Weight Surfactant-Associated Proteins in the Lungs of Infants Dying with Respiratory Distress Syndrome. *Am J Pathol.* 134(6): 1285-93. 1989

DeMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Nogee L, Cole S, Colten HR. Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 11(2): 230-9. 1994

- Devereux TR, Hook GE, Fouts JR.** Foreign compound metabolism by isolated cells from rAbb.it lung. *Drug Metab Dispos.* 7(2): 70-5. 1979
- Dietl P, Haller T, Mair N, Frick M.** Mechanisms of Surfactant Exocytosis in Alveolar Type II Cells In Vitro and In Vivo. *News Physiol Sci.* 2001 Oct;16: 239-43. 2001
- Dietl P, Haller T.** Exocytosis of lung surfactant - from the secretory vesicle to the air-liquid interface. *Annu Rev Physiol.* 67: 595-621. 2005
- Dietl P, Liss B, Felder E, Miklavc P, Wirtz H.** Lamellar Body Exocytosis by Cell Stretch or Purinergic Stimulation: Possible Physiologic Roles, Messengers and Mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 25(1): 1-12. 2010
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ.** Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc.* 204(Pt 3): 232-46. 2001
- Drorbaugh JE.** Pulmonary function in different animals. *J Appl Physiol.* 15: 1069-72. 1960
- Eckenhoff RG, Somlyo AP.** Rat lung type II cell and lamellar body: elemental composition in situ. *Am J Physiol.* 254(5 Pt 1): C614-20. 1988
- Edwards YS.** Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 129(1): 245-60. 2001
- Elias H, Hyde DM.** An Elementary Introduction to Stereology (Quantitative Microscopy). *Am J Anat.* 159(4): 412-46. 1980
- Fanning JC, Harrison RJ.** The structure of the trachea and lungs in the South Australian bottle-nosed dolphin. In: *Functional Anatomy of Marine Mammals. Vol. 2 London: Academic Press 231-252.* 1974
- Farquhar MG, Palade GE.** Cell junctions in amphibian skin. *J Cell Biol* 26(1): 263-91. 1965
- Fehrenbach H, Richter J, Schnabel PA.** Improved preservation of phospholipid-rich multilamellar bodies in conventionally embedded mammalian lung tissue—an electron spectroscopic study. *J Microsc* 162: 91–104. 1991
- Fehrenbach H.** Alveolar epithelias type II cell: Defender of the alveolus revisited. *Respir Res.* 2(1): 33-46. 2001
- Feldbaum DM, Wormuth D, Nieman GF, Paskanik M, Clark WR, and Hakim TS.** Exosurf treatment following wood smoke inhalation. *Burns* 19: 396–400. 1993
- Fitzgerald ML, Xavier R, Haley KJ, Welti R, Goss JL, Brown CE, Zhuang DZ, Bell SA, Lu N, McKee M, Seed B, Freeman MW.** ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. *J Lipid Res.* 48(3): 621-32. 2007
- Forrest JB, Weibel ER.** Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity VII. The normal guinea pig lung. *Respir Physiol.* 24(2): 191-202. 1975

- Gail DB, Steinkamp H, Massaro D.** Interspecies variation in lung lavage and tissue saturated phosphatidylcholine. *Respir Physiol.* 33(3): 289-97. 1978
- Geelhaar A, Weibel ER.** Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. III The Effect of increased oxygen consumption in japanese waltzing mice. *Respir Physiol.* 11(3): 354-66. 1973
- Gehr P, Weibel ER.** Morphometric estimation of regional differences in the dog lung. *J Appl Physiol.* 37(5): 648-53. 1974
- Gehr P, Bachofen M, Weibel ER.** The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol.* 32(2): 121-40. 1978
- Gehr P, Sehovic S, Burri PH, Claassen H, Weibel ER.** The lung of shrews: Morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol.* 40(1): 33-47. 1980
- Gehr P, Mwangi DK, Ammann A, Maloiy GM, Taylor CR, Weibel ER.** Design of the mammalian respiratory system. V. Scaling morphometric pulmonary diffusing capacity to body mass: wild and domestic mammals. *Respir Physiol.* 44(1):61-86. 1981
- Gil J, Weibel ER.** The Role of Buffers in Lung Fixation with Glutaraldehyde and Osmium Tetroxide. *J Ultrastruct Res.* 25(5): 331-48. 1968
- Gil J, Weibel ER.** Improvements in Demonstration on Lining Layer of Lung Avleoli by Electron Microscopy. *Respir Physiol.* 8(1): 13-36. 1969
- Gil J, Reiss OK.** Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates. *J Cell Biol.* 58: 152-171. 1973
- Gil J, Bachofen H, Gehr P, Weibel ER.** Alveolar volume-surface area relation in air- and saline-filled lungs fixed by vascular perfusion. *J Appl Physiol.* 47(5): 990-1001. 1979
- Gil J.** Histological Preservation and Ultrastructure of Alveolar Surfactant. *Annu Rev Physiol.* 47: 753-63. 1985
- Gobran LI, Rooney SA.** Adenylate cyclase-coupled ATP receptor and surfactant secretion in type II pneumocytes from newborn rats. *Am J Physiol* 272: L187-L196. 1997
- Goerke J.** Pulmonary Surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta.* 1408(2-3): 79-89. 1998
- Griese M.** Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J.* 13(6): 1455-76. 1999
- Griffiths G.** Fine structure immunocytochemistry *Berlin: Springer; pp. 1-459 1993*
Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. N Engl J Med 345(7): 517-25. 2001
- Grünwald P.** The Course of the Respiratory Distress Syndrom of Newborn Infants. As Indicated by Poor Stability of Pulmonary Expansion. *Acta Paediatr.* 53: 470-7. 1964

