

Das Kompensatorische Lungenwachstum der C57Bl6/N - Maus

—

Quantität, Kinetik und Funktionalität

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Verena Motejl

aus

Oldenburg (Oldb)

Gießen 2005

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Leiter: Prof. Dr. W. Seeger

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Langer

Tag der Disputation: 14.12.2005

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

1	EINLEITUNG	1-11
2	GRUNDLAGEN	2-13
2.1	ANATOMISCHE UND PHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN	2-13
2.1.1	Embryologische Differenzierung des Lungengewebes	2-13
2.1.2	Postnatale Lungenentwicklung	2-15
2.1.3	Anatomische Grundlagen.....	2-16
2.1.4	Grundlagen der Physiologie der Atmung.....	2-19
2.2	GESCHLECHTSSPEZIFISCHE UNTERSCHIEDE	2-20
2.3	ALTERSABHÄNGIGKEIT DES KOMPENSATORISCHEN WACHSTUMS.....	2-21
2.4	GRUNDLAGEN DER LUNGENFUNKTIONSPRÜFUNG	2-22
2.4.1	Parameter der Lungenfunktionsprüfung	2-22
2.4.2	Das Prinzip der Bodyplethysmographie.....	2-22
2.5	PHARMAKOLOGISCHE UND MECHANISCHE BEEINFLUSSUNGS-MÖGLICHKEITEN DES KOMPENSATORISCHEN LUNGENWACHSTUMS	2-24
2.5.1	Pulmotrophe Faktoren.....	2-24
2.5.1.1	Retinoide	2-24
2.5.1.2	Glukokortikoide und Thyroidhormon	2-25
2.5.1.3	Wachstumshormone	2-26
2.5.1.4	Wachstumsfaktoren	2-27
2.5.1.5	Wachstumsfaktoren der Angiogenese	2-32
2.5.1.6	Transkriptionsfaktoren	2-35
2.5.1.7	Hypoxie	2-36
2.5.1.8	Mechanischer Zug	2-36
2.5.1.9	Erhöhter Blutfluß.....	2-37
2.5.1.10	Tocopherol (Vitamin E)	2-38
2.5.2	Negative Beeinflussung des Lungenwachstums	2-40
2.5.2.1	Glukokortikoide und Thyroidhormone.....	2-40
2.5.2.2	Intrathorakale Platzhalter.....	2-40

2.5.2.3	Androgene	2-41
2.5.2.4	Hyperoxie	2-42
3	MATERIAL UND METHODEN.....	3-43
3.1	MATERIAL	3-43
3.1.1	Experimentelle Agenzien und Pharmaka	3-43
3.1.2	Geräte.....	3-44
3.1.3	Zusätzliche Materialien.....	3-45
3.1.4	Zusammensetzung einiger verwendeter Lösungen	3-47
3.2	METHODEN.....	3-49
3.2.1	Kompensatorisches Lungenwachstum	3-49
3.2.2	Aufbau des Arbeitsplatzes für die Pneumonektomie	3-49
3.2.3	Durchführung der Pneumonektomie	3-49
3.2.4	Aufbau des Arbeitsplatzes für die Lungenfixierung	3-51
3.2.5	Methode der Volumenbestimmung.....	3-51
3.2.6	Quantitative Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure.....	3-52
3.2.7	Morphometrie des Lungengewebes	3-53
3.2.8	Fixierung der Lungen für die Morphometrie	3-54
3.2.9	Quantifizierung und Lokalisation der Zellproliferation	3-55
3.2.10	Typisierung der proliferierenden Zellen	3-56
3.2.11	Prüfung der Lungenfunktion der Maus in vivo	3-57
3.2.12	Bestimmung des Ventrikelmassenquotienten	3-58
4	ERGEBNISSE	4-59
4.1	QUANTITÄT UND KINETIK DES KOMPENSATORISCHEN LUNGENWACHSTUMS.....	4-59
4.2	QUALITÄT DES LUNGENWACHSTUMS NACH LINKSSEITIGER PNEUMONEKTOMIE	4-63
4.3	MORPHOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN DER LUNGENSTRUKTUR PNEUMONEKTOMIERTER UND NICHT-PNEUMONEKTOMIERTER MÄUSE	4-65
4.4	ZELLPROLIFERATION NACH UNILATERALER PNEUMONEKTOMIE	4-68

4.5	PRÜFUNG DER LUNGENFUNKTION IN VIVO	4-73
4.6	KARDIALER VENTRIKELMASSENQUOTIENT ALS PARAMETER EINER RECHTSVENTRIKULÄREN HYPERTROPHIE.....	4-75
5	DISKUSSION	5-76
6	ZUSAMMENFASSUNG	6-83
7	SUMMARY	7-85
8	LITERATURVERZEICHNIS	8-86
9	ANHANG	9-108
10	DANKSAGUNG.....	10-111

Abkürzungen

A	Arteria
Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotrophes Hormon
AD	Alveolargang
ADX	Adrenalektomie
AK	Antikörper
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
d	Tag
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetsäure
EGR	Epithelialer Wachstumsfaktor
Egr	early-growth-response-gene
eNOS	endotheliale Nitratoxidase-Synthase
et al.	et altera
Exd	Exstirpationstag
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	fluoreszierendes Isothiocyanat
Flk	fetale Leberkinase
g	Gramm
GDA	Glutardialdehyd
h	Stunde

H	Wasserstoffion
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HIF-2 α	Hypoxie-induzierender Faktor 2 alpha
H ₂ O	molekulares Wasser
IE	Insulineinheiten
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
i.p.	intraperitoneal
k	kilo
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KGF	Keratinozyten-Wachstumsfaktor
kDa	Kilodalton
LL	linke Lunge
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	isotonisches Natriumchlorid
N.S.	nicht signifikant
nm	Nanometer
O ₂	molekularer Sauerstoff
O.D.	optische Dichte
p	Signifikanz
Pa	Pascal
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Blutplättchenwachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)

PDGFR	Rezeptor des Blutplättchenwachstumsfaktors
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PL	Phospholipase
PNX	Pneumonektomie
postOP	postoperativ
präOP	präoperativ
R	Resistance, Widerstand
RDS	Respiratorisches Distress Syndrom, Atemnotsyndrom
RL	rechte Lunge
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Drehungen pro Minute
s	Sekunde
Sa	Surface Area, alveoläre Oberfläche
SEM	Elektronen-Scan Mikroskop, standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	src-homologe Region
SP	Surfactantprotein
STABW	Standardabweichung
TB	terminale Bronchiolen
TEM	Transmissions-Elektronen Mikroskop
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
α	alpha
β	beta
γ	gamma
Δ	delta

μ	mikro
°C	Grad Celsius
®	eingetragene Marke
%	pro cent

1 Einleitung

Die Lunge gewährleistet ihre essentielle Funktion des Gasaustausches durch die Bereitstellung einer suffizienten alveolären und kapillären Oberfläche. Bei Säugetieren besteht eine lineare Beziehung zwischen der alveolären Oberfläche und der Sauerstoffaufnahme, die bei kleineren Säugern durch eine ausgeprägtere Septierung und nicht durch ein höheres relatives Lungenvolumen erreicht wird (112).

Die Mechanismen, die den Beginn, das Ausmaß und das Ende der alveolären Formation und Größe steuern, sind noch weitgehend unverstanden, ebenso wie das Auftreten einer pulmonalen Rekonstruktion nach teilweisen Verlust von Lungenanteilen, dem so genannten kompensatorischen Lungenwachstum.

Obwohl dieses kompensatorische Lungenwachstum nach unilateraler Pneumonektomie bereits für Kaninchen (98), Mäuse (24), Frettchen (117,119) und Hunde (73,170) beschrieben wurde, ist es bisher in Ratten am umfassendsten in Bezug auf die Kinetik des Wachstums, das Ausmaß der Volumenzunahme und die Einbeziehung der verschiedenen intrapulmonalen Gewebekompartimente in den Wachstumsprozess dokumentiert (30,134,143,175,178). In einigen der untersuchten Säugetierspezies zeigte sich ein ausgeprägtes bis vollständiges kompensatorisches Wachstum der verbliebenen Lunge mit Wiederherstellung einer normalen Lungenvolumenkapazität, Zellzahl und Organfunktion (73,98,117,136).

Verschiedene pulmonale Erkrankungen entstehen oder verschlechtern sich durch den Verlust an Alveolarsepten (COPD, Lungenemphysem, Mukoviszidose) oder durch die Umbauprozesse der Alveolarwände, welche einen stark reduzierten Gasaustausch nach sich ziehen (Lungenfibrose).

Physiologische Kompensationsmechanismen des Verlusts der Gasaustauschoberfläche basieren auf mehreren Mechanismen: der vollständigen Nutzung des verbliebenen Lungengewebes, einer Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes, sowie der Generierung neuer Gasaustauschareale. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der Alveolarisierung und der alveolären Differenzierung ebenso wenig verstanden wie die Reparatur und der Umbau bereits geschädigten pulmonalen Gewebes (28). Das Aufdecken dieser Mechanismen könnte als einer der entscheidenden Schritte in der Entwicklung neuer

Therapieansätze für chronisch-obstruktive, emphysematöse und fibrotische Lungenerkrankungen gelten.

Obwohl Mäuse durch die Möglichkeit der genetischen Manipulation ein einzigartiges Spektrum an Forschungsmöglichkeiten bieten, ist diese Spezies in diesem Zusammenhang bisher nur ansatzweise untersucht worden. Um eine Basis für zukünftige funktionelle Studien des kompensatorischen Lungenwachstums adulter Mäuse zu schaffen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Charakterisierung des Ausmaßes, des Zeitverlaufes und verschiedener Parameter des Lungenwachstums nach unilateraler Pneumonektomie durchgeführt.

2 Grundlagen

2.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

2.1.1 Embryologische Differenzierung des Lungengewebes

Die embryonale Phase: Aus dem unteren Ende des Laryngotrachealschlauches entwickelt sich in der Embryonalperiode die primitive, endodermale Lungenanlage, aus der durch baldige Zweiteilung die rechte und die linke Lungenhälfte in Form der Bronchi principales angelegt wird. Bereits in diesem frühen Stadium ist der linke Anteil etwas kleiner ausgebildet und kommt mehr lateral zu liegen.

Die Entwicklung der Lunge während der Phase der bronchialen Verzweigung wird stark beeinflusst durch Wechselwirkungen zwischen den dem Endoderm entstammenden epithelialen Tubuli und dem diese umgebenden Mesoderm (37,40,1387,169). So induziert ein von der Spitze einer Lungenknospe auf einen sich entwickelnden Trachealschlauch transplantiertes Mesenchym dort die Aussprossung einer neuen Knospe. Im Gegensatz dazu verhindert auf das Epithel der Lungenknospe transplantiertes tracheales Mesenchym weiteres Verzweigen (Branching). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass Hühnerlungenmesoderm, transplantiert auf das Epithel einer Mäuselunge, ein Branching aviären Typs induziert (32).

Mit der Entwicklung der primitiven Pleurahöhle differenzieren sich die Knospen weiter aus. Beim Menschen entstehen drei rechte und zwei linke Segmente, die Maus bildet vier rechte und ein linkes Segment. Mit der Weiterdifferenzierung der sekundären Knospen kommt es zu wiederholter dichotomer Teilung der primitiven Bronchien. Die entstehenden terminalen Sacculi verlängern sich zu dünnwandigen, kanalikulären Gängen. Zum Geburtstermin sind bis zu vier Generationen dieser kanalikulären Gänge entsprechend den Aufzweigungen der späteren Azini angelegt. In diesen werden später mehrere Septierungsvorgänge letztendlich zur Ausbildung der Alveolen führen. In der embryonalen Phase entwickeln sich ebenfalls die primitiven proximalen Blutgefäße: die arteriellen Gefäße differenzieren sich aus dem sechsten Kiemenbogenpaar, die Venen wachsen in Form kleiner Tubuli aus dem linken Vorhof des Herzens.

Nach Abschluss der embryonalen Phase schließen sich vier Stadien der fetalen Lungenentwicklung an, die durch unterschiedliche Differenzierungszeitpunkte in der Lunge in einander übergehen und gleichzeitig ablaufen können.

Die pseudoglanduläre Periode: Die Lungenanlage entspricht einer tubulo-azinösen Drüse, die Bronchialsprossen sind von einer dicken Mesenchymschicht umgeben, welche die dichotome Teilung der Bronchialanlage induziert. Am Ende der Periode sind alle wichtigen Strukturen einschließlich des Bronchialbaums, aus dem sich die gasaustauschenden Strukturen entwickeln (135,143), angelegt, es liegen allerdings noch keine Alveolen vor.

In früheren Studien wurde definiert, dass die pseudoglanduläre Phase mit der beginnenden Entwicklung der Azini endet (143). Neuere morphologische Studien an der Ratte zeigten allerdings, dass etwa die Hälfte der epithelialen Zellmasse des Lungenparenchyms bereits im späten Stadium dieser Entwicklungsphase vorliegt (21,42). Für humane Lungen konnte nachgewiesen werden, dass am Ende dieser Phase alle luftführenden Strukturen ausgebildet sind (183).

Die kanalikuläre Periode: Die Entwicklung des gasaustauschenden Parenchyms beginnt. Es kommt zu einer starken Zunahme der Vaskularisierung, die intrapulmonalen Blutgefäße entstehen parallel durch verschiedene Mechanismen, die Vaskulogenese und die Angiogenese. Vaskulogenese beschreibt die in situ-Differenzierung von Endothelzellen aus mesenchymalen Vorläuferzellen, den Angioblasten. Das so entstehende primitive Gefäßnetz wird durch aus schon bestehenden Gefäßen aussprossende Blutgefäße (Angiogenese) an die Zirkulation angeschlossen. Die Gefäße kanalisieren das Lungenparenchym und bilden ein enges, dreidimensionales Netzwerk aus, die aus dem kubischen Epithel durch Abflachung entstandenen Bronchioli respiratorii stellen die primitiven Primäralveolen dar, zusätzlich werden die Kapillarkörbe um die Alveolen verstärkt ausgebildet. Somit ist ein gewisser respiratorischer Gasaustausch bereits nach etwa der Hälfte der Entwicklungszeit möglich.

In Studien zeigte sich, dass interzelluläre Kontakte und parakrine Mechanismen zwischen dem alveolären Epithel und den pulmonalen Fibroblasten die Ausbildung der Typ II-Alveolarepithelzellen lenken und umgekehrt (134,141). Durch die voranschreitende Differenzierung werden die interepithelialen Verbindungen von der apikalen in die basale Hälfte der interzellulären Spalten verschoben. An diesen Stellen entstehen aus den kubischen Zellen Typ I-Alveolarzellen, an den Stellen, an denen dieser Prozess nicht stattfindet, entwickeln sich die Typ II-Zellen. Diese bilden den oberflächenaktiven Surfactant, welcher in Lamellarkörpern gespeichert wird (20).

Die terminale (sakkuläre) Periode: Durch ausgeprägte Wachstumsprozesse aller Strukturen kommt es zu einer massiven Vergrößerung des Lungenparenchyms, welches definiert ist als die zukünftige gasaustauschende Region. Parallel zu der Vergrößerung der Lufträume wird das interstitielle Gewebe komprimiert und sein Volumen reduziert. Das kapilläre Netz kommt näher an den Lufträumen zu liegen.

Die Alveolarperiode: Diese Phase dauert auch nach der Geburt an; es kommt zu einer weiteren Abflachung der Typ I-Zellen, die zwar bereits ausreichenden Gasaustausch gewährleisten könnten, in ihrer endgültigen Form aber erst nach der Geburt vorliegen.

Beim Menschen liegen unterschiedliche Aussagen bezüglich der Anzahl der Alveolen bei der Geburt und dem Ende der Alveologenese vor. Die Angaben differieren von keinen (135), über 20 Millionen (181) bis hin zu 50 Millionen (164) Alveolen bei der Geburt, das Ende der Alveolarisation wird zwischen 2 (164), über 8 (60) bis zu 20 (118) Lebensjahren angesetzt. Insgesamt werden laut Gilbert et al. 85% der Alveolen des Menschen und nahezu 100% der Alveolen der Maus nach der Geburt gebildet. Die Alveolarisierung ist somit beim Menschen, so wie bei der Maus überwiegend ein postnatales Ereignis.

2.1.2 Postnatale Lungenentwicklung

Gilbert et al. gehen davon aus, dass die Alveolarisierung beim Menschen bis zum Ende des zweiten Lebensjahres nahezu abgeschlossen ist und bis zum 8. Lebensjahr nur noch in geringem Ausmaß abläuft (32).

Genaue Forschungsergebnisse über den Ablauf der Alveologenese liegen für Ratten vor. Hier zeigte sich, dass die Alveolenentwicklung mit dem Auftreten schmaler Grate auf beiden Seiten der sakkulären Wände beginnt. Diese unterteilen die vorliegenden Einheiten unvollständig in kleinere, die Alveolen, die als flache Aussackungen im Elektronenmikroskop nachweisbar sind. Die neu gebildeten interalveolären Wände werden als Sekundärsepten bezeichnet, sie entstehen aus den intersakkulären, primären Septen. An dem freien Ende des sekundären Septums finden sich Elastinfasern. Die Ablagerung von Elastinfasern ist eng verbunden mit der alveolären Formation, da die Auffaltungen der interalveolären Wände entlang der Elastinfasern entstehen (144). Während dieses Prozesses der Alveolarisierung aufgefaltete sekundäre Alveolarsepten enthalten initial eine kapilläre Doppelmembran. Diese unreife Struktur unterscheidet sich von der adulten Morphologie, in der nur eine kapilläre Membran vorliegt. Burri et al. postulieren, dass

Alveolen nur in Bereichen entstehen können, die wie die unreifen Septen eine kapilläre Doppelmembran besitzen. Kapilläre Doppelmembranen finden sich in der adulten Lunge an den Grenzflächen der Alveolen zu den peripheren Luftwegen, der Pleura oder der Adventitia der Bronchien oder größerer Gefäße.

2.1.3 Anatomische Grundlagen

Die Grenzstruktur zwischen Lungengewebe und Thorax bildet die die Thoraxwände auskleidende Pleura parietalis, die am Ligamentum pulmonale umschlägt und als Pleura visceralis die Lunge überzieht. Sie besteht aus einem einschichtigen, meist plattenepithelartigem Verband, dem Mesothel, welches mit Mikrovilli besetzt ist.

Die Lunge der Maus wird in die so genannten Lobi unterteilt: die rechte Lunge besteht aus dem Lobus cranialis, medialis, caudalis und accessorius (Lingulum, Herzlappen), die linke Lungenhälfte besteht aus nur einem Lappen.

Die nächst feinere Untergliederung stellen die Lobuli dar. Unter Lobuli versteht man durch schmale Bindegewebssepten (Septa interlobularis) voneinander abgegrenzte, kleine Lungenareale, die dem Aufteilungsgebiet eines Bronchiolus entsprechen. Sie werden an der Lungenoberfläche als polygonale Bezirke sichtbar. Ein Lobulus setzt sich aus mehreren Acini zusammen, die aus den von einem Bronchiolus terminalis abstammenden Alveolen bestehen und die kleinste funktionelle respiratorische Einheit bilden. Bronchiolen sind Luftwege mit weniger als 1 mm Durchmesser. Sie werden in Bronchioli I., II. und III. Ordnung unterschieden und nach der Teilung zu Bronchioli terminales, aus denen durch Aufzweigung zwei, selten drei Bronchioli respiratorii (alveolares) entstehen.