- Gundersen HJ, Jensen EB.** Stereological estimation of the volumeweighted mean volume of arbitrary particles observed in random sections. *J Microsc* 138: 127–142. 1985
- Gundersen HJ, Jensen EB.** The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 147(Pt 3): 229-63. 1987
- Guttentag SH, Akhtar A, Tao JQ, Atochina E, Rusiniak ME, Swank RT, Bates SR.** Defective surfactant secretion in a mouse model of Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33(1): 14-21. 2005
- Haagsman HP.** Interactions of surfactant protein A with pathogens. *Biochim Biophys Acta*. 1408(2-3): 264-77. 1998
- Haagsman HP, Diemel RV.** Surfactant-associated proteins - functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 129(1): 91-108. 2001
- Hales JR, Findlay JD.** Respiration of the ox - Normal values and the effects of exposure to hot environments. *Respir Physiol*. 4(3): 333-52. 1968
- Haller T, Ortmayr J, Friedrich F, Volkl H, Dietl P.** Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1579-1584. 1998
- Haller T, Dietl P, Pfaller K, Frick M, Mair N, Paulmichl M, Hess MW, Furst J, Maly K.** Fusion pore expansion is a slow, discontinuous, and Ca²⁺-dependent process regulating secretion from alveolar type II cells. *J Cell Biol* 155: 279-289. 2001
- Hallman M, Spragg RG, Harrell JH, Moser KM, Gluck L.** Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure: study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J Clin Invest* 70: 673–683. 1982
- Hammel M, Michel G, Hoefler C, Klawns M, Müller-Höcker J, de Angelis MH, Holzinger A.** Targeted inactivation of the murine Abca3 gene leads to respiratory failure in newborns with defective lamellar bodies. *Biochem Biophys Res Commun*. 359(4): 947-51. 2007
- Hanstede JG, Gerrits PO.** The effects of embedding in water-soluble plastics on the final dimensions of liver sections. *J Microsc*. 131(Pt 1): 79-86. 1983
- Hayat MA.** Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. *Cambridge: Cambridge University Press*. 2000
- Holm BA, Notter RH, Leary JF, Matalon S.** Alveolar epithelial changes in rAbbs after 21-day exposure to 60% O₂. *J Appl Physiol*. 62(6): 2230-6. 1987
- Howard CV, Reed MG.** Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy (2nd Ed.). *Abingdon, UK: Garland Science/BIOS Scientific*. 2005
- Hsia CCW, Fryder-Doffey F, Stalder-Navarro V, Johnson RL Jr, Reynolds RC, Weibel ER.** Structural changes underlying compensatory increase of diffusing capacity after left pneumonectomy in adult dogs. *J Clin Invest*. 92: 758–64. 1993

Hsia CC, Herazo LF, Fryder-Doffey F, Weibel ER. Compensatory Lung Growth Occurs in Adult Dogs after Right Pneumonectomy. *J Clin Invest.* 94(1):405-12. 1994

Hsia CC, Johnson RL, Weibel ER. Compensatory lung growth: relationship to postnatal growth and adaptation in destructive lung disease. In: *The Lung: Development, Aging and the Environment.* Eds. R Harding, K E Pinkerton, C C Plopper. Elsevier/Academic Press.: 187–99. 2004

Hsia CC. Quantitative Morphology of compensatory Lung Growth. *Eur Respir Rev.* 15: 148–56. 2006

Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. *ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure.* An official research policy statement of the american thoracic society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am J Respir Crit Care Med.* 181(4): 394-418. 2010

Huang TH, Blume A, Das Gupta SK, Griffin RG. Nuclear magnetic resonance and calorimetric study of the structure, dynamics, and phase behavior of uranyl ion/dipalmitoylphosphatidylcholine complexes. *Biophys J.* 54: 173–179. 1988

Hyde DM, Tyler NK, Plopper CG. Morphometry of the Respiratory Tract: Avoiding the Sampling, Size, Orientation and Reference Traps. *Toxicol Pathol.* 35(1):41-8. 2007

Iqbal SJ, Weakley BS. The effects of different preparative procedures on the ultrastructure of the hamster ovary. I. Effects of various fixative solutions on ovarian oocytes and their granulosa cells. *Histochemie.* 38(2): 95-122. 1974

Jacobs H, Jobe A, Ikegami M, Jones S. Surfactant phosphatidylcholine source, fluxes, and turnover times in 3-day-old, 10-day-old, and adult rAbb.its. *J Biol Chem.* 257(4): 1805-10. 1982

Johansson J, Curstedt T. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem.* 244(3): 675-93. 1997

Jones KG, Holland JF, Foureman GL, Bend JR, Fouts JR. Xenobiotic metabolism in Clara cells and alveolar type II cells isolated from lungs of rats treated with beta-naphthoflavone. *J Pharmacol Exp Ther.* 225(2): 316-9. 1983

Juurs JA, Rogers RM, McCurdy JB, Cook WW. Enhancement of Bactericidal Capacity of Alveolar Macrophages by Human Alveolar Lining Material. *J Clin Invest.* 1976 58(2): 271-5. 1976

Jürgens KD, Fons R, Peters T, Sender S. Heart and respiratory rates and their significance for convective oxygen transport rates in the smallest mammal, the Etruscan shrew *Suncus etruscus*. *J Exp Biol.* 199(Pt 12): 2579-84. 1996

Kapanci Y, Tosco R, Eggermann J. Demonstration of the Extracellular Alveolar Lining Layer (Surfactant) in Human Lungs. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 10(3): 243-52. 1972

Kiernan JA. Histological and histochemical methods, 3rd ed. *New York: A Hodder Arnold Publication; 1–502.* 1999

Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microsc Today* 8: 8–12. 2000

Kikkawa Y, Spitzer R. Inclusion bodies of type II alveolar cells: species differences and morphogenesis. *Anat Rec.* 163(4): 525–41. 1969

Kikkawa, Y., Manabe, T. The freeze-fracture study of alveolar type II cells and alveolar content in the fetal rAbb.it lung. *Anat. Rec.* 190: 627–38. 1978

Knudsen L, Ochs M, Mackay RM, Townsend P, Deb R, Mühlfeld C, Richter J, Gilbert F, Hawgood S, Reid K, Clark H. Truncated recombinant human SP-D attenuates emphysema and type II cell changes in SP-D deficient mice. *Respir Res* 8: 70. 2007

Knudsen L, Wucherpfennig K, Mackay RM, Townsend P, Mühlfeld C, Richter J, Hawgood S, Reid K, Clark H, Ochs M. A recombinant fragment of human surfactant protein D lacking the short collagen-like stalk fails to correct morphological alterations in lungs of SP-D deficient mice. *Anat Rec* 292: 183–189. 2009

Kolb E. *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere. Teil II.* Stuttgart, Germany: Verlag. 1980

Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(18): 9594–9. 1996

Krause KL, Forster HV, Davis SE, Kiner T, Bonis JM, Pan LG, Qian B. Focal acidosis in the pre-Botzinger complex area of awake goats induces a mild tachypnea. *J Appl Physiol.* 2009 106(1): 241–50. 2009

Lang CJ, Postle AD, Orgeig S, Possmayer F, Bernhard W, Panda AK, Jürgens KD, Milsom WK, Nag K, Daniels CB. Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289(5): R1426–39. 2005

Langston C, Kida K, Reed M, Thurlbeck WM. Human lung growth in late gestation and in the neonate. *Am Rev Respir Dis.* 129(4): 607–13. 1984

Lauweryns, JM, Gombeer-Desmecht M. Freeze-etching electron microscopy of the lung. *Pathol. Ann.* 8: 257–82. 1973