Der Bronchiolus respiratorius wird von einem einschichtigen kubischen Epithel meist ohne Kinozilien ausgekleidet; seine Form ist durch die Ausbildung von Alveolen gekennzeichnet. Sie werden Ductus alveolares oder auch Atrium genannt. Die Öffnungen der Alveolärsäckchen und Alveolen sind von glatten Muskelzellen und elastischen Fasern umgeben und stellen polyedrische Lufträume dar. Im lichtmikroskopischen Präparat erkennt man polygonale, zum Teil granulierte und vakuolisierte Zellen eines einschichtigen, von einer Basalmembran unterlagerten platten Alveolarepithels. Die Basalmembran weist kollagene Anteile auf. Der Alveolarwanddurchmesser beträgt beim Menschen zwischen 0,15 und 0,6mm. Die Alveolarwand der Maus fällt verhältnismäßig dicker aus. Zum Teil ist diese Verdickung allerdings nur eine scheinbare, da der

Durchmesser der Kapillaren im Verhältnis zum Alveolarwanddurchmesser größer ausfällt, zum Teil ist diese Verdickung aber auch dadurch bedingt, dass in die Alveolarwand der Nager zahlreiche lymphoide und lymphozytäre Zellen eingelagert sind. Zur Wand der Alveole gehört ein dichtes Netzwerk elastischer und kollagener Fasern (Typ IV und V), welches die Alveole umgibt und ihre Retraktion nach Dehnung ermöglicht. Die elastischen Fasern verstärken sich im Bereich der Alveolen und entwickeln zusammen mit einzelnen glatten Muskelzellen Basalringe, die durch ihre Kontraktion die Austreibung der Expirationsluft bewirken. Dagegen verhindert das elastische Fasernetz eine Überdehnung der Lungenbläschen (Bilder 2.1 und 2.2).

Bronchiolen werden von einem Ast der Pulmonalarterie begleitet, der venöses Blut zum Respirationsgewebe führt. Die pulmonalen Arterien der Maus entsprechen in ihrer Funktion denen des Menschen: sie führen desoxygeniertes Blut aus dem rechten Ventrikel zu den Alveolen. Im Unterschied zur menschlichen Anatomie fehlt der Maus allerdings ein bronchiales Gefäßsystem (Vasa privata).

In ihrer Anatomie weichen die Gefäße der Maus allerdings von der des Menschen ab. So sind die Lungenvenen der Maus vom Herz aus mit quergestreifter Muskulatur umgeben; Muskelbündel finden sich bis in die Wände der kleinen Venen und bilden dort die Hauptsubstanz der Wandstruktur. Vermutlich fördern diese muskulären Strukturen die Abführung des Blutes aus der Lunge (20).

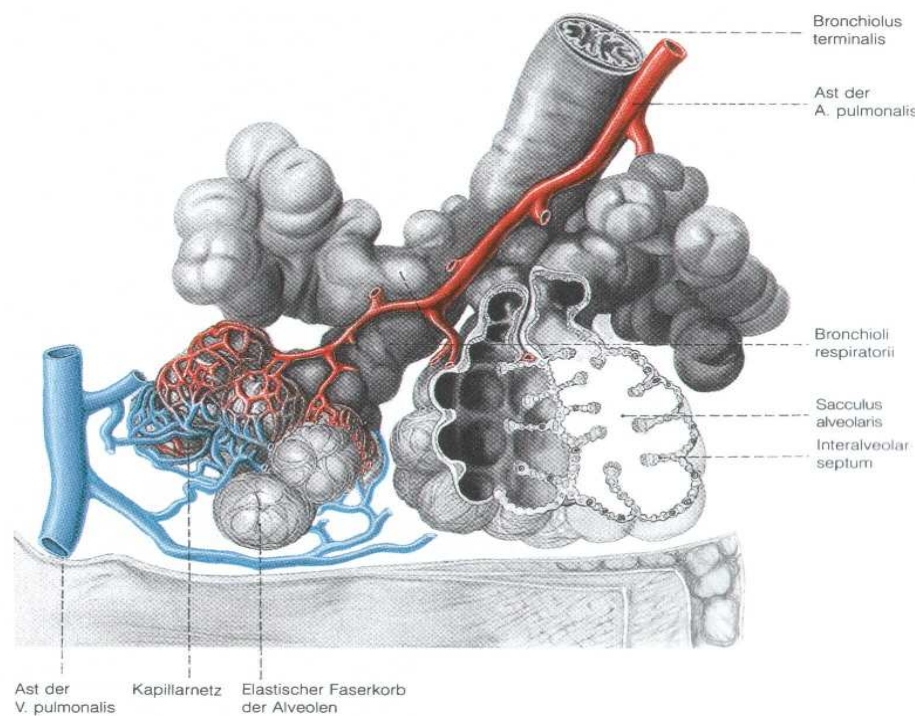


Bild 2.1: Stark vereinfachte Darstellung eines Azinus mit Gefäßversorgung.

Die terminale Strecke der A.pulmonalis ist rot abgebildet, Blau markiert den Beginn der V.pulmonalis. (Aus: H.-R. Duncker in Benninghoff, Drenckhahn: Anatomie; 13./14..Auflage, S.363 (189))

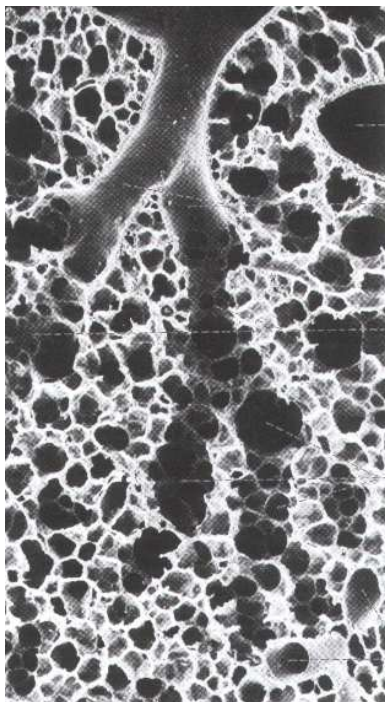


Bild 2.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Aufzweigungen eines Bronchiolus einer Kaninchenlunge.

Bei der 70fachen Vergrößerung erkennt man die terminalen und respiratorischen Bronchiolen sowie die Ductus alveolares.

(Aus: H.-R. Duncker in Benninghoff, Drenckhahn: Anatomie; 13./14.Auflage, S.363 (189))

2.1.4 Grundlagen der Physiologie der Atmung

Zur Aufrechterhaltung der Lebensprozesse in den Zellen des Organismus wird fortlaufend Energie benötigt, die vornehmlich durch Oxidationsprozesse gewonnen wird. Der hierfür benötigte Sauerstoff (O_2) gelangt bei der Ventilation durch konvektiven Transport in die Alveolen und wird dort via Diffusion in das Kapillarblut aufgenommen. Umgekehrt wird mit dem Stoffwechselendprodukt Kohlenstoffdioxid (CO_2) verfahren. Entscheidend für einen effektiven Gasaustausch sind die Belüftung (Ventilation) und die Durchblutung der Lunge (Perfusion), sowie die Verteilung von Perfusion, Ventilation und Diffusion innerhalb der Lunge.

Die normale Atemluft enthält zu 79% Stickstoff, 20,9% Sauerstoff und 0,1% Edelgase; die Konzentration des Kohlenstoffdioxids ist vernachlässigbar klein. In den Alveolen liegt die fraktionelle O_2 -Konzentration bei 14% und die fraktionelle CO_2 -Konzentration bei 5,6%, entscheidend für den Gasaustausch ist allerdings der Druckanteil der einzelnen Gase am Gesamtgemisch (Partialdruck), bzw. genauer die Partialdruckdifferenzen über der Diffusionsstrecke. Dieser alveoläre Partialdruck wurde nach Dalton definiert und beträgt für Sauerstoff durchschnittlich 100mmHg und für Kohlenstoffdioxid 40mmHg. Im venösen Blut, das die Alveolen über die Äste der A. pulmonalis erreicht, beträgt der Partialdruck des Sauerstoffs 40mmHg und der des CO_2 46mmHg. Die pro Zeiteinheit diffundierende Substanzmenge (Diffusionsstrom M) wird durch das 1.Ficksche Diffusionsgesetz beschrieben, nach dem bei der Diffusion der Gasfluss über eine Membran proportional ist zur Partialdruckdifferenz der Gase über der Membran und zur Diffusionsfläche, sowie umgekehrt proportional zur Dicke der Membran, d.h. der Diffusionsstrecke. Ausserdem beinhaltet es unter anderem den Kroghschen Diffusionskoeffizienten K . Dieser ist eine Materialkonstante, die vom Diffusionsmedium, der Temperatur und der Art und Größe des diffundierenden Teilchens abhängig ist. Im Falle des pulmonalen Gasaustausches hat K_{CO_2} einen gut 20mal höheren Wert als K_{O_2} . Daher ist trotz kleiner CO_2 -Partialdruckdifferenzen zwischen Lungenkapillarblut und Alveolarraum die CO_2 -Abgabe genauso gewährleistet wie die O_2 -Aufnahme (46,72).

2.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Verzögerte Lungenentwicklung und niedrigere Spiegel der Surfactant-Phosphatidylcholine wurden bereits bei männlichen Rattenfeten im Vergleich zu weiblichen Feten festgestellt. Ebenfalls zeigten weibliche Tiere ein schnelleres Abschließen des kompensatorischen Lungenwachstums als gleichaltrige männliche (36).

Geschlechtsvergleichende Untersuchungen der Anatomie und Physiologie der Mauslunge an C57BL/6N-Mäusen haben ergeben, dass die weiblichen Tiere bei den untersuchten Parametern signifikant höhere Werte erzielten. Es handelte sich hierbei um die Vitalkapazität, das inspiratorische Reservevolumen und das Totraumvolumen bei vollständig geblähter Lunge. Die Ursache dieser Unterschiede wird in dem erhöhten Sauerstoffbedarf des Tieres während Trag- und Laktationszeit gesehen, die beide einen beträchtlichen Teil des Mausebens ausmachen (153). Auf der anderen Seite konnten bei trächtigen, pneumonektomierten Tieren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu nicht trächtigen Kontrolltieren festgestellt werden (52).

In anderen Studien wurden die Mechanismen untersucht, die zu geschlechtsspezifischen Unterschieden des Surfactantgehaltes in Rattenlungen führen. Dabei wurde festgestellt, dass frisch isolierte Lungenepithelzellen weiblicher Tiere im Vergleich zu männlichen einen höheren Spiegel an ungesättigtem Phosphatidylcholin enthielten; dieser gilt als Marker der Surfactantlipide.

Epithelzellen männlicher Ratten wiederum zeigten eine signifikant höhere Freisetzung der (3H)-Arachidonsäure in das Medium. Dieses lässt unterschiedliche Aktivitäten der Phospholipase vermuten (120). Phospholipasen (PL) sind an Stoffwechselprozessen beteiligt und erzeugen neben Verdauungsenzymen höchst aktive Signalmoleküle und ihre unmittelbaren Vorstufen. Die γ 1-Isoform der Phospholipase C aktiviert den EGF-Rezeptor, was unter anderem zu einer Stimulierung der Proteinkinase C führt. Im Gegensatz zu den anderen Isoformen von PLC trägt PLC γ 1 SH2 (src-homologe Region 2)-Domänen. Sie binden an Phosphotyrosinreste nahe des aktivierten Rezeptors. Dieser Andockungsvorgang bringt einen Tyrosinrest von PLC γ 1 in die richtige Orientierung, um von der katalytischen Domäne des EGF-Rezeptors phosphoryliert zu werden, welcher wiederum die Phospholipaseaktivität stimuliert. Mit der Phosphorylierung weiterer SH2-Domänen wird die Proliferation von Epithelzellen ausgelöst (166).

2.3 Altersabhängigkeit des kompensatorischen Wachstums

Das Auftreten eines kompensatorischen Lungenwachstums nach unilateraler Pneumonektomie oder Lobektomie konnte bereits für unterschiedliche Spezies nachgewiesen werden (169). Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass das noch stattfindende Wachstum des Organismus die entscheidende Voraussetzung ist. Zum Beispiel findet in den meisten Rattenstämmen während ihres gesamten Lebens ein somatisches Wachstum statt und auch in der adulten Ratte liegt eine stabile Lunge-zu-Körpergewicht-Ratio vor, die durch kontinuierliches Organwachstum erklärbar ist.

Im Gegensatz dazu scheint diese Möglichkeit bei Spezies, die mit Erlangen der sexuellen Reife ein stabiles Körpergewicht erreichen, nicht vorzuliegen; nachgewiesen an Studien mit Katzen- und Hundewelpen im Vergleich zu adulten Tieren (21,81,170,183). Eine entscheidende Ausnahme scheint allerdings in der Maus vorzuliegen: Mäuselungen zeigen zwar ein ausgeprägtes kompensatorisches Wachstumsverhalten, bei ihnen liegt aber kein somatisches Wachstum (32) vor.

Daten der Arbeitsgruppe von S.R. Rannels zeigten, dass die vollständige Wiederherstellung der Lungenmasse in jungen Tieren schneller vonstatten geht als in adulten (135,143,178).

Studien bezüglich des kompensatorischen Lungenwachstums bei Menschen wurden größtenteils von Cagle und Thurlbeck (37) durchgeführt. Diese legen nahe, dass es bei Kleinkindern unter 5 Jahren in Form einer Hyperplasie durch Zellteilung vorliegt und bei älteren Individuen durch eine Hypertrophie und Überblähung der bereits existierenden Alveolen, verbunden mit einer Ausdünnung der Diffusionswände, stattfindet. Abhängig von der vorliegenden Grunderkrankung kann aber trotzdem eine gute klinische Funktion erreicht werden.

2.4 Grundlagen der Lungenfunktionsprüfung

2.4.1 Parameter der Lungenfunktionsprüfung

Laros und Westermann (99) haben in einer Langzeitstudie 98 Patienten, bei denen im Alter von 2 bis 40 Jahren eine partielle Pneumonektomie durchgeführt wurde, auf ihre pulmonale Funktion hin überprüft. Hierbei zeigte sich, dass Patienten unter 5 Jahren eine totale Lungenkapazität und ein Tidalvolumen aufwiesen, das nur wenig unter dem der gesunden Altergenossen lag. Bei Patienten zwischen 6-20 Jahren lag die durchschnittliche Vitalkapazität bei 85% , ältere erreichten nur 70- 78% des Normwertes.

2.4.2 Das Prinzip der Bodyplethysmographie

Der Atemwegswiderstand ist definiert als der Quotient aus Alveolardruck gemessen als Munddruck und der zugehörigen Atemstromstärke: $R \text{ [kPa/s]} = \Delta P_A / V$; Dimension kPa/s, wobei R, die Resistance, die Druckdifferenz darstellt, die an beiden Enden einer Röhre bestehen muss, um eine Strömung von 1l/s aufrecht zu erhalten.

Der Atemwegswiderstand kann mittels Ganzkörperplethysmographie, Oszillationsmethode oder Unterbrechermethode bestimmt werden. Der bronchiale Strömungswiderstand setzt sich im Wesentlichen aus den einzelnen Widerständen der mittleren und großen Bronchialabschnitte zusammen. Bei der Messung des Atemwegswiderstandes gilt die Annahme einer proportionalen Beziehung zwischen Druck und Strömung im laminar durchströmten Bronchialsystem, ergänzt durch zusätzlich auftretende turbulente Strömungen. Weitere Determinanten des bronchialen Strömungswiderstandes sind die Geometrie des Bronchialsystems (Durchmesser, Verzweigungswinkel, Oberflächenbeschaffenheit der Schleimhaut), Viskosität und Dichte der Atemgase, Atemstromstärke, Lungenvolumen, Kaliberschwankungen der Bronchien und mögliche Verschlüsse kleiner Luftwege.

Bei der Ganzkörperplethysmographie wird die Strömung in den Atemwegen meist pneumotachographisch gemessen und die Druckdifferenz zwischen Mund- und Alveolardruck bestimmt. In einer luftdicht abgeschlossenen Kammer führen respiratorisch bedingte Änderungen des Alveolardrucks zu Änderungen des Lungenvolumens, die als Kammerdruckänderungen erfasst werden. Alveolardruckschwankungen führen zu Kammerdruckschwankungen, die gegen die gleichzeitig registrierte Atemstromstärke aufgezeichnet werden. Dabei stellt die Neigung der Geraden den Strömungswiderstand dar.

Bei druckkonstanten Messverfahren führen Alveolardruckschwankungen zu Volumenänderungen der Kammer. Diese werden mittels eines Pneumotachographen oder eines Spirometers erfasst und ermöglichen die Messung auch geringer Volumenänderungen. Volumenkonstante Plethysmographen sind eher geeignet für die Messung schneller Volumenänderungen bei relativer Unempfindlichkeit gegenüber Druckschwankungen.

Die erstellte Kurve wird bestimmt durch Durchmesser, Länge und Form der Atemwege, Atemphase, Stromstärke und Kompression und zeigt eine gute Validität bei der Erfassung chronischer Atemwegsobstruktionen und –restriktionen (111).

2.5 Pharmakologische und mechanische Beeinflussungs- möglichkeiten des kompensatorischen Lungenwachstums

Das kompensatorische Lungenwachstum nach partieller Pneumonektomie entspricht nicht einer einfachen Rekapitulation des normalen Reifungsprozesses. Unterschiedliche Studien haben bereits seine komplexen Auslösemechanismen und Beeinflussungsmöglichkeiten an verschiedenen Säugetierspezies erforscht. Als mögliche Auslösemechanismen des Lungenwachstums wurden dabei der ausgeübte mechanische Zug, die transiente Hypoxie und der gesteigerte Blutstrom in den pulmonalen Gefäßen angesehen. Ebenfalls Bedeutung für das Ausmaß des kompensatorischen Wachstums hat, wie oben erwähnt, das Alter des Versuchstieres sowie das Ausmaß der Gewebsresektion. Hundewelpen zeigten nach linksseitiger Pneumonektomie nur ein partielles, nach rechtsseitiger Lungenresektion jedoch ein vollständiges kompensatorisches Lungenwachstum der verbliebenen Lunge mit vollständiger Wiederherstellung der Gasaustauschkapazität. Ausgewachsene Hunde erreichten nur Werte zwischen 70- 80% (73,167).

Die Wirkung pharmakologischer Parameter und Regulationsmechanismen des Körpers wurde an verschiedenen Modellen untersucht. Weitere Studien beschäftigten sich mit der Beeinflussung des Wachstums nach Einbringen einer Lungenprothese (74).

2.5.1 Pulmotrophe Faktoren

2.5.1.1 Retinoide

Exogen zugeführte Retinoide können während der Entwicklung das normale Muster verschiedener Gewebestrukturen entscheidend verändern. Retinoide gelten als Signalmoleküle, die bei Säugetieren eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und – ausreifung spielen. Exogene Retinolsäure führt zu einer Beeinflussung der Genexpression, welche die Formation und Verzweigung des Bronchialbaumes steuert, ein Mangel an Retinolsäure hat eine abnormale, tracheale Morphologie zur Folge (88).

Die Rezeptoren der Retinolsäure können den Familien der Retinolsäure Rezeptoren (RAR) sowie den Retinoid X Rezeptoren (RXR) zugeordnet werden. Diese Rezeptoren sind intrazelluläre, Liganden-bindende Transkriptionsfaktoren. Sie haben bezüglich der Alveolarisierung unterschiedliche Funktionen. RAR γ , heterodimerisiert mit RXR α ,

vermittelt Signale, die für die Alveolarisierung notwendig sind. $RAR\alpha$ beeinflusst die Alveolarisierung nicht während der ersten 2 postnatalen Wochen, aber seine Abwesenheit verlangsamt die Alveolarisierung nach Tag 20 in der Maus (115). $RAR\beta$ ist ein endogener Inhibitor der Alveolarisierung während, aber nicht nach den initialen 3 Wochen der Postnatalperiode (116).