Lindstedt SL, Calder III WA. Body size, physiologic time and longevity of homeothermic animals. *Q. Rev. Biol.* 56: 1–16. 1981

Lindstedt SL. Pulmonary transit time and diffusing capacity in mammals. *Am J Physiol.* 246(3 Pt 2): R384–8. 1984

Lindstedt SL, Schaeffer PJ. Use of allometry in predicting anatomical and physiological parameters of mammals. *Lab Anim.* 36(1): 1–19. 2002

- Long W, Thompson T, Sundell H, Schumacher R, Volberg F, Guthrie R.** Effects of two rescue doses of a synthetic surfactant on mortality rate and survival without bronchopulmonary dysplasia in 700- to 1350-gram infants with respiratory distress syndrome. *The American Exosurf Neonatal Study Group I. J Pediatr* 118: 595–605. 1991
- Lum H, Mitzner W.** A species comparison of alveolar size and surface forces. *J Appl Physiol.* 62(5): 1865-71. 1987
- Macklin CC.** The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. *Lancet* 266: 1099-1104. 1954
- Maina JN, West JB.** Thin and strong! The Bioengineering Dilemma in the Structural and Functional Design of the Blood-Gas Barrier. *Physiol Rev.* 85(3): 811-44. 2005
- Malhotra R, Haurum J, Thiel S, Jensenius JC, Sim RB.** Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A). *Biosci Rep.* 13(2): 79-90. 1993
- Mandarin-de-Lacerda CA.** Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 75(4):469-86. 2003
- Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry LC Jr.** Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79(19): 6033-7. 1982
- Mason RJ, Shannon JM.** Alveolar type II cells. In: *The Lung: Scientific Foundations, Vol. 1.* Eds: Crystal RG, West JB, Weibel ER, and Barnes PJ Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2nd edition: 543–55. 1997
- Massaro D, Clerch L, Massaro GD.** Surfactant secretion: evidence that cholinergic stimulation of secretion is indirect. *Am J Physiol.* 243(1): C39-45. 1982
- Massaro GD, Massaro D.** Morphologic evidence that large inflations of the lung stimulate secretion of surfactant. *Am Rev Respir Dis.* 127(2): 235-6. 1983
- Massaro GD, Clerch L, Massaro D.** Perinatal anatomic development of alveolar type II cells in rats. *Am J Physiol.* 251(3 Pt 2): R470-5. 1986
- Matalon S, Holm BA, and Notter RH.** Mitigation of pulmonary hyperoxic injury by administration of exogenous surfactant. *J Appl Physiol* 62: 756–761. 1987
- Mathieu O, Claassen H, Weibel ER.** Differential Effect of Glutaraldehyde and Buffer Osmolarity on Cell Dimensions: A Study on Lung Tissue. *J Ultrastruct Res.* 1978 63(1): 20-34. 1978
- Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P.** Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* 159: 301–317. 1990
- Mayhew TM.** The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol.* 76(5): 639-65. 1991

- Mazzone RW, Durand CM, West JB.** Electron microscopy of lung rapidly frozen under controlled physiological conditions. *J Appl Physiol.* 45(2): 325-33. 1978
- Mazzone RW, Kornblau S, Durand CM.** Shrinkage of lung after chemical fixation for analysis of pulmonary structure-function relations. *J Appl Physiol.* 48(2):382-5. 1980
- Mead J, Whittenberger JL, Radford EP Jr.** Surface Tension as a Factor in Pulmonary Volume-Pressure Hysteresis. *J Appl Physiol.* 10(2): 191-6. 1957
- Mead J.** Mechanical Properties of the lung. *Physiol Rev.* 41:281-330. 1961
- Mendenhall RM, Mendenhall AL Jr.** Lung alveolar surfactant, lung elasticity, and lung stability. *Nature.* 204: 747-8. 1964
- Mercer RR, Laco JM, Crapo JD.** Three-Dimensional reconstruction of alveoli in the rat lung for pressure-volume relationships. *J Appl Physiol.* 62(4): 1480-7. 1987
- Mercer RR, Russell ML, Crapo JD.** Alveolar septal structure in different species. *J Appl Physiol.* 77(3): 1060-6. 1994
- Miklavc P, Wittekindt OH, Felder E, Dietl P.** Ca²⁺-dependent actin coating of lamellar bodies after exocytotic fusion: a prerequisite for content release or kiss-and-run. *Ann N Y Acad Sci* 1152: 43-52. 2009
- Miller BE, Hook GE.** Hypertrophy and hyperplasia of alveolar type II cells in response to silica and other pulmonary toxicants. *Environ Health Perspect.* 85: 15-23. 1990
- Mühlfeld C, Rothen-Rutishauser B, Vanhecke D, Blank F, Gehr P, Ochs M.** Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy. *Part Fibre Toxicol.* 4: 11. 2007
- Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM.** A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol.* 19(2):65-82. 2010
- Nakatani Y, Nakamura N, Sano J, Inayama Y, Kawano N, Yamanaka S, Miyagi Y, Nagashima Y, Ohbayashi C, Mizushima M, Manabe T, Kuroda M, Yokoi T, Matsubara O.** Interstitial pneumonia in Hermansky-Pudlak syndrome: significance of florid foamy swelling/degeneration (giant lamellar body degeneration) of type-2 pneumocytes. *Virchows Arch.* 437(3): 304-13. 2000
- Neergaard KV.** Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung in den Alveolen. *Z Gesamte Exp Med* 66: 1-22. 1929
- Nicholas TE, Power JH, Barr HA.** The pulmonary consequences of a deep breath. *Respir Physiol.* 49(3) :315-24. 1982
- Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR.** Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 328(6): 406-10. 1993