Retinolsäure kann die durch Dexamethason induzierte Hemmung der Alveolarisierung vermindern (63), sowie bei Applikation während chronischer Hyperoxie die O_2 -inhibierte Alveolarisierung bei anschließender Normoxie nachträglich wieder aufholen lassen (113). Bei Verabreichung von Retinolsäure nach Pneumonektomie kam es zu einer Verstärkung des kompensatorischen Wachstums in Form einer Zellhyperplasie.

2.5.1.2 Glukokortikoide und Thyroidhormon

Glukokortikoide und Thyroidhormone haben eine synergistische Wirkung auf die Lungenreifung; wie die Sympathomimetika beschleunigen sie die fetale Lungenentwicklung durch Steigerung der Surfactantbildung. Einige Studien haben gezeigt, dass Thyroidhormone allein nur geringe Effekte auf die Synthesemechanismen haben (128,157), in Kombination mit Glukokortikoiden allerdings über die Thyrotropin-releasing Hormone eine Katalyse der Surfactantsynthese und Lungenfunktion sowohl im Menschen als auch in Tieren erzielt wird (76,146,158,159).

Die von der Schilddrüse sezernierten Hormone Thyroxin (T_4) und Trijodthyronin (T_3) beeinflussen den Stoffwechsel des Körpers, was sich in einem erhöhten Sauerstoffbedarf widerspiegelt. Hypothyreoidismus führt zu einer signifikanten Senkung des Sauerstoffverbrauchs, ohne das Lungengewicht, das Lungenvolumen oder die Gesamtalveolenoberfläche zu reduzieren. Im Gegensatz dazu tritt bei Hyperthyreoidismus eine signifikante Steigerung des Sauerstoffbedarfes, verbunden mit einer Reduktion des Lungengewichtes, der gesamt-Alveolenoberfläche und der Alveolenzahl auf (168). Begleitend dazu sind bereits T_3 -Rezeptoren in den Alveolarzellen der Lungen von Kaninchen (108) und Ratten (123) lokalisiert worden.

Im Hungerversuch zeigten Ratten einer Verminderung der alveolären Oberfläche, möglicherweise ausgelöst durch eine Senkung des Grundumsatzes und des Sauerstoffverbrauches (112).

Die T₄-Wirkung resultiert in einer beschleunigten Lungenreifung durch Ausdünnung der alveolären Wände und einer Steigerung der Lamellarkörperanzahl in den Typ II-Pneumozyten (184), die des T₃ in einer Steigerung der Konzentration an ungelöstem Phosphatidylcholin und der Gesamtphospholipide, verbunden mit einer Senkung der antioxidanten Enzyme (162).

Der Wirkmechanismus von Glukokortikoiden auf die Lungenentwicklung war lange unklar. Es konnte nachgewiesen werden, dass die beschleunigte Lungenreifung durch eine erhöhte Aktivität der Thyroidhormone hervorgerufen wird, außerdem wurde nach Betamethasongabe eine erhöhte Anzahl von Typ-II-Zellen in Balb-c-Mäusen festgestellt. In hypothyroiden Mäusen verbessert pränatal verabreichtes Betamethason den Alveolar-Parenchym- und den Glykogen-Zellkern-Quotienten, was auf eine beschleunigte Reifung der pulmonalen Ultrastruktur schließen lässt. Diese Effekte wurden auf die stimulierende Wirkung von Glukokortikoiden zurückgeführt (4).

Menschlichen Feten wird bei drohender Frühgeburt, d.h. vor einem Gestationsalter von mindestens 32 Wochen und Surfactantmangelsyndrom, etwa bei diabetischen Müttern, Betamethason zur Beschleunigung der Lungenreife und Erhöhung der Surfactantbildung verabreicht (129). Neuere Ansätze prüfen die Wirkung von Surfactantgaben zur Verhinderung des Frühgeborenen-Respiratorischen Distress Syndroms (RDS), nach Mekoniumaspiration und bei dem akuten respiratorischen Distressyndrom des Erwachsenen (ARDS) (56,80,174). Unbehandelt entwickeln 60% aller Frühgeborenen ein RDS, welches mit einer Mortalität von 50% einher geht (15).

Hierbei zeigte synthetischer Surfactant, welcher nur aus Lipiden besteht, gute klinische Ergebnisse bei der RDS-Therapie, während der natürliche Surfactant, welcher die Oberflächenproteine B und C (SP-B, SP-C) enthält, effektiver einen Pneumothorax und ein Lungenödem im Verlauf dieser Erkrankungen verhindert (67,154).

2.5.1.3 Wachstumshormone

Niedrige Spiegel oder das Fehlen von Wachstumshormonen führen typischerweise zu einer reduzierten Körpergröße mit einer proportionalen Reduktion der Lunge-zu-Körpergewicht-Ratio (47). Gegenteiliges gilt für eine übersteigerte Produktion (6,23,62). Folgerichtig scheinen die Effekte der Wachstumshormone indirekter Natur zu sein, da das Ausmaß des Lungenwachstums proportional zum somatischen Wachstum bleibt.

Rezeptoren der Wachstumshormone sind bereits in den Lungen von adulten und fetalen Ratten lokalisiert worden (2,3), nicht allerdings in humanen Lungen (96).

Neben ihren Wirkungen auf die normale Lungenentwicklung wird vermutet, dass Wachstumshormone auch die Regulation des kompensatorischen Wachstums beeinflussen (22,94). Erhöhte Konzentration von Wachstumshormonen sind in Ratten bereits drei Tage nach partieller Pneumonektomie beobachtet worden (94), also zu dem Zeitpunkt, an dem die Steigerung der Lungenmasse beginnt (143). Ratten, denen zwei Wochen vor der partiellen Pneumonektomie ein Wachstumshormon-sezernierender Tumor implantiert wurde, zeigten im Vergleich zu pneumonektomierten Tieren ohne Tumor eine um 35% erhöhte totale Lungenkapazität (22) bei gleichzeitig verringerter DNA-Konzentration. Folglich inhibieren Wachstumshormone in diesem Modell die Zellteilung und verursachen eine Vergrößerung der durchschnittlichen Zellgröße (23).

Einschränkungen in den Interpretationsmöglichkeiten dieser Messungen ergeben sich durch die Tatsache, dass die implantierten Tumoren auch eine gesteigerte Sezernierung von Prolactin und ACTH induzieren. Prolaktinrezeptoren sind in den Lungen von Ratten (10) und Kaninchen (3) nachgewiesen worden; in vitro moduliert Prolaktin die Surfactantsynthese fetaler Lungen (121), hohe ACTH-Konzentrationen steigern den Glukokortikoidspiegel des Blutes durch direkte Wirkung auf die Nebennierenrinde.

2.5.1.4 Wachstumsfaktoren

Untersucht wurden verschiedene Wachstumsfaktoren, die eine Rolle bei der Entwicklung der Lunge und bei Entzündungsreaktionen und Reparaturvorgängen spielen. Dabei handelt es sich vornehmlich um den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (IGF), den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), den Wachstumsfaktor der Hepatozyten (HGF), den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF). Ihnen allen wird eine pulmotrophe Wirkung zugeschrieben (176).

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I/ IGF-II) übersetzen hormonelle Signale und mechanische Kräfte in zelluläre Proliferationssignale. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sie eine Rolle beim kompensatorischen Wachstum spielen. Zu diesem Zweck wurden Ratten in drei Gruppen untersucht, wobei eine Gruppe einer normalen Pneumonektomie unterzogen wurde, eine zweite zusätzlich eine Lungenteilprothese eingesetzt wurde und die dritte die Kontrollgruppe darstellte. Es wurde festgestellt, dass es

bei allen pneumonektomierten Tieren bereits am ersten Tag nach der Operation zu einem Anstieg der IGF-bindenden Proteine kam, während die Menge der Lungen-IGF-I-mRNA und das Serum-IGF-I sich nicht veränderten (133).

Gleichzeitig findet man eine erniedrigte IGF-I-Genexpression bei experimentell erzeugten diaphragmalen Hernien in Lammfeten (130).

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) wurde identifiziert als eine essentielle Komponente im regulatorischen Netzwerk der embryonalen Lunge. Er ist beteiligt an der Proliferation, der Differenzierung und Anordnung verschiedener Zelltypen (100). Jankov et al. untersuchten die Rolle des FGF an Hand von neugeborenen Ratten, welche einer Hyperoxie mit 95%igem Sauerstoff ausgesetzt wurden. Diese Ratten zeigten binnen einer Woche ein gehemmtes Lungenwachstum, sowie verminderte DNA-Synthese und sekundäre Septierung. Nach dem Umsetzen in Raumluft erfolgte eine Normalisierung dieser Parameter. Mittels Northern und Western Blot wurden Untersuchungen für den FGF-Rezeptor 1 und dessen Liganden, den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) durchgeführt, die zeigten, dass die Expression des bFGF in der Lunge nach siebentägiger Exposition mit 95%igem Sauerstoff signifikant erniedrigt war, während die Rezeptordichte unverändert blieb. Nach dreitägigem Aufenthalt der Ratten in Raumluft stieg die bFGF-Expression an. Jankov et al. schlossen darauf auf einen Zusammenhang zwischen der bFGF-Konzentration und den Restrukturierungsprozessen des Lungengewebes (79).

Hepatozyten-Wachstumsfaktoren (HGF) stimulieren die Proliferation des respiratorischen Epithels nach der Pneumonektomie, ihre Rezeptoren werden vornehmlich an Alveolarzellen Typ II und den Atemwegsepithelzellen exprimiert; nach der Operation kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Serum-HGF. Sie wirken sowohl mitogen als auch morphogen, vor der Steigerung der DNA-Synthese in den Lungenepithelzellen steigt die Expression der HGF-mRNA in der verbleibenden Lunge, der Leber und den Nieren an, verbunden mit einer Erhöhung der HGF-Plasmakonzentration. Bei Hemmung des HGF durch spezifische Antikörper tritt bei der pneumonektomierten Maus eine Hemmung des kompensatorischen DNA-Synthese-Anstieges in den epithelialen Zellen auf (151).

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein bioaktives Peptid, welches die späte Entwicklung der fetalen Lunge durch Stimulation der Organogenese und der Surfactantsynthese fördert (147) und damit eine entscheidende Rolle in der prä- und postnatalen Entwicklungsphase der Lunge spielt. In der pneumonektomierten Maus ist eine

Steigerung seiner Konzentration involviert in den Prozess der Hyperplasie und Hypertrophie der Alveolen (90).

Wiederholte Injektionen von exogenem EGF während des Intervalls des verstärkten Wachstums bei der Ratte steigerten das Lungenvolumen und –gewicht sowie die EGF-Rezeptordichte im Vergleich zu unbehandelten, unilateral pneumonektomierten Tieren (91).

In weiteren Studien verglichen Kaza et al. das unterschiedliche Wachstumsverhalten der verbleibenden Lungenanteilen nach Lobektomie und nach Transplantation. Dabei zeigte sich, dass das Lungenwachstum nach Lobektomie zwei Wochen post interventionem am stärksten ausgeprägt war bei gleichzeitig erhöhtem Zellproliferationsindex, während die transplantierte Lunge einen signifikanten Anstieg der Zellproliferation erst nach drei Monaten erreichte. In beiden Studien zeigte sich allerdings zu diesen Zeitpunkten die höchste Konzentration des EGF (87).

Im Kontrast zu den beschriebenen Untersuchungsergebnissen postulierten Foster et al., dass nur die normale Lungenentwicklung mit gesteigerter EGF-Synthese verbunden sei. In ihren Studien ergab sich bei partiell pneumonektomierten Tieren keine Signifikanz für vermehrte Expression von EGF oder dessen Rezeptoren. Vielmehr zeigte sich ein Anstieg der Surfactantproteine A und D (61).

Verschiedene Untersuchungsansätze liegen auch bezüglich der Expression des transforming-growth-factor alpha (TGF- α) vor. TGF- α liegt in den Zellen des respiratorischen Epithels ab dem ersten Lebenstag vor. Transgene Mäuse mit TGF- α -Überexpression entwickeln während der postnatalen Alveologenese Emphyseme und Fibrosen der Lunge, letzte allerdings nur bei sehr starker Überexpression, womit eine Dosisabhängigkeit des Remodelings der Lunge transgener Mäuse nachgewiesen wurde. Des weiteren kam es bei neugeborenen Mäusen im Reifeprozess zusätzlich zu physiologischen Abnormalitäten einschließlich deutlich vergrößerter parenchymaler Luftwege, pulmonaler Fibrose, Atemwegsobstruktionen und erhöhter Compliance (68,69). Physiologisch allerdings lässt sich sowohl im Serum als auch in bronchoalveolärer Flüssigkeit ein Anstieg der TGF- α -Konzentration nach partieller Pneumonektomie nachweisen (49). Des Weiteren entwickeln Mäuse mit einer TGF- α -Überexpression pulmonalen Hochdruck und eine abnormale distale Ausdehnung der Muskulatur der kleinen Pulmonalarterien (101).

TGF- β und der TGF- β -Rezeptor (TGFR- β) sind an der Regulation der Proliferation und Differenzierung diverser Zelltypen der Lunge beteiligt. Nach chronischer Exposition mit 9,5% Sauerstoff zeigten junge Ratten einen Arrest der Alveolarisierung, verbunden mit einer Senkung des bioaktiven TGF- β in der Bronchialflüssigkeit und eine erhöhte Expression des TGFR- β . In adulten Tieren wurden diese Effekte nicht gefunden (173).

Umfassende Untersuchungen liegen für den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) vor. Intratracheal instilliertes KGF ist ein Mitogen der mikrovaskulären Zellen und stimuliert die Proliferation der Alveolar-Typ-II und Bronchialepithelzellen (53,182). Schwächer fällt diese Stimulation bei der intravenösen Applikation aus, andererseits verhindert präventiv verabreichtes KGF die Bleomycin-induzierte Lungendysfunktion bzw. -fibrose in Mäusen und Ratten (66). Inkorporation von Bromo-desoxyuridin (BrdU), welches zum Nachweis von Zellproliferation verwendet wird, ergab, dass es bei KGF-Instillation zu einer Proliferation der Clarazellen kommt. Clarazellen sind eingebunden in die Prozesse der Reparatur der Atemwegsepithelzellen, dem transmembranären Transport von Ionen und Flüssigkeit sowie die Modulation entzündlicher Vorgänge der Lunge. Bei Vorbehandlung mit KGF kommt es in der Ratte zu einer verbesserten Heilungstendenz einer experimentell erzeugten Lungenverletzung. Somit könnte die protektive Wirkung des KGF auf das Epithel begründet sein in der Stimulation der Clarazellen (5,54).

Spätere Studien untermauerten die protektive Wirkung des KGF. Atabai et al. wiesen nach, dass KGF die Reparatur der alveolären Epithelzellen auch über nicht-proliferative Mechanismen beeinflusst. Nach intratrachealer Instillation zeigen KGF stimulierte Zellen eine signifikant erhöhte Reparaturrate der epithelialen Zellen, eine erhöhte Ausbreitung und Migration am Wundrand und gleichzeitig gesteigerte Adhärenz gegenüber extrazellulären Matrixproteinen als nicht behandelte Kontrollzellen. Die Hemmung des EGF mit Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche konsekutiv die Expression des Surfactantproteins A der humanen, pulmonalen Epithelzellen senkt (95), heben den positiven Effekt des KGF auf die epitheliale Regeneration auf (5).

Kaza et al. überprüften unter anderem die funktionellen Auswirkungen der KGF-induzierten alveolären Zellproliferation in der Ratte. Sie stellten eine signifikante Erhöhung des Lungengewichtes, des Lungenvolumens im Verhältnis zum Körpergewicht und der alveolären Zellen fest (89).

Sowohl an der Alveologenese als auch an der Angiogenese ist der Blutplättchenwachstumsfaktor (PDGF) beteiligt.

PDGF-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die durch Phosphorylierung Proteine, die SH2-Gruppen tragen (39,92), aktivieren und so Zellwachstum und -differenzierung induzieren (166). Man unterscheidet vier Liganden, PDGF-A, -B, -C und D, von denen PDGF-C und -D erst in den letzten Jahren entdeckt wurden (105). Die Monomere des PDGF bilden die Homodimeren AA, BB, CC und DD, sowie das Heterodimer AB (13,71). Diese PDGF-Isoformen entfalten ihre zellulären Effekte über unterschiedliche Affinitäten zu den zwei Rezeptortyrosinkinasen PDGFR- α und - β (1,13).

PDGF-Rezeptoren (PDGFR) befinden sich normalerweise auf Bindegewebszellen, die auf PDGF-Expression unter anderem mit Proliferation, Migration, Kontraktion oder Zytokinproduktion reagieren können (14). Gleichzeitig ist PDGF an der Pathogenese der Arteriosklerose und Lungenfibrose beteiligt (104,188). Diese Fibrose kann aber laut Shimizu et al. durch aktiviertes Protein C verhindert werden. Protein-C-Rezeptoren werden von pulmonalen Epithelzellen und Makrophagen in vitro exprimiert (156).

PDGF-A wird von den Zellen des sich entwickelnden Lungenepithels exprimiert; an den distalen Verzweigungstellen lassen sich in der pseudoglandulären Phase Ansammlungen von PDGFR- α -positiven mesenchymalen Zellen nachweisen. In der kanalikulären und sakkulären Phase gehen aus diesem Mesenchym glatte Muskelzellen und Fibroblasten entlang der distalen Tubuli hervor (107).

PDGF-A-knockout-Mäusen fehlen diese distalen Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Die Zellen verbleiben am proximalen Ende der terminalen Bronchiolen. Diese Tiere entwickeln unmittelbar nach der Geburt ein sekundäres Emphysem aufgrund einer ungenügenden alveolären Septierung und Entwicklung der Alveolen aus den Sacculi (17), sowie einer mangelnden Bildung von Elastinfasern (18,131) und versterben 2-6 Wochen postnatal (161).

PDGF-B- sowie PDGF-R β -knockout Mäuse versterben in der späten Gestationsphase oder unmittelbar nach der Geburt an Blutungen, verursacht durch Gefäßwanddefekte und den Blutdruckanstieg im wachsenden Organismus. Außerdem zeigen sie kardiale Defekte und eine abnormale Struktur der Nierenglomeruli (103,160). Die Tiere zeigen Hämorrhagien, vermutlich verursacht durch Mikroaneurysmen, deren Entstehung wiederum auf einen Perizytenmangel zurückzuführen ist. Die Proliferation der Perizyten wird als wichtige Voraussetzung für die Ausdehnung und Entwicklung des Gefäßnetzes, sowie dessen Organisation und Stabilisierung angesehen (106).

PDGF-BB scheint keine wesentliche Rolle in der Regulation des kompensatorischen Lungenwachstums einzunehmen. Fünf Tage nach linksseitiger Pneumonektomie zeigte sich in den untersuchten Tieren zwar einen Anstieg der PDGF-BB-mRNA und des PDGF-BB, dieser fiel aber im Vergleich zu der β -Aktin-mRNA und dem Gesamtproteingehalt eher gering aus (186).

PDGF-C wird in adultem Gewebe vornehmlich in der Leber, den Nieren, den Hoden, dem Herzen und dem Gehirn exprimiert. Während der Entwicklungsphase fällt die PDGF-C-Expression dynamischer aus: neben den Nieren, der Lunge und dem Gehirn kann man es insbesondere in sich entwickelnden epidermalen Strukturen nachweisen (1).

Unter limitierter Proteolyse zeigte sich eine Aktivierung von PDGF-DD, welches als spezifischer Agonist für PDGFR- β angesehen wird (13). Bergsten et al. sehen dies als einen Hinweis auf den Einfluss von PDGF-D auf die Entwicklung und Pathophysiologie unterschiedlicher Organsysteme. Unter PDGF-D-Wirkung kommt es unter anderem zu einer Induktion der Transformation von NIH/3T3-Zellen, welche daraufhin eine Reorganisation von Stressfasern, eine erhöhte Proliferationsrate und die Fähigkeit einer Tumorinduktion zeigen. Des Weiteren tritt ein signifikanter Anstieg der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) auf (104).