Novick RJ, Veldhuizen RA, Possmayer F, Lee J, Sandler D, and Lewis JF. Exogenous surfactant therapy in thirty-eight hour lung graft preservation for transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 259–268. 1994

Nyengaard JR, Gundersen HJ. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. *J Microsc* 165: 427–431. 1991

Nyengaard JR, Gundersen HJ. Sampling for stereology in lungs. *Eur Respir Rev* 15(101): 107–114. 2006

Ochs M, Fehrenbach H, Richter J. Electron spectroscopic imaging (ESI) and electron energy loss spectroscopy (EELS) of multilamellar bodies and multilamellar body-like structures in tannic acid-treated alveolar septal cells. *J Histochem Cytochem.* 42(6): 805-9. 1994

Ochs M, Johnen G, Müller KM, Wahlers T, Hawgood S, Richter J, Brasch F. Intracellular and intraalveolar localization of surfactant protein A (SP-A) in the parenchymal region of the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26(1): 91-8. 2002

Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, Richter J, Gundersen HJ. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 169(1): 120-4. 2004a

Ochs M, Knudsen L, Allen L, Stumbaugh A, Levitt S, Nyengaard JR, Hawgood S. GM-CSF mediates alveolar epithelial type II cell changes, but not emphysema-like pathology, in SP-D-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(6): L1333-41. 2004b

Ochs M. A brief update on lung stereology. *J Microsc.* 222(Pt 3): 188-200. 2006

Ochs M, Weibel ER. Functional design of the human lung for gas exchange. In: *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders (4th Ed.)*, edited by Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Senior RM, Pack AI. New York: McGraw Hill, 2008, vol. 1: 23–69. 2008

Ochs M. The closer we look the more we see? Quantitative microscopic analysis of the pulmonary surfactant system. *Cell Physiol Biochem.* 25(1): 27-40. 2010

Ogawa Y and Shimizu H. Current strategy for management of meconium aspiration syndrome. *Acta Paediatr Taiwan* 41: 241–245. 2000

Oldmixon EH, Suzuki S, Butler JP, Hoppin FG Jr. Perfusion dehydration fixes elastin and preserves lung air-space dimensions. *J Appl Physiol* 58: 105–113. 1985

Olmeda B, Villén L, Cruz A, Orellana G, Perez-Gil J. Pulmonary surfactant layers accelerate O₂ diffusion through the air-water interface. *Biochim Biophys. Acta.* 1798(6): 1281-4. 2010

O'Neill S, Lesperance E, Klass DJ. Rat lung lavage surfactant enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 130: 225-230. 1984

Patel AS, Reigada D, Mitchell CH, Bates SR, Margulies SS, Koval M. Paracrine stimulation of surfactant secretion by extracellular ATP in response to mechanical deformation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289: L489-L496. 2005

Pattle RE. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 175: 1125-1126. 1955

Pattle RE, Thomas LC. Lipoprotein Composition of the Film lining the Lung. *Nature.* 189: 844. 1961

Pattle RE, Claireaux AE, Davies PA, Cameron AH. Inability to form a lung-lining film as a cause of the respiratory-distress syndrome in the newborn. *Lancet.* 2(7254): 469-73. 1962