2.5.1.5 Wachstumsfaktoren der Angiogenese

Die vorzeitige Entbindung ist ein häufiges Problem der Geburtshilfe, betrifft etwa 10% der Geburten und geht auch heute noch mit einer hohen Sterblichkeitsrate einher (65). Häufig entwickeln die Frühgeborenen ein Atemnotsyndrom (RDS), welches auf die mangelnde Surfactantproduktion der unreifen Alveolarzellen zurückzuführen ist. Als Surfactant bezeichnet man eine Mischung aus Phospholipiden und Surfactant-assoziierten Proteinen (SP-A bis D), welche die Oberflächenspannung in den Alveolen herabsetzt (19). Durch intensivmedizinische Betreuung und Behandlung mit Sauerstoff und Steroiden wurde der Sterblichkeitsrate erfolgreich entgegengesteuert, allerdings entwickeln viele Kinder im weiteren Verlauf eine bronchopulmonale Dysplasie oder andere chronische Lungenerkrankungen (93). Steroide bewirken eine frühzeitige Reifung der Alveolen, können jedoch im weiteren Verlauf eine Lungenentwicklungsstörung bedingen (34).

Des weiteren hemmen Steroide die VEGF-Induktion (16), die für eine reguläre Morphogenese der Lunge essentiell ist.

Für die normale Lungenentwicklung ist die Interaktion zwischen den Luftwegen und den Blutgefäßen von entscheidender Bedeutung (78). Die de-novo Synthese der Gefäße wird als Vaskulogenese bezeichnet, Angiogenese beschreibt die Ausbildung neuer Gefäße aus bereits Existierenden. Die Initiierung der Angiogenese geht einher mit Vasodilatation und einer erhöhten Permeabilität des Gefäßes (48). Einen Schlüsselfaktor der Angiogenese während der Lungenentwicklung stellt der vom distalen Epithel gebildete vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) mit seinen Rezeptoren und Isoformen dar. VEGF wird während der Lungenentwicklung an den Spitzen der epithelialen Tubuli exprimiert und stimuliert hier die Vaskularisierung. Die sich entwickelnden Gefäße folgen dabei dem VEGF-Gradienten (70). In der adulten Lunge wird VEGF durch respiratorische Epithelzellen (187), welche VEGF möglicherweise überwiegend gezielt nach apikal sezernieren (86), sowie durch Alveolarmakrophagen exprimiert. Die genauen Regulationsmechanismen sind bisher noch nicht gut verstanden. VEGF-Expression kann durch spezifische Transkriptionsfaktoren, die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF-1alpha, HIF-2alpha, HIF-3alpha), reguliert werden. Eine Sauerstoff-abhängige VEGF-Regulation durch HIF-1alpha scheint beim Lungenwachstum nicht zu dominieren (51,57,171). Neue Arbeiten legen eine Rolle des auch in Normoxie exprimierten HIF-2alpha bei der Lungenreifung und dem Lungenwachstum nahe. Dies trifft insbesondere für die späte Fetalperiode zu; ein Mangel an VEGF führt hier zu einer kugeligen Verformung der Epithelzellen und zu einem RDS des Neugeborenen im Tierversuch (41).

Basierend darauf wird die therapeutische Relevanz des VEGF für Frühgeborene erforscht. Brown und England stellten fest, dass exogenes VEGF das Wachstum der Lungenepithelzellen in vitro stimuliert. Dabei zeigten sich eine erhöhte Epithel- und Lumen-Volumen-Dichte des Gewebes, sowie eine erhöhte Zellproliferationsrate der distalen Atemwegsepithelzellen (26).

Ein HIF-2 α -Mangel führt laut Compornolle et al. zu einem fatalen RDS der neonatalen Maus, verbunden mit einer insuffizienten Surfactantproduktion der Alveolarzellen, welche durch einen sekundären VEGF-Mangel verursacht wurde. Postnatal intratracheal instilliertes VEGF stimulierte die Konversion von Glykogen zu Surfactant in frühgeborenen Mäusen und verhinderte partiell das Auftreten eines RDS. Die HIF-2 α abhängige Genexpression (VEGF, VEGF-Rezeptor 2) könnte eine entscheidende Rolle in

der Kontrolle der Glykogen-Surfactant-Konversion einnehmen. Die Glykogenolyse gilt als ein kritischer Schritt der Lungenreifung und ist unter anderem bei Kindern diabetischer Mütter gestört.

Insgesamt wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass die Abwesenheit von HIF-2 α zur Verminderung von pulmonalem VEGF und einer mangelhaften Ausreifung des respiratorischen Epithels mit Surfactantmangel in der späten Fetalperiode führt (41).

Wie eingangs erwähnt, kann durch Steroide eine Hemmung der VEGF-Induktion erreicht werden. Studien haben gezeigt, dass es in dem normalen Lungenreifungsprozess zu einem parallelen Anstieg von VEGF und seinem Rezeptor Flk-1 kommt. Eine Behandlung mit Dexamethason führte zu einem signifikanten Absinken dieser Parameter (16).

Eine weitere Beobachtung deutet auf eine Interaktion des VEGF und der NO-Synthetase (eNOS) hin, da das freigesetzte, vasodilatative Stickstoffmonoxid (NO) ein wichtiger Mediator der VEGF-vermittelten Angiogenese ist. Leuwerke et al. zeigten anhand von Mäusen mit eNOS-Defekt, dass es durch diese fehlende Induktion der Angiogenese zu einer signifikanten Reduktion der gasaustauschenden Flächen, sowie des Lungengewichtes und –volumens kommt. NO-Synthetase wird physiologisch durch den erhöhten Dehnungs- und Scherstress nach unilateraler Pneumonektomie induziert und scheint mit der Entstehung der alveolären Hyperplasie in Verbindung zu stehen (102). Chinoy et al. zeigten in ihren Untersuchungen eine Korrelation von VEGF/ Flk-1 Minderexpression und hypoplastischen Lungen (38).

Mäuse mit einer TGF- α -Überexpression zeigen eine abnormale Morphologie der pulmonalen Gefäße, bei gleichzeitig verminderter Expression des VEGF. Hieraus lässt sich auf einen Zusammenhang zwischen VEGF-Mangel und der Pathogenese pulmonaler Gefäßerkrankungen schließen (101).

Endostatin ist ein natürlicher Inhibitor der Angiogenese. Fumagillin, Thalidomid und Marimastat hemmen die Angiogenese auf unspezifische Art (82). Bei Injektion dieser Substanzen in neugeborene Ratten zeigten diese nach zwei Wochen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe eine erniedrigte Lungengewicht- zu- Körpergewicht- Ratio, sowie eine deutlich verminderte Dichte der pulmonalen Arterien und eine reduzierte Alveolarisierung. Mit dem selektiven VEGF-Rezeptor-2 Inhibitor SU-5416 wurde ebenfalls eine verminderte Alveolarisierung und Arteriendichte nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen Angiogenese und Alveolarisierung vermuten (78).

2.5.1.6 Transkriptionsfaktoren

Die Hypothese, dass die vermehrte Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Zellentwicklung, Differenzierung und das Wachstum durch Bindung an spezifische DNA-Regionen regulieren, den Wachstumsprozess der Lunge nach Pneumonektomie steuern, wurde anhand von C57BL/6N-Mäusen überprüft. Die quantitative Bestimmung der mRNA ergab zwei Stunden nach der Pneumonektomie eine erhöhte Konzentration von sechs Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu der nicht operierten Kontrollgruppe. Es handelte sich um das early-growth-response-gene 1 (Egr-1), welches den stärksten Anstieg zeigte (Faktor 4,7), Nurr 77, Tristetraprolin, den primären Hemmstoff des Nuklearfaktors kappa B (I kappa B alpha), den gut-enriched Kruppel-like Faktor (GKLF) und LRG-21.

Egr-1, Nurr 77, LRG-21 und Tristetraprolin spielen eine Rolle in der Stressantwort, der vaskulären Biologie, der Embryologie und der zellulären Entwicklung.

Gleichzeitig wurde die transiente Natur dieser gesteigerten Expression nachgewiesen; nach 24 Stunden hatte die Konzentration der Faktoren bereits wieder deutlich abgenommen (97).

Auch die Forkhead-Box (Fox)-Familie der Transkriptionsfaktoren ist beteiligt an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung. Mangelnde Foxf1-Expression führt zu einem Anstieg der alveolären Endothelzellapoptose und zu einer Unterbrechung der kapillären Integrität. Neugeborene foxf1^{+/-}-Mäuse mit vermindertem Foxf1-Spiegel zeigten eine abnormale Formation der Alveolen und pulmonalen Kapillaren und verstarben größtenteils postnatal. Die überlebenden foxf1^{+/-}- Tiere zeigten einen erhöhten pulmonalen Foxf1- Spiegel und eine normale Morphologie.

Weitergehende Studien von Kalinichenko et al. an pneumonektomierten foxf1^{+/-}- Mäusen, bei denen durch Instillation von Butylenhydroxytoluol eine Hämorrhagie induziert wurde, zeigten eine drastische Senkung der Flk-1-Expression, des Surfactantproteins B und anderen Faktoren, die wichtig für die Lungenmorphogenese und die Hämostase sind. Aus diesen Ergebnissen schlossen sie auf die entscheidende Bedeutung von Foxf1 für den normalen Ablauf der Lungenzellregeneration nach Verletzungen (83).

2.5.1.7 Hypoxie

Ratten, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten werden, zeigten einen Anstieg des Tidalvolumens und der Diffusionskapazität (8,35). Neugeborene Ratten, die hypoxischen Verhältnissen ausgesetzt sind, haben ein reduziertes Wachstumsverhalten, während das Lungengewicht und die Lungengewicht-zu-Körpergewichtsratio ansteigen (43). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei Menschen, die sich längere Zeit in der Höhe aufhalten haben (25). Mäuselungen weisen charakteristische Veränderungen ihres Lungenvolumens auf. Dies führte zunächst zu der Vermutung, dass Hypoxie das kompensatorische Wachstum fördert (126). Vicencio et al. zeigten allerdings in neueren Untersuchungen, dass es bei neonatalen Mäusen und Ratten unter hypoxischen Bedingungen zu einem Arrest der Alveolarisierung kommt (173).

Bei der Thorakotomie gleicht sich der intrapleurale Druck dem Atmosphärendruck an und bewirkt so einen Kollaps der Lunge. Frühere Studien sahen diese perioperative Hypoxie als ein mögliches Signal der Wachstumsinitiierung an. Der Einsatz von Intubation und Beatmung führte allerdings nicht zu einer Veränderung der Gewebeantwort, trotz der signifikant verbesserten Parameter für P_{O_2} , P_{CO_2} und pH-Wert, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass die transiente, chirurgisch ausgelöste Hypoxie ein derartiges kompensatorisches Lungenwachstum initiieren kann (85).

2.5.1.8 Mechanischer Zug

Eine entscheidende Rolle in den Mechanismen des kompensatorischen Lungenwachstums spielt der mechanische Zug, der auf das verbliebene Gewebe ausgeübt wird.

Wie unten näher erläutert, verhindert Auffüllen des freigewordenen Hemithorax mit Materialien wie Schwämmen oder Wachs die mediastinale Verschiebung und führt damit zu einer Hemmung des kompensatorischen Wachstums. Entfernt man allerdings die Prothese nach einem Zeitraum von drei Wochen bis neun Monaten, läuft dieses in der beschriebenen Art und Weise ab (117,185).

Der genaue Ablauf der Mechanosignaltransduktion ist bis dato nicht bekannt. Rizzo et al. prüften die kapilläre Antwort auf Perfusionsveränderungen. Die Kapillaren enthalten spezialisierte, cholesterinreiche Membraninvaginationen, Caveolae genannt. Caveoline binden Cholesterin und bilden Haarnadelstrukturen in der Membrandoppelschicht, deren Polymerisierung die Ausprägung der Invaginationen hervorruft. Caveolae können

endocytiziert werden. Diese Endocytose wird für den transzellulären Transport von Blutplasmabestandteilen vom luminalen zum basolateralen Raum genutzt.

Bei einer chronischen Erhöhung des laminaren Scherstress kommt es zu vermehrter Ausschüttung und Verteilung des Proteins Caveolin, sekundär zu einer erhöhten Dichte der Caveolae und letztendlich zu einer gesteigerten Sensitivität kultivierter endothelialer Zellen, erhöhter Tyrosinphosphorylierung der luminalen Oberflächenproteine einschließlich Caveolin, und einer Senkung der Ser(1179)-vermittelten eNOS-Phosphorylierung (145,166).

2.5.1.9 Erhöhter Blutfluß

Die verstärkte Gewebedehnung und der erhöhte Blutfluß könnten die entscheidenden Parameter für die Initiierung des kompensatorischen Wachstums sein (134). Die erhöhte Perfusion, entstehend durch ein konstantes kardiales Auswurfvolumen übt ebenfalls einen mechanischen Zug auf das Lungengewebe und erhöhten Scherstress auf das Endothel aus. In vivo (172) und in vitro (84) Experimente haben allerdings ergeben, dass durch die akute Steigerung des pulmonalen Flusses (ca. 50%) eine rasche Anpassung der pulmonalen Zirkulation bewirkt wird und so maximal ein geringer Anstieg des Gefäßdruckes. Zwar wird in einigen Spezies durch chronische Drucksteigerung ein strukturelles Remodeling der vaskulären Muskulatur beobachtet (59), in der Ratte konnte dieses Phänomen nach einer Pneumonektomie aber nicht festgestellt werden (12, 142).

Die Wirkung auf das kompensatorische Wachstum wurde von McBride, Kirchner und Russ mittels einer neuen Technik an Frettchen erforscht. Durch Anbringen einer Ligatur an die arteriellen Gefäße des linken Kaudallappens der Frettchenlunge wurde der post-chirurgische Anstieg des Blutvolumens nach rechtsseitiger Pneumonektomie verhindert. Physiologische und biochemische Analysen ergaben, dass das kompensatorische Wachstum des Kaudallappens vergleichbar ablief zu dem der anderen Lungenteile. Somit konnte der gesteigerte Blutfluß als beeinflussender Faktor ausgeschlossen werden (119).

2.5.1.10 Tocopherol (Vitamin E)

Auch das Antioxidans Tocopherol verstärkt das kompensatorische Wachstum. Dies wurde zunächst in vitro nachgewiesen und später an der fetalen Rattenlunge. Es kam zu einem signifikanten Anstieg des Lungengewichts, der Gesamt-DNA-Menge und des Proteingehaltes (77).

Pulmotrophe Faktoren			
		Wirkmechanismus	Wirkung
Retinode		Beeinflussung der Genexpression	tracheale Morphologie fetale Organogenese
Glukokortikoide/ Thyroidhormone		Wachstumssynergismus/-katalysation aktive Formen: T3/T4	gesteigerte Surfactantbildung, verbesserte Lungenfunktion
Wachstumshormone		Inhibierung der Zellteilung, Anstieg der Zellgröße	proportionales Körperwachstum, evtl. Beeinflussung des Lungenwachstums
Wachstumsfaktoren	IGF I/II	Aussendung zellulärer Proliferations- Signale	
	FGF	O ₂ -abhängiges Wachstum	verbessertes Lungenwachstum, gesteigerte DNA-Synthese, Restrukturierungsprozesse
	HGF	mitogen und morphogen	Proliferation des respiratorischen Epithels
	EGF	Anstieg der Surfactantproteine	gesteigertes Lungenwachstum, -gewicht
	TGF- α		dosisabhängiges Remodeling
	KGF	protektiv, nicht-proliferative Mechanismen	Proliferation der Alveolar- und Bronchialepithelzellen Verhinderung Dysfunktion, Fibrosen
	PDGF	Kompetenzfaktor, rezeptorvermittelte Signalleitung	Zellstimulation, Alveologenese Angiogenese
VEGF		Konversion Glykogen- Surfactant	reguläre, pulmonale Morphogenese, Stimulation der Vaskularisierung,
eNOS		Ausschüttung bei erhöhtem Dehnungs- und Scherstress	VEGF-vermittelte Angiogenese
Transkriptionsfaktoren	Egr-1, Nurr 77, Tristetraprolin, GKLF, LRG-21		Stressantwort, Vaskularisierung, zelluläre Entwicklung
	Foxf1		kapilläre Integrität, Zellproliferation und Differenzierung
Hypoxie		Veränderung des Lungenvolumens und der alveolären Struktur	Anstieg Tidalvolumen, Diffusionskapazität
mechanischer Zug		Gewebedehnung	normales kompensatorisches Wachstum
erhöhter Blutfluß		erhöhte Perfusion, erhöhter Scher- stress des Endothels (transient)	keine entscheidende Beeinflussung des Wachstums
Tocopherol			Verstärkung des Wachstums

Tabelle 2.1 – Zusammenfassende Darstellung der pulmotrophen Faktoren

Die Darstellung gibt einen Überblick über die Faktoren, die das kompensatorische Lungenwachstum fördern.

2.5.2 Negative Beeinflussung des Lungenwachstums

2.5.2.1 Glukokortikoide und Thyroidhormone

Glukokortikoide inhibieren die Formation der alveolären Septen durch Hemmung der Zellteilung. Diese Hypothese wird untermauert durch die Feststellung, dass die Serumkonzentration aktiver Glukokortikoide während der alveolären Septationsperiode absinkt und legt die Vermutung nahe, dass das Wiederansteigen der Hormonkonzentration das Ende der Septationsphase, den Beginn der alveolären Wandausdünnung und das Remodeling der alveolären Gefäße auslöst (31,33,110,114,124).

Hypothyreote Mäuse zeigen nach pränataler Betamethasongabe einen Anstieg der Alveolen-zu-Parenchym-Ratio (4).

Die Konzentration der Thyroidhormone und der entsprechenden Hormonrezeptoren steigt mit dem Beginn der Septation an. Diese Hormone üben einen Einfluss auf die Unterteilung der Sacculi aus und steigern die DNA-Synthese in neugeborenen Ratten (9,125,148).

2.5.2.2 Intrathorakale Platzhalter

Der mechanische Zug, der auf das Gewebe der verbleibenden rechten Lunge nach linksseitiger Pneumonektomie ausgeübt wird, wurde als der Hauptstimulus für das Gewebewachstum angesehen. Erste Studien mit eingesetzten Wachsprothesen zeigten, dass durch diese Verhinderung des mediastinalen Shifts die Lungenexpansion nach Pneumonektomie verhindert werden kann (40).

In neueren Studien wurde linksseitig pneumonektomierten Hunden ein dreidimensionales, aufblasbares Silikonimplantat eingesetzt, das der äußeren Form der entnommenen Lungenhälfte entsprach.

Wurde die Prothese nicht aufgeblasen und blieb damit die pleuromediastinale Beweglichkeit erhalten, zeigte sich eine deutliche laterale Expansion, die das Mediastinum in den linken Hemithorax verlegte, gepaart mit einer Erhöhung des Lungenvolumens.

Bei aufgeblasener Prothese blieb das Mediastinum auf der Mittellinie, eine Ausbeulung des rechten Hemithorax wurde festgestellt, was auf ablaufende Wachstumsprozesse schließen lässt, gleichzeitig trat im Vergleich zu der nicht aufgeblasenen Prothese ein um 30% niedrigeres kapilläres Volumen auf, umgerechnet ein um 60% niedrigeres Kapillarovolumen pro Alveolenoberfläche, gepaart mit einer verminderten Diffusionskapazität; die

Regeneration des Alveolargewebes wurde durch die Verhinderung des mediastinalen Shifts ebenso wie die Lungenexpansion beeinträchtigt.

Des Weiteren kam es bei aufgeblasener Prothese in Verbindung mit einer mikrovaskulären Kongestion zu einer signifikanten Erhöhung des kapillären Blutvolumens (74).