Pérez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1778(7-8): 1676-95. 2008

Pinkerton KE, Gehr P, Crapo JD. Architecture and cellular composition of the air-blood barrier. In: *Comparative Biology of the Normal Lung*, edited by Parent RA. Boca Raton, FL: CRC.: 121-128. 1992

Qanbar R, Cheng S, Possmayer F, Schürch S. Role of the palmitoylation of surfactant-associated protein C in surfactant film formation and stability. *Am J Physiol.* 271(4 Pt 1): L572-80. 1996

Read RJ, Funkhouser JD. Properties of a non-specific phospholipid-transfer protein purified from rat lung. *Biochim Biophys Acta.* 752(1): 118-26. 1983

Reid KB. Interactions of surfactant protein D with pathogens, allergens and phagocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1408(2-3):290-5. 1998

Reifenrath R, Zimmermann I. Surface Tension Properties of lung alveolar surfactant obtained by alveolar micropuncture. *Respir Physiol.* 19(3): 369-93. 1973

Riemersma JC. Osmium tetroxide fixation of lipids for electron microscopy. A possible reaction mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 152(4):718-27. 1968

Ryan US, Ryan JW, Smith DS. Alveolar type II cells: studies on the mode of release of lamellar bodies. *Tissue Cell.* 7(3): 587-99. 1975

Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol.* 17: 19-58. 1963

Saltykov SA. The method of intersections in metallography. *Zavodskaya Laboratoriya* 12: 816-825. (in Russian). 1946

Sanders RL, Longmore WJ. Phosphatidylglycerol in Rat Lung. II. Comparison of Occurrence, Composition, and Metabolism in Surfactant and Residual Lung Fractions. *Biochemistry.* 14(4): 835-40. 1975

- Scherle W.** A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. (1): 57-60. 1970
- Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W, Günther A.** Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 95–100. 2001
- Schmidt-Nielsen K.** How Animals Work. *Cambridge, University Press*: 114. 1972
- Schmiedl A, Bach F, Richter J, Schnabel PA, Bretschneider HJ.** Morphometric evaluation of the myocardial interstitial space after physical and chemical fixation. A light-microscopic study on the left ventricle of canine hearts. *Acta Anat (Basel)*. 142(4): 321-5. 1991
- Schmiedl A, Vieten G, Mühlfeld C, Bernhard W.** Distribution of Intracellular and Secreted Surfactant During Postnatal Rat Lung Development. *Pediatr Pulmonol*. 42(6): 548-62. 2007
- Schmitz G, Müller G.** Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res*. 32(10): 1539-70. 1991
- Schock C, Pattie RE, Creasey JM.** Methods for electron microscopy of the lamellated osmiophilic bodies of the lung. *J. Microscopy* 97: 321-30. 1973
- Schroter RC, Robertshaw D, Filali RZ.** Brain cooling and respiratory heat exchange in camels during rest and exercise. *Respir Physiol*. 78(1): 95-105. 1978
- Schürch S, Goerke J, Clements JA.** Direct determination of volume and time dependence of alveolar surface tension in excised lungs. *Proc Natl Acad Sci. USA* 75: 3417–21. 1978
- Seeger W, Stöhr G, Wolf HR, Neuhof H.** Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol*. 58(2): 326-38. 1985
- Seeger W, Pison U, Buchhorn R, Obertacke U, Joka T.** Surfactant abnormalities and adult respiratory failure. *Lung* 168: 891–902. 1990
- Shay J.** Economy of Effort in Electron Microscope Morphometry. *Am J Pathol*. 81(3): 503-12. 1975
- Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M.** ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med*. 350(13): 1296-303. 2004
- Siegwart B, Gehr P, Gil J, Weibel ER.** Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity. IV the normal dog lung. *Respir Physiol*. 13(2): 141-59. 1971
- Skepper JN.** Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *J Microsc* 199: 1–36. 2000
- Smith RM, Spragg RG.** Pathology of the surfactant system of the mature lung. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 756–760. 1997

- Spragg RG, Lewis JF, Wurst W, Hafner D, Baughman RP, Wewers MD, and Marsh JJ.** Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1562–1566. 2003
- Stahl WR.** Scaling of respiratory variables in mammals. *J Appl Physiol.* 22(3): 453-60. 1967
- Sterio DC.** The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134: 127-136. 1984
- Stuart A.** Basic ideas of sampling. *Griffin, London.* 1984
- Taylor CR, Weibel ER.** Design of the mammalian respiratory system. I Problem and Strategy. *Respir Physiol.* 44(1): 1-10. 1981
- Thompson E.** Quantitative microscopic analysis. *J. Geol.* 38: 193. 1930
- Tomkieweff SI.** Linear intercepts, areas and volumes. *Nature* 155: 24 [correction on p 107]. 1945
- Tsao FH.** Purification and characterization of two rabbit lung Ca²⁺-dependent phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1045(1): 29-39. 1990
- Uhal BD.** Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol* 272: 1031-45. 1997
- Untersee P, Gil J, Weibel ER.** Visualization of extracellular lining layer of lung alveoli by freeze-etching. *Respir Physiol.* 13(2): 171-85. 1971
- Van Golde LM, Oldenburg V, Post M, Batenburg JJ, Poorthuis BJ, Wirtz KW.** Phospholipid transfer proteins in rat lung. Identification of a protein specific for phosphatidylglycerol. *J Biol Chem.* 255(13): 6011-3. 1980
- Vanhecke D, Graber W, Studer D.** Rapidly excised and cryofixed rat tissue. *Methods Cell Biol.* 96:513-27. 2010
- Vazquez de Anda GF, Lachmann RA, Gommers D, Verbrugge SJ, Haitsma J, and Lachmann B.** Treatment of ventilation-induced lung injury with exogenous surfactant. *Intensive Care Med* 27: 559–565. 2001
- Vedel-Jensen EB, Gundersen HJG.** The rotator. *J Microsc* 170: 35-44. 1993
- Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F.** The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3): 90-108. 1998
- Vidic B, Burri PH.** Quantitative cellular and subcellular changes in the rat type II pneumocyte during early postnatal development. *Am Rev Respir Dis* 124: 174–178. 1981
- Vock R, Weibel ER.** Massive hemorrhage causes changes in morphometric parameters of lung capillaries and concentration of leukocytes in microvasculature. *Exp Lung Res* 19: 559–577. 1993

- Vogelnest L, Ralph HK.** Chemical immobilisation of giraffe to facilitate short procedures. *Aust Vet J.* 75(3): 180-2. 1997
- Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ.** Surfactant Protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *J Histochem Cytochem.* 39(10):1331-6. 1991
- Wadsworth SJ, Chander A.** H⁺- and K⁺-dependence of Ca²⁺ uptake in lung lamellar . *J Membr Biol* 174: 41–51. 2000
- Wallace WE Jr, Vallyathan V, Keane MJ, Robinson V.** In vitro biologic toxicity of native and surface-modified silica and kaolin. *J Toxicol Environ Health* 16: 415-424. 1985
- Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P, Reid KB.** Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *Clin Exp Immunol.* 106(2): 367-73. 1996
- Warburton D, Buckley S, Cosico L.** P1 and P2 purinergic receptor signal transduction in rat type II pneumocytes. *J Appl Physiol* 66: 901-905. 1989
- Weaver TE, Na CL, Stahlman M.** Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol.* 13(4): 263-70. 2002
- Weibel ER, Gomez DM.** Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science.* 137: 577-85. 1962
- Weibel ER, Knight BW.** A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. *J Cell Biol* 21: 367–396. 1964
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF.** Practical Stereological Methods for Morphometric Cytology. *J Cell Biol.* 30(1): 23-38. 1966
- Weibel ER.** Postnatal growth of the lung and pulmonary gas exchange capacity. In: *Ciba Foundation Symposium on Development of the Lung*, ed. by A. V. S. de Reuck and R. Porter. London, J. and A. Churchill: 131-148. 1967
- Weibel ER.** Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity: I. Model and Method. *Respir Physiol.* 11(1): 54-75. 1970
- Weibel ER.** Morphometric estimation of pulmonary diffusion capacity: V. Comparative morphometry of alveolar lungs. *Respir Physiol.* 14(1): 26-43. 1972
- Weibel ER.** Stereological methods, vol 1. Practical methods for biological morphometry. London: Academic Press, Inc.: 1–415. 1979
- Weibel ER, Taylor CR, Gehr P, Hoppeler H, Mathieu O, Maloij GM.** Design of the mammalian respiratory system. IX. Functional and structural limits for oxygen flow. *Respir Physiol.* 44(1): 151-64. 1981

Weibel ER, Limacher W, Bachofen H. Electron microscopy of rapidly frozen lungs - evaluation on the basis of standard criteria. *J Appl Physiol.* 53(2): 516-27. 1982