2.5.2.3 Androgene

Die zumindest partielle hormonelle Regulation des kompensatorischen Lungenwachstums wurde durch eine gleichzeitige, bilaterale Adrenalektomie (ADX) belegt. Zwar unterscheiden sich biochemische und morphologische Korrelate von ADX/PNX-Tieren nur geringfügig von PNX-Tieren, es liegt aber ein deutlicher Anstieg der Alveolarwanddicke vor, der durch permanente Gabe exogener Glukokortikoide aufgehoben werden kann. Die ausschließliche Durchführung der Adrenalektomie führt nicht zu einem signifikanten Anstieg des Lungenwachstums (11,136,137,139,140), wohl aber die Durchführung der Adrenalektomie fünf Tage vor der Pneumonektomie. Hier konnte eine deutliche Steigerung der kompensatorischen Antwort (11) sowie eine Verdickung der interstitiellen und endothelialen Zellkompartimente und ein erhöhtes Volumen der epithelialen Typ II-Zellpopulation und der interstitiellen Fibroblastenpopulation (142) nachgewiesen werden. Des Weiteren findet bei der Lungenentwicklung eine ständige Konkurrenz zwischen positiven und negativen Regulatoren der fibroblastären-epithelialen Kommunikation, welche die Differenzierung der Typ II-Zellen kontrollieren, statt. Ein auftretendes Ungleichgewicht dieser Regulationsmechanismen wurde als auslösender Faktor des respiratorischen Distress-Syndroms (RDS) männlicher Neugeborener identifiziert. Es wurde postuliert, dass chronische intrauterine Androgenexposition die Entwicklung der Lungenfibroblasten über eine Senkung der EGF-Expression, bei gleichzeitiger Erhöhung der TGF-Rezeptor-Expression, auslöst und damit eine Senkung der SP-B/C-Konzentration in den Typ-II-Zellen bewirkt. Dammann et al. behandelten trächtige Mäuse mit Dihydrotestosteron und stellten fest, dass chronische Exposition ab der frühen Lungenentwicklung das Gleichgewicht der Wachstumsfaktoren entscheidend beeinflusst. Es kam zu einer reduzierten EGF-Bindung, verbunden mit einer verminderten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung und weiterhin zu einer erniedrigten Bindung des TGF- β -Rezeptors, verbunden mit einer Senkung der TGF- β -vermittelten Zellproliferation (44).

2.5.2.4 Hyperoxie

Die deutliche Beziehung zwischen Sauerstoffbedarf, Alveolengröße und der Größe der alveolären Oberfläche in den Lungen der Säugetiere legt den Schluss nahe, dass Hyperoxie und Hypoxie gegensätzliche regulatorische Einflüsse auf die Größe der alveolären Oberfläche ausüben. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Hyperoxie die Septierung verringert, 95%iger Sauerstoff der Lunge deutliche Schädigungen zufügt (7,29,58,155,177), eine Verlangsamung des Körperwachstums hervorruft (157) und die Volumendichte der Typ-II-Alveolarzellen und der interstitiellen Zellen verändert (42).

Frühgeborene Säuglinge mit Atemstörungen werden mit möglichst niedrigem Sauerstoffpartialdruck mit Ziel auf einen maximalen arteriellen O_2 -Druck von 80mmHg beatmet, um das Auftreten von Lungenreifungsstörungen und Retinopathien zu verhindern (129).

Negative Beeinflussung des Lungenwachstums		
	Wirkmechanismus	Inhibierung
Glukokortikoide/ Thyroidhormone	Hemmung der Zellteilung	Formation der alveolären Septen
Silikonprothesen	Verminderung des mechanischen Zug	mediastinaler Shift, post-PNX Lungenexpansion
Androgene	Anstieg der Alveolarwand- dicke	Mangel bewirkt Anstieg der kompensatorischen Antwort
Clotrimazol		Proliferation in primären und immortalisierten Zellen

Tabelle 2.2 – Faktoren, die negativ auf das kompensatorische Lungenwachstum wirken und somit die Vorgänge hemmen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Experimentelle Agenzien und Pharmaka

Aceton (*Merck KG, Darmstadt, Deutschland*)

Agarose (*Promega Corporation, Madison, USA*)

Ammoniumacetat (*Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*)

Antikörper: CD31 (*Pharmingen*), pan-Zytokeratin und Ki67 (*Dako*), proSPB (*Chemicon*), α -Aktin, Hoechst 33342 und Vimentin (*Sigma*)

Baytril 2,5% (*Enrofloxazin, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland*)

Bepanthen-Augensalbe (*Roche/ Nicolas, Deutschland*)

Braunoderm (*B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*)

Bromodesoxyuridin (*Sigma, Deisenhofen, Deutschland*)

Cacodylsäure (*Natriumdimethylarsensäure, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland*)

Chloroform (*Merck AG, Darmstadt, Deutschland*)

Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) (*Fluka/ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*)

Ethanol (*pro analysis, J.T. Baker Chemicals, Deventer, Niederlande*)

Fluoreszierendes Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) (*Sigma/ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*)

Glutardialdehyd 25% (GDH) (*Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland*)

Halothan (*Merck KG, Darmstadt, Deutschland*)

HEPES (*Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland*)

Historesin (*Leica Instruments GmbH, Nußloch/ Heidelberg, Deutschland*)

Isoamylalkohol (*Merck AG, Darmstadt, Deutschland*)

Isopropanol (*Merck AG, Darmstadt, Deutschland*)

Ketanest (Ketamin 100mg/ml) (*Pharmacia & Upjohn GmbH*)

Liquemin N 25 000 (*Heparin; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland*)

Microfil (*Flow.Tec. Inc., Massachusetts, USA*)

Natriumchlorid-Lösung 0,9% (NaCl) (*B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*)

Natriumchlorid-Salz (*Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland*)

Novaminsulfon-ratiopharm 1 (*Metamizol-Natrium 1 H₂O 500mg/ml; ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland*)

Osmiumtetroxid (*Fluka/ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*)

Paraformaldehyd (*Merck AG, Darmstadt, Deutschland*)

Phenol (*Merck AG, Darmstadt, Deutschland*)

Phosphate Buffered Saline 10%, 1% (PBS) (*Life Technologies Ltd. Paisley, Schottland, Grossbritannien*)

Proteinase K (*Sigma/ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*)

Rimadyl (*Carprofen 50mg/ ml; Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland*)

Rompun 2% (*Xylazin, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland*)

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) (*Fluka/ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*)

TissueTek® (*OCT Compound, Sakura Finetek, Torrance, USA*)

Tris HCl (*Hydroxymethylaminomethanhydrochlorid, Cleveland, Ohio, USA*)

Uranylacetat (*Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland*)

Wasser, doppelt destilliert (ddH₂O) (*Milli-Q, Water Purification System; Millipore*)

3.1.2 Geräte

A/D Converter (*DT 301 PCI D/A converter, Data translation, Marlboro, MA, USA*) zur Digitalisierung der analog gemessenen Atemparameter

Beatmungsgerät (*MiniVent, Type 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland*)

Bodyplethysmographenkammer (*Forschungsstätten, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland*)

Differentialdruckmesser (*DP 45/15, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland*), Funktionsteil des Bodyplethysmographen

Feinwaage (*PB 303 Delta Range; Mettler-Toledo, Schweiz*)

Fluoreszenzreader (*FL 600 Microplate Fluorescence Reader; Bio-Tek Instruments Inc., USA*)

Gewebehomogenisator (*Sartorius, Göttingen, Deutschland*)

Glasexpositions-kammer (*Forschungsstätten, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland*)

Head-out-Bodyplethysmograph (bestehend aus: Glasexpositions-kammer, Bodyplethysmographenkammer, Latexmanschette, Pneumotachograph, Differentialdruckmesser, Signalverstärker, A/D Converter; einzeln gelistet)

Kaltlichtlampe (KL 200, Schott, Deutschland)

Mikrotom, rotierend (Leica Instruments GmbH, Nussloch/ Heidelberg, Deutschland)

Mikrooperationsbesteck: Pinzetten, Nadelhalter (F-S-I, Germany), Scheren (Martin, Deutschland und Aesculap OC 498R, Deutschland)

Operationsmikroskop (Leica MS 5; Leica Instruments GmbH, Nussloch/ Heidelberg, Deutschland)

Pneumotachograph (PTM 378/0.9, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)

Signalverstärker (CFBA type 677, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)

Spectro-Photometer (Ultrospec III; Pharmacia Biosystems, Freiburg, Deutschland)

Thermomixer-Compact (eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Vortexgerät (Merck Eurolab, Deutschland)

Zentrifugen (Rotina 46R und Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)

3.1.3 Zusätzliche Materialien

Einbettkassetten, histologische (TissueTek III, Sakura Finetek BV Zoeterwoude, Niederlande)

Einwegskalpelle 11/ 20 (Feather Safety Razor Co., LTD. Medical Division, Japan)

Einwegspritzen 10/ 20/ 50ml (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Eppendorfküvetten (Sarstedt AG &Co, Nümbrecht, Deutschland)

Falkonröhrchen 15/50ml (Corning Incorporated, USA)

Handschuhe, sterile (NuTex-Latex; Ansell-Malaysia Sdn Bhd, Malaysia)

HEM 3.5 Software (Notocord, Croissy sur Seine, France)

Infusionsbesteck (Intrafix-Air; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Injektionsnadeln (Neolus 27G; Terumo Corporation; und BD Microlance TM 3, 18 GI ½; Becton Dickinson GmbH, Deutschland)

Latexmanschette (9mm ID, dental latex dam, Roeko, Langenau, Deutschland)

Maus (C57Bl6/N, männlich; Charles River, Sulzfeld, Deutschland)

Naht- und Präparationsmaterial (Perma-Hand-Seide 6/0; Johnson & Johnson, Düsseldorf,

Deutschland und Tevdek II, 5/0, 1-metric; Genenzyme Surgical Products Corp., USA)

Pipetten (10-1000 μ l; Corning-Lambda)

Pulmonalis- und Trachealkatheter (*Havard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland*)

Rasierklingen (*Rufin Professional*)

Readerplatten, 96-well, black

Vasocan Braunüle 20G (*B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland*)

3.1.4 Zusammensetzung einiger verwendeter Lösungen

Cacodylatpuffer 0,2M:

42,8g	Cacodylsäure in
980 ml	ddH ₂ O lösen
pH 7,35	mit HCl einstellen
5,8 g	NaCl hinzufügen (Osmolarität 600 mOsmol/ kg)
	auf 1l mit ddH ₂ O einstellen
	für 0,1 M Cacodylat Waschpuffer 1:1 mit ddH ₂ O mischen

Immunhistochemie- Fixans:

52,06 g	HEPES in
750 ml	ddH ₂ O lösen
4ml	Glutardialdehyd 25% und
200 ml	PFA-Lösung 20% zugeben
pH 7,35	einstellen, auf 1l mit ddH ₂ O auffüllen

Erstellen der Paraformaldehydlösung (PFA) 20%:

180ml	PBS 10%
40g	Paraformaldehyd
0,5ml	Natronlauge bei
60°C	etwa zwei Stunden lösen, bis Ansatz klar
pH 7,35	einstellen und Ansatz mit PBS auf
200ml	auffüllen

Erstellen der Osmiumtetroxidlösung 2% zur Postfixation

1g	OsO ₄ in dunkles dicht schließendes Gefäß füllen und mit
50ml	ddH ₂ O auffüllen (OsO ₄ ist giftig und flüchtig!)
	Kristalle im Ultraschallbad lösen;
	gekühlte Lösung ist mehrere Monate haltbar;
	Für Gebrauchslösung (1%)
1:1	mit 0,2 M Cacodylatpuffer mischen

Herstellung der Uranylacetatlösung zur Postfixation

16,7g	Uranylacetat in
200ml	ddH ₂ O lösen, lange durchmischen, ergibt gesättigte Stocklösung (kühl und dunkel monatelang haltbar); Gebrauchslösung erst am nächsten Tag durch
1:1	Verdünnung mit ddH ₂ O erstellen

3.2 Methoden

3.2.1 Kompensatorisches Lungenwachstum

Das kompensatorische Lungenwachstum nach unilateraler Pneumonektomie bei der adulten Maus sollte untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden sechs Gruppen von jeweils acht männlichen C57BL/6N-Mäusen untersucht, die einer linksseitigen Pneumonektomie unterzogen wurden. An den Tagen 1, 3, 5, 7, 10 und 21 nach Pneumonektomie wurde das Volumen der verbleibenden Lunge bestimmt und mit dem Volumen der Lungen einer Kontrollgruppe nicht pneumonektomierter Tiere verglichen.

3.2.2 Aufbau des Arbeitsplatzes für die Pneumonektomie

Sowohl die Intubation als auch die Pneumonektomie fanden unter mikroskopischer Kontrolle und sterilen Bedingungen statt. In unmittelbarer Nähe zum Arbeitsplatz stand das Beatmungsgerät, zu dessen Linken die Kaltlichtquelle, zu dessen Rechten die Wärmelampe, die das Auskühlen der Maus während der Operation verhinderte.

Zur Rechten des Operators befand sich eine sterile Unterlage mit dem autoklavierten Präparationsbesteck.

Das Präparationsbesteck für eine Pneumonektomie umfasste zwei Einmalskalpelle (Größe 11 und 20), zwei Pinzetten für die Intubation, eine Schere zum Durchtrennen der Muskelstrukturen, zwei Pinzetten für die Exstirpation der Lunge und einen Nadelhalter zum Vernähen der Strukturen.

3.2.3 Durchführung der Pneumonektomie

Die für die Pneumonektomie verwendete Narkose bestand aus einer Mischung von 60mg/kg Ketamin und 2mg/kg Xylazin, welche intraperitoneal injiziert wurde.

Mit einsetzender Narkotisierung erfolgte die sorgfältige Rasur der linken Thoraxwand der Maus und Desinfektion mit Braunoderm. Des Weiteren wurde ein Schutz der Augen gegen Austrocknung mit Dexpanthenol-Augensalbe durchgeführt, da bei der verwendeten Narkose der Lidschlussreflex erlischt. Die Operation fand unter einer Wärmelampe statt.

Für die Durchführung der Thorakotomie war die Intubation und mechanische Ventilation der Maus notwendig. Als Tubus diente der Venenverweilkatheter einer Vasocan Braunüle (20G). Zur Intubation wurde die narkotisierte Maus mit den oberen Schneidezähnen an einen horizontalen Draht angehängt, so dass die Einstellung des Kehlkopfes unter mikroskopischer Kontrolle durch Einsicht von oben durch ein binokuläres Operationsmikroskop erfolgen konnte. Dabei leuchtete ein Arm der Kaltlichtquelle den Rachenraum aus, der andere durchleuchtete die Kehlkopf-Region von ventral. Auf diese Weise konnte die Glottis identifiziert werden und die Trachea bei geöffneter Epiglottis gut eingesehen werden. Die atraumatische Einführung des Tubus unter Sichtkontrolle wurde mit Hilfe einer Pinzette durchgeführt.

Die verwendeten Beatmungsparameter waren ein Atemzugvolumen von 220 μ l bei 80-100 Atemzügen pro Minute.

Die intubierte Maus wurde nun in leichter Rechtsseitenlage auf der Arbeitsfläche fixiert. Die Hautinzision wurde mit einem 11er Einmalskalpell in Höhe des fünften Interkostalraumes vorgenommen; anschließend erfolgte die Präparation der interkostalen Muskelschichten mit einer Mikroschere bis zur Pleura, welche vorsichtig ohne Traumatisierung des Lungengewebes eröffnet wurde.

Eine vorbereitete Schlinge aus Seide 6/0, über den Hautschnitt gelegt, ermöglichte im Folgenden eine schnelle Ligatur des linken Lungenhilus. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurde die Lungenhälfte vorsichtig aus dem Thorax durch die Schlinge gezogen und mit dieser vollständig am Hilus abgebunden. Anschließend erfolgte die Resektion der Lungenhälfte distal der Ligatur und das Reponieren des verbleibenden Hilusstumpfes.

Das Vernähen der Wunde wurde ebenfalls mit Seide 6/0 durchgeführt. Die Naht der Thoraxwand erfolgte unter Einbeziehung der angrenzenden Rippen.

Die Hautnaht erfolgte mit Einzelknopfnähten nach Bedarf.

Da die verwendete Narkose die Beatmung der Maus ermöglichte, aber nicht zu einer generellen Atemdepression führte, konnte die Extubation der Maus nach vorhergehender Probedekonnektion vom Ventilator unmittelbar postoperativ erfolgen. Um den aufgetretenen Flüssigkeitsverlust auszugleichen, wurde der Maus 1ml auf Körpertemperatur erwärmtes NaCl subkutan in den Rückenbereich injiziert.

Die Tiere wurden postoperativ gegen Auskühlen geschützt und intensiv nachbeobachtet.

Weiterhin wurden die Mäuse für die nächsten drei Tage auf sauberen Tüchern gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum, eine postoperative antibiotische Behandlung

wurde 3 Tage lang mit Baytril im Trinkwasser durchgeführt. Eine postoperative Analgesie wurde über 2 Tage mittels subkutaner Injektion von Buprenorphin alle 12h durchgeführt. Nach drei Tagen war die Wunde äußerlich verheilt und die operierte Maus konnte wieder auf die übliche Streu gesetzt werden.

3.2.4 Aufbau des Arbeitsplatzes für die Lungenfixierung

Zentrum des Arbeitsplatzes stellte der Präparationsplatz für die Maus dar. Dieser bestand aus einer Korkplatte, die ein sicheres Fixieren der zu präparierenden Maus ermöglichte und zusätzlich zum Aufnehmen der ausfließenden Flüssigkeit auf saugfähigen Tüchern gelagert war.

Die Perfusionsapparatur bestand aus einem Stativ, an dem in definierten Höhen zwei Perfusateservoirs von 50ml Fassungsvermögen für die Perfusion der Lungengefäße und 20ml Fassungsvermögen zur tracheobronchialen Instillation befestigt wurden. Von diesen führte jeweils ein Silikonschlauch zum Arbeitsplatz, an dessen Ende ein Stahlkatheter angebracht wurde, der sicheres Einführen und Fixieren in der Maus ermöglichte.

Um identische Druckverhältnisse bei allen Messungen zu gewährleisten, musste die Höhe der Reservoirs jeweils in definiertem Abstand zum Lungenhilus eingestellt werden.

Die im folgenden beschriebene Methode folgt diesem erläuterten Arbeitsplatzschema.

3.2.5 Methode der Volumenbestimmung

An den Zeitpunkten $d = 0, 1, 3, 5, 7, 10$ und 21 Tage post operationem wurde das Volumen der verbleibenden rechten Lungen bestimmt.

Zur optimalen Perfusionsfixierung der Lunge wurde die Blutgerinnung der Tiere durch intraperitoneale Injektion von 100IE Heparin unterbunden und die Tiere anschließend durch Halothan-Inhalation getötet. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert, die Haut von Thorax und Abdomen präpariert und das Abdomen eröffnet. Vom Abdomen aus war die Eröffnung der Pleurahöhle ohne Verletzung der Lungen unter Sicht möglich. Der Thorax wurde durch Sternotomie eröffnet und Thymus und Herzbeutel entfernt.

Zum Blähen, Freispülen und Fixieren der Lunge unter definiertem Druck wurden zwei 4/0 Fäden unter der Trachea hindurchgezogen und ein Faden unter der A. pulmonalis hindurchgeführt.

Die Trachea wurde intubiert und mit der kranial liegenden Fadenschlingen fixiert. Die Lunge wurde durch intratracheale Füllung mit 0,9% NaCl mit einem hydrostatischen Druck von 10cmH₂O, gemessen über dem Hilus, gebläht.

Ein zweiter Katheter wurde über den rechten Ventrikels in die A. pulmonalis eingeführt und mit dem entsprechenden Faden fixiert. Hier betrug der definierte hydrostatische Druck des Perfusates 20cm. Vor dem Öffnen der Klemmen wurde der linke Ventrikel großzügig eröffnet, um das freie Abfließen des Perfusates zu ermöglichen.

Die Lunge wurde zunächst mit etwa 5 ml 0,9% NaCl blutfrei perfundiert. Im nächsten Schritt wurde die Perfusionsfixation des Lungengewebes mit 2,5% Glutardialdehyd über 45min durchgeführt.

Nach der Fixation wurde die Trachea mittels der unteren Fadenschlinge abgebunden.

Das Herz-Lungen-Paket wurde aus dem Thorax herausgelöst und über Nacht bei 4°C in 2,5% Glutardialdehyd nachfixiert.

Die Volumenbestimmung erfolgte mittels der Immersionsmethode nach Scherle (55,152). Hierbei wird das durch die Lunge verdrängte Volumen beim Untertauchen des Gewebes in 0,9% NaCl auf einer Feinwaage bestimmt.

3.2.6 Quantitative Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure

Nachdem festgestellt worden war, dass in der verbleibenden rechten Lunge nach der Pneumonektomie eine Volumenzunahme stattfindet, sollte nun weitergehend untersucht werden, ob diese mit einer Zellhyperplasie einhergeht. Dieser Parameter ist durch die Bestimmung des gesamt-DNA Gehaltes (165) zu untersuchen.

Die Masse der gesamt-DNA der rechten Lunge wurde bei Mäusen 21 Tage nach linksseitiger Pneumonektomie bestimmt (n=5), und mit der Masse der gesamt-DNA der rechten und linken Lunge nicht-operierter Tiere gleichen Alters verglichen. Die Tiere wurden mittels Halothaninhalation getötet, der Thorax eröffnet, die Pulmonalarterie kanüliert, der linke Ventrikel eröffnet und die Lunge mit 0,9%igem NaCl für etwa drei Minuten perfundiert. Die Lunge wurde reseziert und mittels eines elektrischen

Gewebehomogenisators in 1ml Lysepuffer (100mM NaCl, 10ml Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA pH 8.0) eine Minute homogenisiert.

Es folgte die Zugabe von 1ml SDS (12,5% stock) und 0,5ml Proteinase K (5mg/ml stock), so dass die Endkonzentration 2,5% SDS und 0,5mg/ml Proteinase K in 5ml betrug. Die Proteolyse wurde über Nacht bei 37°C unter steter Durchmischung durchgeführt.

Am nächsten Morgen wurden erneut 5ml Lysepuffer hinzugefügt, durchmischt, 2ml abgenommen und mit 2ml eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (25:24:1) vermengt und extrahiert.

Nach der Zentrifugation der Proben mit 11750rpm über 10min befindet sich die DNA in der oberen Phase. Nach Abnahme von 400µl aus dieser Phase wurde die DNA mit Hilfe eines Gemisches aus 800µl kaltem 100% Ethanol und 200µl 7.5M Ammoniumacetat über eine Stunde auf Eis ausgefällt und 10min bei höchster Geschwindigkeitsstufe abzentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, die in dem Gefäß zurückbleibende DNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 11750rpm für 5min zentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde dekantiert, es folgte die Lufttrocknung der DNA.

Die getrocknete DNA wurde in 1000µl TE (40mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 7.4) resuspendiert und die DNA-Konzentration im Photometer durch die optische Dichte bei 260nm bestimmt, hierbei diente reines TE als Leerwert.

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Probe war eine weitere Messung bei 280 nm durchzuführen. Der aus beiden Messungen errechnete Absorptions-Quotient O.D. 260/280nm sollte über dem Faktor 1,8 liegen, um eine signifikante Proteinkontamination auszuschliessen. Die gemessenen Werte der gesamt-DNA der Lungen wurden mit dem Körpergewicht der Tiere normalisiert, um eine interindividuelle Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

3.2.7 Morphometrie des Lungengewebes

Lungen pneumonektomierter Mäuse und entsprechende Kontrollpräparate wurden mittels eines Verfahrens vermessen (Morphometrie), welches die zweidimensionalen Ausgangspräparate so auswerten kann, dass die eigentlich dreidimensionale Struktur des Organs berücksichtigt wird (stereologisches Messverfahren, Stereologie).

Zur Durchführung dieser Messungen müssen die Mauslungen so fixiert werden, dass eine minimale Schrumpfung des Gewebes und ein optimaler Erhalt der Ausgangsstruktur gewährleistet ist.

3.2.8 Fixierung der Lungen für die Morphometrie

Für die morphometrischen Untersuchungen wurden zwei Gruppen bestehend aus C57BL/6N-Mäusen (n=5) gebildet; untersucht wurden Tiere 21 Tage nach Pneumonektomie und nicht operierte Kontrolltiere.

Die Tiere wurden entsprechend der unter 3.2.3 beschriebenen Vorgehensweise heparinisiert, narkotisiert, getötet und der Thorax eröffnet. Die Trachea wurde kanüliert und die Lunge transtracheal mit einem Druck von 20cmH₂O über 30 min mit Fixans (2,5% PFA + 0,1% GDA in Cacodylatpuffer) gefüllt und gebläht.

Danach erfolgte das Abbinden der Trachea und die Entnahme des Organs. Die Lunge wurde in einem vollständig mit Fixans gefüllten Gefäß über Nacht nachfixiert.

Am folgenden Morgen wurden die Lungen zunächst zweimal für jeweils 10min in Cacodylatpuffer 0,1M gewaschen, danach das Lungenvolumen mittels der Immersionsmethode nach Scherle (152) bestimmt. Hierzu ist es erforderlich, die Lunge mit Hilfe einer Drahtschlinge vollständig in ein mit PBS gefülltes Gefäß einzutauchen und die Gewichtszunahme des Gefäßes, welches der durch die Lungen verdrängten Masse PBS entspricht, abzulesen. Das flüssigkeitsgefüllte Gefäß wird mit gleichermaßen tief eingetauchter Drahtschlinge vorher auf Null tariert.

Zum Schneiden der Lungen erfolgt das Lösen von 2% Agarose in PBS durch Aufkochen, Herunterkühlen dieser auf etwa 40°C, Ausgießen einer dünnen Schicht in vorbereitete Formen und Einbetten der Lunge mit der Dorsalseite nach oben, so dass sie nachfolgend horizontal von apikal nach basal geschnitten werden konnte. Hilfreich war es, den gesamten Block etwa 10cm lang zu gießen und die Lunge im vorderen Teil einzubetten, damit ein ausreichender Block zur sicheren Führung beim Schneiden verblieb. Nach dem Auskühlen der Agarose auf Eis wurden die Lungen mit einer Rasierklinge in maximal 2mm dicke Scheiben geschnitten und diese einzeln in vorher gekennzeichnete Reagenzgläser gegeben.

Im nächsten Schnitt erfolgte das Osmieren der Scheiben über eine Stunde mit jeweils 2ml 1% Osmiumtetroxid unter dem Abzug.

Nachfolgend wurden die Präparate zunächst viermal für 5 Minuten mit gekühltem Cacodylatpuffer 0,1M, dann zweimal mit ddH₂O gewaschen. Schließlich erfolgte die Postfixierung mit 2ml pro Glas halbgesättigter Uranylacetatlösung bei 4-8°C über 12-18 Stunden.

Am 3.Tag wurde zunächst die Umbettung der Präparate in Einbettkassetten vorgenommen. Dies erleichterte das anschließende Waschen der Kassetten in Färbeküvetten, das mit gekühltem ddH₂O sechsmal über jeweils fünf Minuten durchgeführt wurde. Danach wurden die Präparate bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit 70% Aceton, 2 Stunden mit 90% Aceton und eine Stunde mit 100% Aceton entwässert.

Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C mit Historesin plus Aktivator, welches 1:1 mit 100% Aceton verdünnt wurde, infiltriert.

Am 4. Tag wurde die Infiltration der Schnitte mit unverdünntem Historesin plus Aktivator fortgesetzt.

Am 5.Tag wurden die Präparate in Historesin eingebettet. Hierzu wurde eine kleine Menge aktiviertes Historesin mit Härter vermischt, dieses dünn in der Einbettform vorgelegt und das Anbinden abgewartet. Bei beginnender Verfestigung erfolgte das Einbringen der Lungenscheiben mit der Apikalseite nach unten in die Formen und das Auffüllen dieser mit frisch gemischtem Historesin plus Härter.

Nach Aushärten der Blöcke wurde der Blockhalter entsprechend der Anleitung angebracht. Die stereologische Untersuchung der Lungen wurde von Dr. Antonia Fehrenbach und Prof. Dr. Heinz Fehrenbach an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

3.2.9 Quantifizierung und Lokalisation der Zellproliferation

Eine Gruppe pneumonektomierter Mäuse und eine entsprechende Kontrollgruppe erhielten eine kontinuierliche BrdU-Gabe über das Trinkwasser über 10 Tage, beginnend am ersten Tag nach der Pneumonektomie (0,8mg BrdU/ml, n=3). BrdU integriert in die DNA proliferierender Zellen in der S-Phase, mit der kontinuierlichen Applikation ist es möglich, alle proliferierenden Zellen in den ersten 10 Tagen des Lungenwachstums zu markieren.

Die Tiere wurden mit Halothan getötet und der Thorax eröffnet, 0,5ml TissueTek® intratracheal injiziert, die Lungen dem Thorax entnommen, in TissueTek® eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach Gefrierschnitte von 6µm Dicke erstellt.

BrdU wurde mittels alkalischer Phosphatase-gekoppeltem anti-BrdU-Antikörper detektiert. Die Präparate wurden mit dem AP-Substrat NBT/BCIP entwickelt und mit Neutralrot gegengefärbt.

Repräsentative Areale wurden bei 200-facher Vergrößerung fotografiert, die positiven und negativen Zellkerne gezählt und die Ratio der BrdU-positiven Kerne zur Gesamtkernzahl bestimmt.

3.2.10 Typisierung der proliferierenden Zellen

Zur Charakterisierung der proliferierenden Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Serienschnitten angewendet. Diese Untersuchung wurde an Paraffin-eingebetteten Lungen 7 Tage nach PNX durchgeführt.

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 3µm dicke Serienschnitte erstellt. Nach Deparaffinieren und Rehydrieren wurden jeweils 2 direkt aufeinander folgende Serienschnitte gewählt. Ein Schnitt wurde für den Proliferationsmarker Ki67 immunfluoreszenzgefärbt, der andere Schnitt für eines der folgenden, Zelltyp-spezifischen Proteine: Zytokeration (epiteliale Zellen von Luftwegen und Alveolen), α -smooth muscle Aktin (glatte Muskelzellen), Vimentin (Fibroblasten), pro-Surfactantprotein B (proSPB, Alveolar Typ-2 Epithelzellen) und CD31 (Endothelzellen).

Für die Ki67-Färbung wurde das präparat in 10mM Zitratpuffer bei 120°C über 10 Minuten in einem Druckkocher erhitzt.

Die Immunfluoreszenzfärbung folgte einem Standardprotokoll. Alle Inkubationen und Waschschrte wurden mit PBS + 2,5% bovines Serumalbumin + 0,1% Triton X-100 durchgeführt. Unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers wurden zu Beginn durch Blocken über 30 Minuten mit 50% Ziegenserum verhindert. Als primäre Antikörper dienten CD31 (Pharmingen), pan-Cytokeratin (Dako), Ki67 (Dako), proSPB (Chemicon), α -smooth muscle Aktin (Sigma) und Vimentin (Sigma), sekundäre Antikörper waren kreuzabsorbierte Ziegenantikörper, gekoppelt an Alexa 488 oder Alexa 555 Fluoreszenzfarbstoffe (Molecular Probes). Die Inkubationszeiten für primäre und sekundäre Antikörper betrugen 60 bzw. 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Auf Grund der Serienschnitte war es möglich, Kolokalisationen von Ki67 und den zelltypspezifischen Markern zu untersuchen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Leica) mit digitaler Bilderfassung.

3.2.11 Prüfung der Lungenfunktion der Maus in vivo

Verschiedene Parameter der Lungenfunktion pneumonektomierter sowie nicht operierter Mäuse wurde mit Hilfe eines „head-out“ Bodyplethysmographen (64,127,180) in Zusammenarbeit mit Michael Wegmann aus dem Zentrallaboratorium der Klinischen Chemie und Molekularen Diagnostik der Philipps-Universität Marburg, untersucht.

Der „head-out“-Bodyplethysmograph bestand aus einer 2,5 Liter großen Glasexpositions-kammer, an die eine den Kopf des Versuchstieres aussparende Kammer, die Bodyplethysmographenkammer, eingefügt wurde. Die Maus wurde so in dem Bodyplethysmographen positioniert, dass der Kopf des Tieres in die Frischluftkammer ragte.

Die Plethysmographenkammer wurde durch eine Latexhalsmanschette luftdicht von der Frischluftkammer getrennt. Letztere wurde mit einem kontinuierlichen Luftstrom von 200ml/min belüftet. Durch die Bewegung des Brustkorbes der atmenden Maus wurde die Luft in der Plethysmographenkammer atemsynchron über ein Ableitungsrohr verdrängt. Der so entstandene Luftstrom am Ableitungsrohr des Plethysmographen wurde mittels eines Pneumotachographen gemessen.

Für die Messung wurden der kalibrierte Pneumotachograph und ein Differentialdruck-Messgerät mit einem Signalverstärker verbunden und an den einzelnen Messplätzen befestigt. Für jedes Tier wurde das gemessene digitale Signal des Druckmessers bei einer Rate von 225000/s mit Hilfe eines Analog-Digital-Converters digitalisiert. Über einen Zeitraum von 15 Minuten wurden alle gemessenen Signale gesammelt und gemittelt.

Folgende lungenphysiologische Parameter wurden am spontan atmenden, nicht betäubten Tier bestimmt und mit Hilfe einer Notocord hem 3.5 Software berechnet: das Tidalvolumen, der mittelexpiratorische Luftstrom (Atemstromstärke), die maximale Atemstromstärke, die In- und Expirationsdauer sowie die Atemfrequenz.

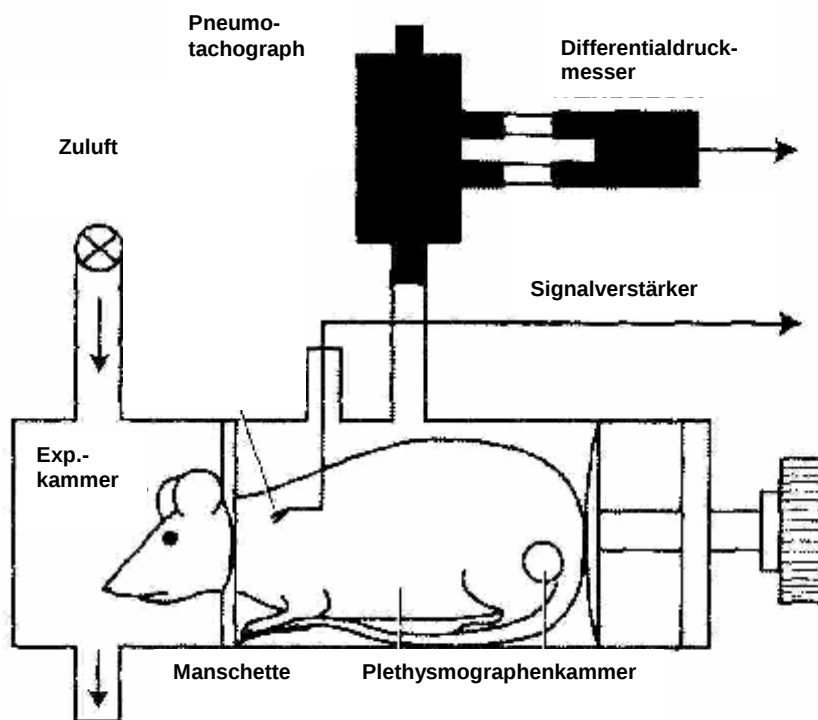


Bild 3.1 – Schematische Darstellung der Messapparatur des „head-out“-Bodyplethysmographen.

Dargestellt sind die einzelnen Funktionsparameter des Plethysmographen sowie die Positionierung der Maus in der Messapparatur.

(Exp.kammer: Glasexpositions-kammer)

(Aus: Glaab, Daser et al., „Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice (64).“)

3.2.12 Bestimmung des Ventrikelmassenquotienten

Um zu prüfen, ob die unilaterale Pneumonektomie zu einer signifikanten pulmonalen Hypertonie und in Folge davon zu einer Hypertrophie des rechten Ventrikels führt, wurde der Quotient der Trockenmasse von rechtem und linkem Herzen erfasst. Dafür wurde der rechte Ventrikel von linkem Ventrikel und Septum getrennt, die Herzen über 48 Stunden bei 40°C auf Objektträgern getrocknet, danach gewogen und der Massenquotient errechnet. Untersucht wurden die Herzen von 5 pneumonektomierten Tieren 21 Tage nach PNX sowie von 16 nicht operierten Kontrolltieren.

4 Ergebnisse

4.1 Quantität und Kinetik des kompensatorischen Lungenwachstums

Der chirurgischen Resektion der linken Lunge folgte eine rasche und vollständige Regeneration des resezierten Lungengewebes durch Wachstum des verbleibenden rechten Lungenflügels. Zur genauen Darstellung dieses Mechanismus wurden über einen Zeitraum von drei Wochen zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten (Tag 1, 3, 5, 7, 10, 21) das Volumen der rechten Lunge und ihrer einzelnen Lappen bestimmt. Die Größe der Gruppen betrug jeweils acht Mäuse pro Zeitpunkt, insgesamt wurden 25 nicht pneumonektomierte Kontrolltiere untersucht. Die Lungenvolumina wurden durch das individuelle Körpergewicht dividiert, um vergleichbare, massenspezifische Volumina zu erhalten (siehe Anhang).

Einen ersten Überblick gewährt die Darstellung der Quantität und Kinetik der Volumenzunahme der verbliebenen rechten Lunge der pneumonektomierten Tiere im Vergleich zu den Gesamtvolumina rechter und linker Lunge der nicht operierten Kontrolltiere (Abbildung 4.1A). Durch die Resektion der linken Lunge wurden etwa 30,6% des Gesamtvolumens entfernt.

Über den Beobachtungszeitraum erfolgte eine signifikante Volumenzunahme der rechten Lunge bereits ab dem ersten Tag post operationem, die nach 21 Tagen in eine vollständige Rekonstitution des ursprünglichen Lungenvolumens, verbunden mit einer Gesamtvolumenzunahme auf 145% des Initialvolumens, mündete (Tabelle 4.1). Die Volumenzunahme manifestierte sich, die einzelnen Lappen betrachtend, disproportional. In der Auswertung der Lappenvolumina der rechten Lunge zeigte sich, dass der kardiale Lappen im Verhältnis zu seinem Ausgangsvolumen die stärkste Volumenzunahme erfährt. Bei den Kontrolltieren fand sich für diesen initial ein Wert von $0,0034 \pm 0,0001$ ml/g, bei den pneumonektomierten Mäusen 21 Tage post-OP $0,0063 \pm 0,0002$ ml/g, dies entspricht einer Volumenzunahme von 85%; damit steigt sein prozentualer Gesamtanteil von 18% an der rechten Lunge auf 23,2% (Tabelle 4.2) Die geringste Volumenzunahme findet sich im kranialen Lappen: sein initiales Volumen liegt bei $0,005 \pm 0,0002$ ml/g, 21 Tage später beträgt es $0,0062 \pm 0,0001$ ml/g (Tabelle 4.1), entsprechend einer Volumenzunahme von 24% (MW $\pm$ SEM).