Weibel ER. The Pathway for Oxygen. *Harvard University Press, Cambridge, MA.* 1984

Weibel ER, Marques LB, Constantinopol M, Doffey F, Gehr P, Taylor CR. Adaptive variation in the mammalian respiratory system in relation to energetic demand. VI. The Pulmonary gas exchanger. *Respir Physiol.* 69(1): 81-100. 1987

Weibel ER, Federspiel WJ, Fryder-Doffey F, Hsia CC, König M, Stalder-Navarro V, Vock R. Morphometric model for pulmonary diffusing capacity. I. Membrane diffusing capacity. *Respir Physiol.* 93(2): 125-49. 1993

Weibel ER, Hsia CC, Ochs M. How much is there really? Why stereology is so essential in lung morphometry. *J Appl Physiol.* 102(1): 459-67. 2007

Weibel ER. What makes a good Lung? *Swiss Med Wkly.* 139(27-28): 375-86. 2009

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231(4): 482-97. 1991

Wieser W. A distinction must be made between the ontogeny and the phylogeny of metabolism in order to understand the mass exponent of energy metabolism. *Respir Physiol.* 55(1): 1-9. 1984

Williams MC. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *J Cell Biol* 72: 260-277. 1977

Williams MC. Alveolar Type I Cells - Molecular Phenotype and Development. *Annu Rev Physiol.* 65: 669-95. 2003

Wirtz HR, Dobbs LG. Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science.* 250(4985): 1266-9. 1990

Wirtz HR, Schmidt M. Ventilation and secretion of pulmonary surfactant. *Clin Investig.* 70(1): 3-13. 1992

Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 135: 426-444. 1987

Wright JR. Clearance and recycling of pulmonary surfactant. *Am. J. Physiol.* 259: L1-L12. 1990

Young SL, Kremers SA, Apple JS, Crapo JD, Brumley GW. Rat lung surfactant kinetics: biochemical and morphometric correlation. *J Appl Physiol.* 51(2): 248-53. 1981

Zeltner TB, Caduff JH, Gehr P, Pfenninger J, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. I. Morphometry. *Respir Physiol.* 67(3): 247-67. 1986a

Zeltner TB, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. *Respir Physiol.* 67(3): 269-82. 1986b

Anhang

I. Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei der 105. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft in Hamburg (26.-29. März 2010) als Poster vorgestellt. DOI: 10.3337/anatges.2010.0011

Teile der Arbeit wurden im Journal of Applied Physiology veröffentlicht:

Wirkes A, Jung K, Ochs M, Mühlfeld C. Allometry of the mammalian intracellular pulmonary surfactant system. *J Appl Physiol* 109(6): 1662-1669. 2010

II. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

III. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Christian Mühlfeld für die Vergabe des Themas und seine stets tatkräftige und unterstützende Betreuung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Seine fachkundigen Kommentare zeigten mir stets, wohin mich mein Weg noch führt.

Die Benutzung des in dieser Arbeit verwendeten, für mich äußerst wertvollen CAST-Systems ist Herrn Prof. Dr. med. W. Kummer zu verdanken, der überdies auch stets ein offenes Ohr für Probleme und Anregungen hatte.

Herrn Prof. em. Dr. med. E. R. Weibel und Prof. Dr. med. M. Ochs für ihre fachkundigen Kommentare und Diskussionsbereitschaft, die diese Arbeit zu ihrer fachlichen Kompetenz verhalfen. Darüber hinaus danke ich Herrn Weibel ausdrücklich für die Bereitstellung des Probenmaterials.

Herrn G. Magdowski und Herrn G. Kripp für ihre detaillierende Einführung und stete Hilfe in Sachen Elektronenmikroskopie. Keine Linse entzieht sich je ihrer sachkundigen Justierung.

Frau K. Jung für die Daten hinsichtlich der alveolären Oberfläche, die sie mir freundlicherweise zukommen ließ. Ihr Aufwand bleibt nicht unbemerkt.

Frau T. Papadakis für die Unterrichtung in den Fixationstechniken sowohl für Licht- als auch für Elektronenmikroskopie. Ihre Geduld und ihre gute Laune waren stets eine Freude. Der Einblick in den Aufwand dieser Prozeduren öffnete mir einen neuen Blick auf den Wert der Leihgabe Herrn Weibels.

Herrn N. Ruppik für die moralische Unterstützung, wenn ich beim Schreiben ins Stocken kam. Sein Zuspruch war für mich von unschätzbarem Wert.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6062-6



9 783835 196062 6