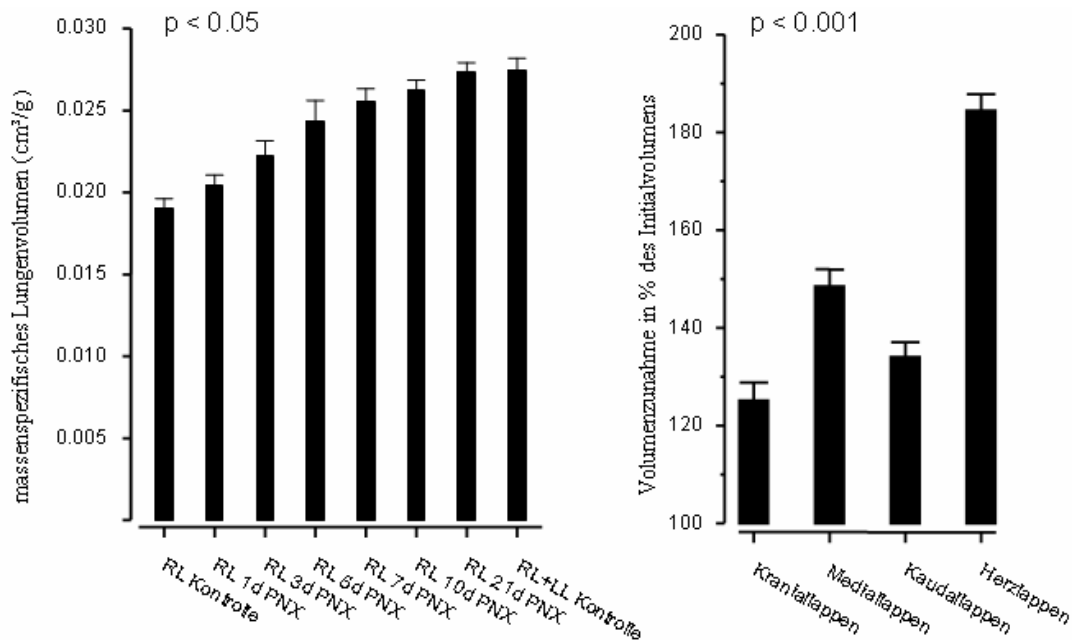


Abbildung 4.1– Quantität und Kinetik der Zunahme des Lungenvolumens der Maus nach linksseitiger Penumonektomie

Abbildung 4.1A zeigt das massenspezifische Lungenvolumen der rechten Lunge linksseitig pneumonektomierter Mäuse (n=8) über einen Zeitraum von drei Wochen im Vergleich zu dem Gesamtlungenvolumen nicht operierter Kontrolltiere (RL+LL Kontrolle, n=25) und dem Volumen der rechten Lunge nicht pneumonektomierter Mäuse (RL Kontrolle). Die Lungenvolumina wurden für das Körpergewicht korrigiert.

Abbildung 4.1B stellt die Volumenzunahme der einzelnen Lungenlappen bei einem Ausgangswert von 100% dar. Der Herzlappen zeigt eine Volumenzunahme von ca. 85% im Vergleich zu seinem Ausgangsvolumen und somit das ausgeprägteste Wachstumsverhalten, der kraniale Lappen zeigt mit 24% die geringste prozentuale Volumenzunahme. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

(RL= rechte Lunge; LL= linke Lunge)

Tag post-OP	Körpergewicht [g]	Kardialer Lappen Volumen [cm ³]	Kranialer Lappen Volumen [cm ³]	Mittellappen Volumen [cm ³]	Kaudaler Lappen Volumen [cm ³]
Kontrolle	23,9± 0,25	0,082±0,003	0,117± 0,004	0,08± 0,003	0,169±0,005
1	22,05±0,54	0,09± 0,004	0,13±0,007	0,09± 0,004	0,19±0,004
3	23,59±0,49	0,099±0,003	0,138± 0,007	0,095±0,003	0,204±0,01
5	25,04± 0,45	0,121± 0,009	0,156± 0,008	0,105±0,003	0,218± 0,011
7	24,1± 0,51	0,126± 0,005	0,157± 0,006	0,118±0,006	0,227±0,011
10	24,13± 0,63	0,133± 0,001	0,167±0,01	0,109± 0,01	0,224±0,01
21	26,5±0,42	0,167± 0,004	0,165± 0,002	0,133±0,003	0,257±0,004

Tabelle 4.1 – Körpergewicht und Volumen der einzelnen Lungenlappen der rechten Lunge vor und nach linksseitiger Pneumonektomie der Maus.

In der Tabelle ist das kompensatorische Wachstumsverhalten durch die absoluten Volumina der einzelnen Lappen (in cm³) der rechten Lunge unilateral pneumonektomierter Mäuse (n=8 pro Gruppe) über einen Zeitraum von 21 Tagen im Vergleich zu den nicht-pneumonektomierten Kontrolltieren (n=25) dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler.

Das gesamte Lungenvolumen eines nicht-pneumonektomierten Tieres entspricht damit $0,649 \pm 0,017 \text{ cm}^3$, das einer Maus 21 Tage nach der Pneumonektomie $0,724 \pm 0,006 \text{ cm}^3$, im Vergleich dazu beträgt das Volumen der linken Lunge einer nicht-pneumonektomierten Maus $0,198 \pm 0,006 \text{ cm}^3$, also etwa 30% der Gesamtlunge.

(PNX= Pneumonektomie, d= Tag)

Massenspezifisches Volumen	Rechte Lunge, kranialer Lappen	Rechte Lunge, Mittellappen	Rechte Lunge, kaudaler Lappen	Rechte Lunge, kardialer Lappen	Linke Lunge
Kontrolle [mm ³ /g]	4,98 ± 0,18	3,41 ± 0,12	7,24 ± 0,22	3,43 ± 0,12	8,39 ± 0,23
Kontrolle [% gesamt]	18,10	12,40	26,40	12,50	30,60
Kontrolle [% der re. Lunge]	26,10	17,90	38,00	18,00	-
21d PNX [mm ³ /g]	6,23 ± 0,13	5,06 ± 0,16	9,70 ± 0,24	6,33 ± 0,19	-
21d PNX [% der re. Lunge]	22,80	18,50	35,50	23,20	-

Tabelle 4.2 – Verteilung der Volumina der einzelnen Lungenlappen vor Pneumonektomie und 21 Tage nach linksseitiger Pneumonektomie der Maus.

Bei nicht operierten Kontrollmäusen entspricht das massenspezifische Volumen der linken Lunge 30,6% des Gesamtlungenvolumens, auf den kranialen Lappen entfallen 18,1%, auf den Mittellappen 12,4%, auf den Kaudallappen 26,4% und auf den kardialen Lappen 12,5%.

Bezogen auf seinen prozentualen Anteil an dem massenspezifischen Volumen der rechten Lunge zeigt der kardiale Lappen die ausgeprägteste relative Volumenzunahme 21 Tage nach linksseitiger Pneumonektomie, der Anteil des mittleren Lappens bleibt weitgehend unverändert, der kaudale und der kraniale Lappen zeigen eine Verminderung ihres relativen Volumenanteils. Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler, n=8 für 21d PNX, n=25 für Kontrollen.

(massenspezifisches Volumen= Volumen/ Körpergewicht)

4.2 Qualität des Lungenwachstums nach linksseitiger Pneumonektomie

21 Tage nach linksseitiger Pneumonektomie ist das Volumen der rechten Lunge dem Volumen der rechten und linken Lunge nicht pneumonektomierter Mäuse nahezu identisch. Zur Überprüfung, ob diese Volumenvermehrung durch eine Hyperplasie des Gewebes, bedingt durch eine proliferative Expansion alveolärer Wandstrukturen und Neuformation von Alveolen und Luftwegen, oder ausschließlich durch eine Dehnung der Lungenstruktur hervorgerufen wurde, wurden der gesamt-DNA-Gehalt und die Zellproliferation bestimmt, sowie detaillierte stereologische Untersuchungen durchgeführt. Wie in Abbildung 4.2 erkennbar, liegt 21 Tage nach der Pneumonektomie der DNA-Gehalt der rechten Lunge signifikant über dem der rechten Lunge nicht pneumonektomierter Mäuse ($p < 0,05$), und ist dem gesamt-DNA-Gehalt rechter und linker Lunge nicht pneumonektomierter Mäuse nahezu identisch. Daraus lässt sich ableiten, dass die DNA-Masse, welche pro Zelle als in etwa gleich anzusehen ist, durch Proliferation des Lungengewebes vermehrt worden ist, also eine Hyperplasie anstatt nur einer Hypertrophie des vorhandenen Gewebes eingetreten ist.

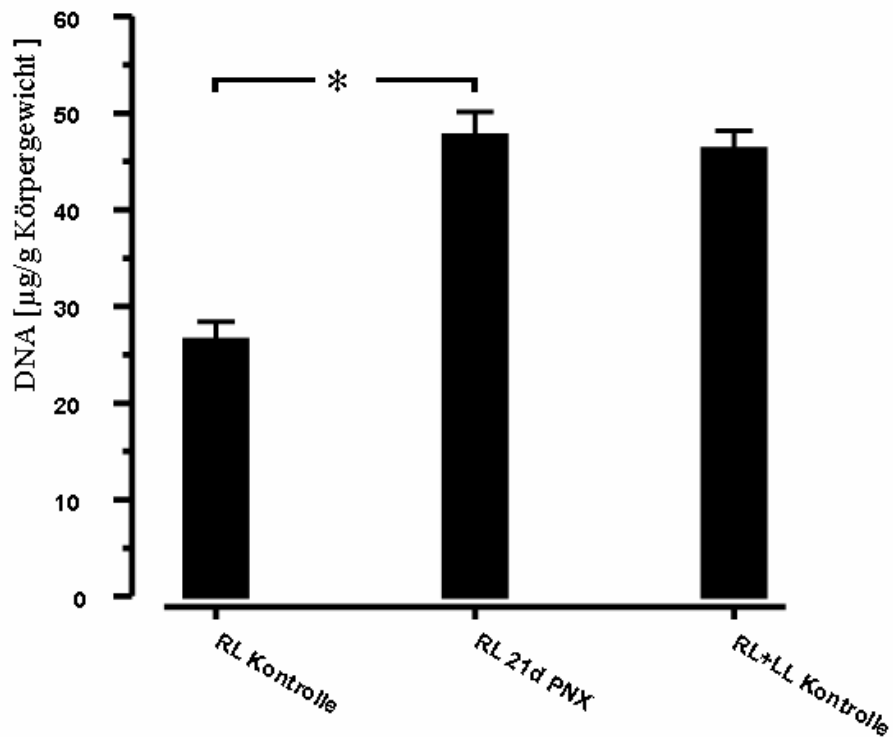


Abbildung 4.2 – Gesamt-DNA-Gehalt der Mauselunge vor und 21 Tage nach linksseitiger Pneumonektomie.

Die Abbildung zeigt die Zunahme des gesamt-DNA-Gehaltes der Lunge linksseitig pneumonektomierter Mäuse 21 Tage nach der Operation (RL 21d PNX, $n=5$) im Vergleich zu der gesamt-DNA nicht-pneumonektomierter Mäuse (RL+LL Kontrolle, $n=5$) und der gesamt-DNA der rechten Lunge nicht pneumonektomierter Mäuse (RL Kontrolle), in Relation zum individuellen Körpergewicht.

Die DNA-Masse der rechten Lunge pneumonektomierter Mäuse zeigt sich 21 Tage nach der Operation signifikant erhöht im Vergleich zu der rechten Lunge der Kontrolltiere ($p<0,05$); im Vergleich zu der Gesamtlunge besteht kein signifikanter Unterschied.

(RL= rechter Lappen, LL= linker Lappen; Mittelwert $\pm$ Standardfehler)

4.3 Morphometrische Untersuchungen der Lungenstruktur pneumonektomierter und nicht-pneumonektomierter Mäuse

Zur detaillierten Bestimmung morphometrischer Parameter der Lungenstruktur wurden die Lungen in Methylmetacrylat eingebettet und 1µm Semidünnschnitte in Serie erstellt. Die Schnitte wurden entsprechend den Vorgaben des „uniform random samplings“ aus zufällig ausgewählten repräsentativen Lungenarealen gefertigt. Jeweils Serienschnitt 1 und 4 einer Serie wurden stereologisch durch die Arbeitsgruppe von Professor H. Fehrenbach und Dr. A. Fehrenbach, Klinische Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“, Philipps Universität Marburg, lichtmikroskopisch mit Hilfe des Cast-Grid Systems ausgewertet (n=5 pro Gruppe).

Diese Untersuchungen zeigten, dass die massenspezifischen (für das individuelle Körpergewicht normalisierten) Parameter Lungenvolumen, alveoläre Oberfläche, Lungenparenchym, Nicht-Lungenparenchym und Luftwege sich nicht signifikant zwischen der rechten Lunge pneumonektomierter Tiere und der gesamten Lunge nicht pneumonektomierter Tiere unterschieden (Tabelle 4.2). Das Fehlen signifikanter Unterschiede bedeutet, dass das jeweilige Kompartiment durch das kompensatorische Lungenwachstum post-Pneumonektomie proportional wiederhergestellt wurde.

Signifikant größer war jedoch das massenspezifische Volumen der Alveolarsepten 21 Tage nach Pneumonektomie, welches zusammen mit dem histologischen Befund verbreiteter Alveolarsepten in einigen Arealen durch eine teilweise noch unvollständige Ausreifung neu entstandener oder durch Proliferation vergrößerter Septen zu erklären ist.

Ebenfalls signifikant erhöht 21 Tage nach Pneumonektomie war das volumengewichtete mittlere Alveolarvolumen (Tab. 4.3). Dieser Parameter gibt Auskunft über die relative Alveolengröße, er erlaubt aber keine Aussage über die absolute Alveolengröße oder Alveolenanzahl. Diese Parameter werden derzeit erst an dem Gewebe aus dieser Arbeit etabliert. Das erhöhte volumengewichtete mittlere Alveolarvolumen deutet jedoch auf einen Zugewinn an Alveolaroberfläche teils durch Neoalveolarisierung (Neoseptierung) sowie teils durch Vergrößerung bereits vorhandener Alveolen hin.

Parameter	Kontrolle	PNX-21	Signifikanz
Körpergewicht [g]	24,3 ± 0,3	28,0 ± 0,7	P = 0,001
Lungenvolumen [mm ³]	721 ± 27	857 ± 25	P = 0,006
Massenspezifisches Volumen [mm ³ /g KG]			
Lunge	29,7 ± 0,9	30,6 ± 0,9	N.S.
Nicht-Parenchym	3,9 ± 0,3	4,0 ± 0,2	N.S.
Parenchym	25,8 ± 0,8	26,6 ± 0,8	N.S.
Luftraum	22,9 ± 0,7	23,1 ± 0,7	N.S.
Alveolen	15,2 ± 0,5	16,2 ± 0,6	N.S.
Alveolargänge	7,7 ± 0,4	6,9 ± 0,3	N.S.
Alveolarsepten	2,9 ± 0,2	3,6 ± 0,1	P = 0,023
Volumengewichtetes mittleres Alveolarvolumen [10 ³ μm ³]	51,4 ± 1,9	89,4 ± 4,3	P < 0,001
Totale alveoläre Oberfläche, Sa [cm ²]	410 ± 13	453 ± 11	P = 0,033
Massenspezifische Sa [cm ² /g]	16,9 ± 0,4	16,2 ± 0,3	N.S.

Tabelle 4.3 Morphometrie der Mäuselunge vor und 21 Tage nach linkseitiger Pneumonektomie

Die Tabelle zeigt die stereologischen Daten der Gesamtlunge nicht operierter Mäuse (Kontrolle, n=5) im Vergleich zu der rechten Lunge pneumonektomierter Tiere (PNX, n=5).

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der massenspezifischen (für das Körpergewicht normalisierten) Parameter Lungenvolumen, alveoläre Oberfläche, Lungenparenchym, Nicht-Lungenparenchym und Luftwege. Das massenspezifische Volumen der Alveolarsepten und das volumengewichtete mittlere Alveolarvolumen sind bei pneumonektomierten Mäusen signifikant größer als bei Kontrollen.

(Mittelwert ± Standardfehler; Sa= Oberfläche, N.S.= nicht signifikant)

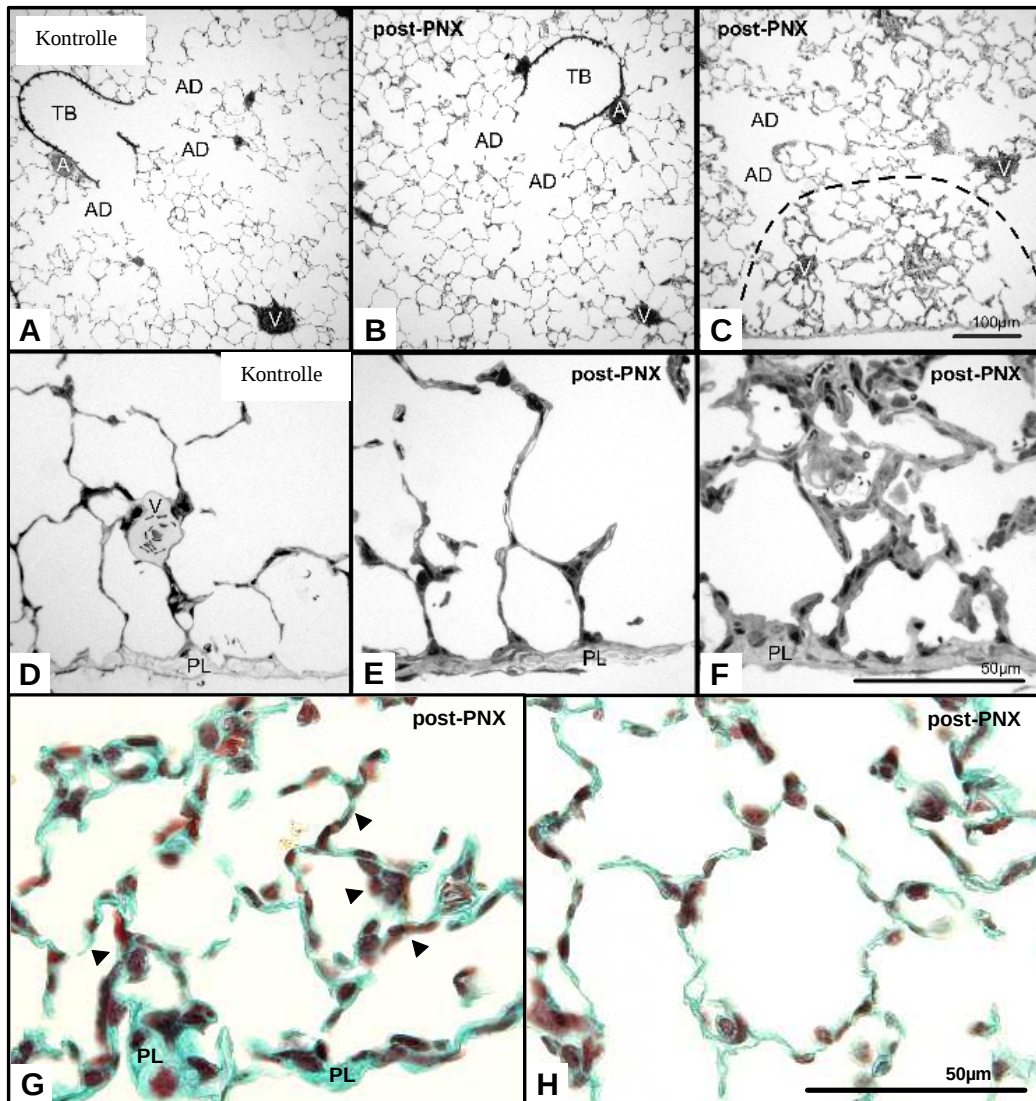


Abbildung 4.3 – Subpleurale Lokalisation verdickter Alveolarsepten (21d post PNx)

In den Semidünnschnittpräparaten (A-F) finden sich einigen subpleuralen Arealen 21 Tage nach Pneumonektomie teils verdickte Alveolarsepten (C, F), in den meisten anderen Arealen, sowie in den nicht operierten Kontrolltieren hingegen ausdifferenzierte, schmale Septen (A, B, D, E). Diese verdickten Septen können als noch nicht vollständig ausgereifte Septen nach Neoseptierung bzw. intraseptaler Zellproliferation interpretiert werden. Masson-Goldner-Färbungen (G, H; rot-braun = Zellkerne, grün = Bindegewebe) zeigten eher eine Hyperzellularität in den verdickten Septen als ein Vermehrung des Bindegewebes (G, Pfeilköpfe). (TB= terminale Bronchiolen, AD= Alveolargänge, PL= Pleura, V= venöses Gefäß)

4.4 Zellproliferation nach unilateraler Pneumonektomie

Zur Bestimmung der Zellproliferation nach linksseitiger Pneumonektomie wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet:

1. Eine kontinuierliche Fütterung der Tiere mit Bromodesoxyuridin (BrdU) über einen Zeitraum von 10 Tagen, zur Markierung aller proliferierenden Zellen in diesem Zeitraum. Die Tiere wurden 10 Tage nach der Pneumonektomie histologisch untersucht und die BrdU-positiven Zellkerne bestimmt (Abb. 4.4). Die Proliferation in pneumonektomierten Tieren war signifikant erhöht.
2. Bestimmung der Proliferation an Tag 7 nach der Pneumonektomie durch eine Ki67-Färbung. Es zeigte sich eine massiv erhöhte Proliferationsaktivität in den Lungen pneumonektomierter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.5).

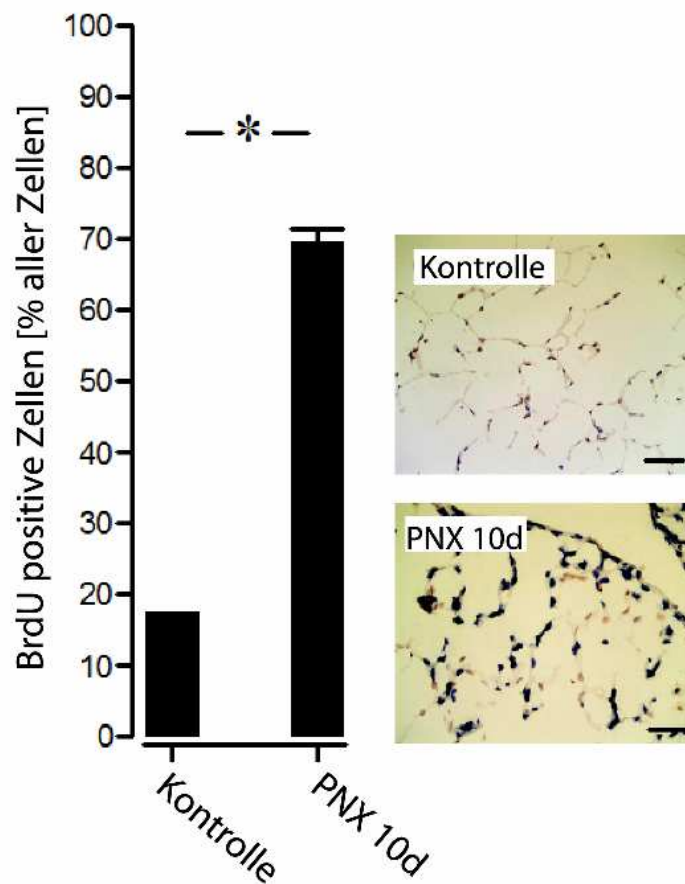


Abbildung 4.4 – Quantifizierung alveolärer Proliferation mittels Bromodesoxyuridin (BrdU)

Die Tiere wurden 10 Tage nach Pneumonektomie kontinuierlich über das Trinkwasser mit BrdU gefüttert. Die pneumonektomierten Tiere zeigten eine signifikant stärkere Proliferation als die Kontrolltiere (Kerne blau gefärbt). Die Balkengrafik zeigt den Proliferationsindex (BrdU-positive septale Zellkerne /gesamte Zahl der Zellkerne, $p < 0,05$). (BrdU-positive Kerne= blau, BrdU-negative Kerne= rotbraun; Mittelwert $\pm$ Standardfehler, $n=3$; PNx= Pneumonektomie, d= Tag)

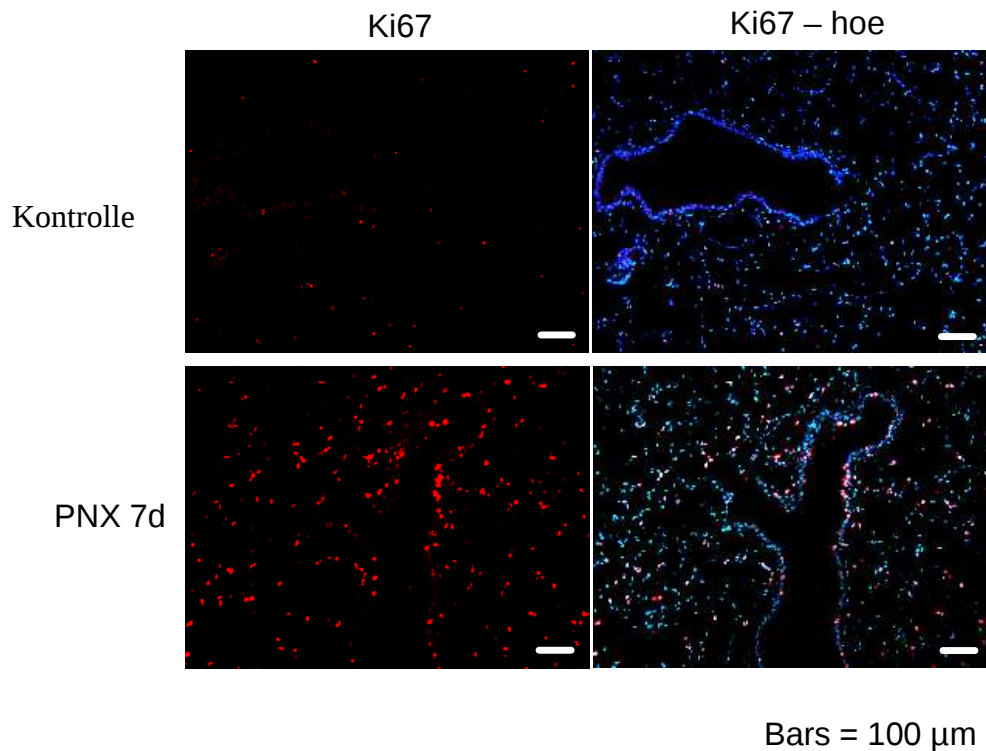


Abbildung 4.5 – Vergleichende Darstellung der proliferierenden Zellen einer Kontrolllunge und einer Lunge 7 Tage nach der Pneumonektomie.

Die linken Bilder zeigen eine nukleäre Färbung für das Proliferationsantigen Ki67 (rot), die rechten Bilder eine Ki67-Färbung in Kombination mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 (blau/ Ki67-hoe)

Die erhöhte Proliferationsrate 7 Tage nach linksseitiger Pneumonektomie (PNX 7d) im Vergleich zur Kontrolle ist deutlich erkennbar.

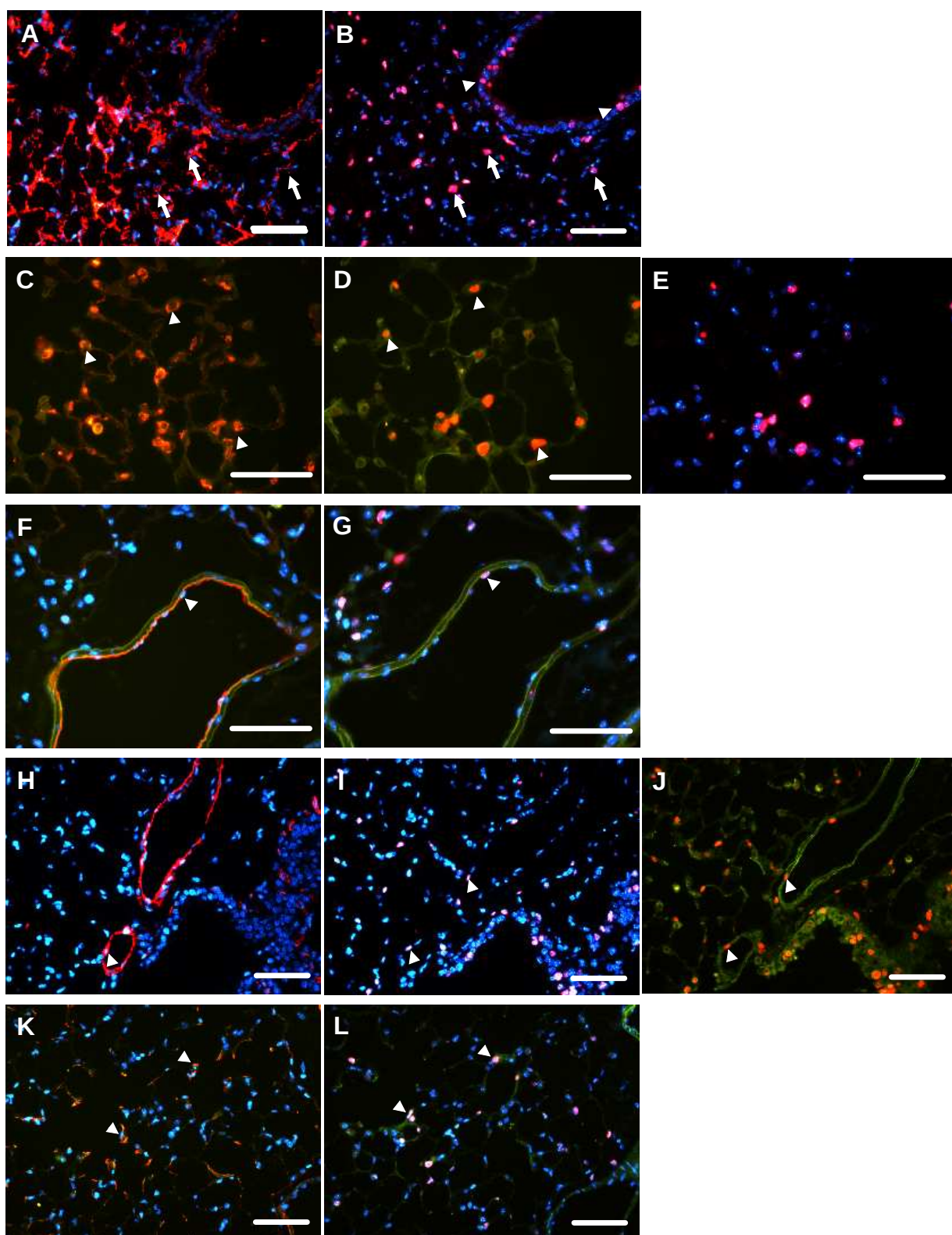


Abb. 4.6

Abbildung 4.6 – Phänotypische Charakterisierung der proliferierenden Zellen 7 Tage nach linksseitiger Pneumonektomie.

Die Zeilen zeigen jeweils Serienschritte, immunfluoreszenz-gefärbt für Proliferation (Ki67) sowie zelltypische Markerproteine: rot= Zytokeratin (Epithel, A), pro-SPB (Typ-2 Zellen, C), CD31 (Endothel, F), α -smooth muscle Aktin (glatte Muskelzellen, H), Vimentin (Fibroblasten, K), Ki67 (B, D/E, G, I/J, L); Zur besseren Orientierung sind Zellkerne (blau, Hoechst 33342) sowie teilweise Gewebe-Autofluoreszenz (grün) dargestellt. Abb. 4.6 A & B zeigen proliferierende Bronchialepithel- (Pfeilköpfe) und Alveolarepithelzellen (Pfeile), Abb. 4.6 C & D zeigen proliferierende Typ-2 Epithelzellen (Pfeilköpfe), Abb. 4.6 F & G zeigen proliferierende Endothelzellen in einer Pulmonalarterie (Pfeilköpfe), Abb. 4.6 H-J zeigen proliferierende glatte Muskelzellen (Pfeilköpfe), Abb. 4.6 K & L zeigen proliferierende alveoläre Fibroblasten (Pfeilköpfe). Die Skalenbalken entsprechen 100 μ m.

4.5 Prüfung der Lungenfunktion in vivo

An spontan atmenden, pneumonektomierten Tieren (Tag 3 und Tag 21; jeweils n=4), sowie an nicht operierten Kontrolltieren (n=4) wurde ein Lungenfunktionstest in einem „head-out“ Bodyplethysmographen durchgeführt (s. Kap. 3.2.11).

In den Diagrammen (Abb. 4.7) werden die Unterschiede in der Lungenfunktion erkennbar. Drei Tage nach der linksseitigen Pneumonektomie zeigten die Tiere eine deutlich erhöhte Atemfrequenz, ein vermindertes Tidalvolumen, eine Senkung der Atemstromstärke, sowie verkürzte In- und Expirationszeiten, bedingt durch den Verlust an Lungenparenchym. 18 Tage später hat mit der weitgehenden Wiederherstellung des ursprünglichen Lungenparenchyms eine Angleichung an die Werte der nicht-operierten Tiere stattgefunden.

Die Verbesserung der Lungenfunktion 21 Tage nach Pneumonektomie im Vergleich zu 3 Tagen nach Pneumonektomie korreliert somit mit der bereits demonstrierten Normalisierung des Lungenvolumens und der der gasaustauschenden Oberfläche.

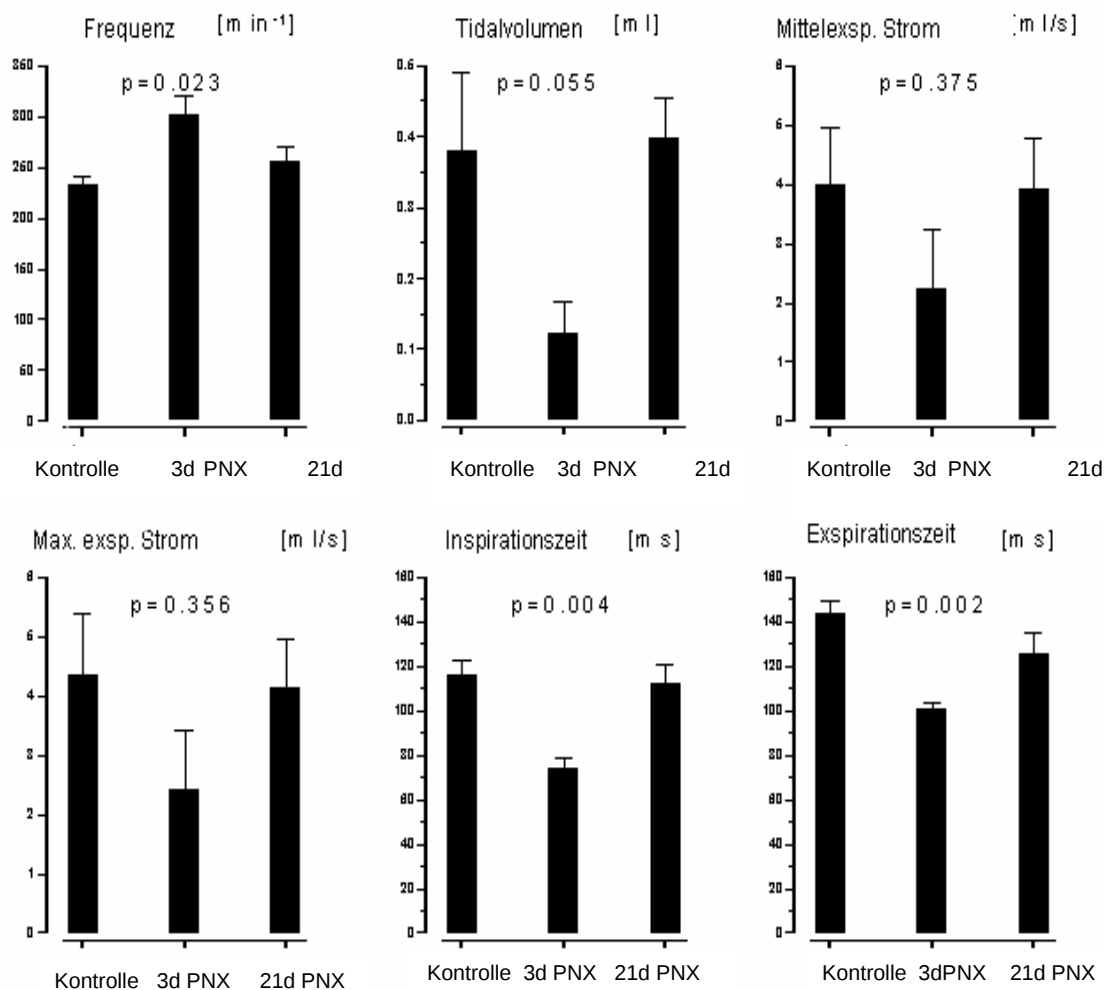


Abbildung 4.7 – Lungenfunktion in vivo.

Darstellung der Atemfrequenz, des Tidalvolumens, der mittelexpiratorischen sowie der maximalen Atemstromstärke, der Inspirationszeit und der Expirationszeit spontan atmender Mäuse. Lungenfunktionsuntersuchungen wurden vor Pneumonektomie (Kontrolle) sowie an Tag 3 (3d PNX) und Tag 21 (21d PNX) nach Pneumonektomie durchgeführt. An Tag 3 zeigten sich eine erhöhte Atemfrequenz, verringerte Atemstromstärken, verringertes Tidalvolumen und verringerte Inspirations- und Expirationszeiten. Diese Veränderungen repräsentieren die funktionelle Einschränkung durch die Resektion der linken Lunge. Alle Parameter sind 21 Tage nach Pneumonektomie weitgehend normalisiert (Mittelwerte $\pm$ SEM, $n=4$ pro Untersuchungszeitpunkt).

4.6 Kardialer Ventrikelmassenquotient als Parameter einer rechtsventrikulären Hypertrophie

Bei einer Erhöhung des Widerstandes des pulmonalen Gefäßbettes kommt es durch die vermehrt zu leistende myokardiale Arbeit des rechten Herzens zu einer rechtsventrikulären Hypertrophie als indirekter Parameter einer pulmonalen Hypertonie.

Der rechte Ventrikel sowie der linke Ventrikel samt Septum wurden 21 Tage nach Pneumonektomie (n=5) sowie bei nicht operierten Kontrollmäusen (n=16) präpariert und getrocknet. Der Quotient aus der Masse des rechten Ventrikels/Masse des linken Ventrikels plus Septum wurde bestimmt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Ventrikelmassenquotienten, somit kein Anhalt für das Vorliegen einer signifikanten pulmonalen Hypertonie (Abb. 4.8).

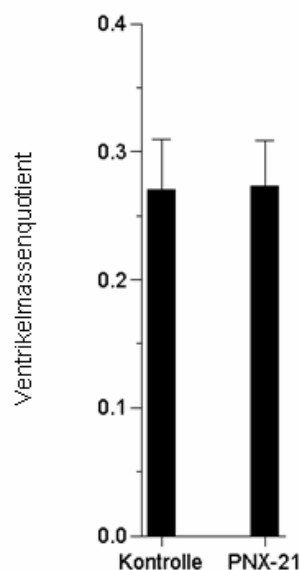


Abbildung 4.8 - Vergleich der Ventrikelmassenquotienten R/L.

21 Tage post operationem zeigten die Herzen der linksseitig pneumonektomierten Tiere keine signifikante Zunahme der Ventrikelmasse des rechten Ventrikels.

n(PNX-21)=5, n(Kontrolle)=16;

Mittelwerte ± STABW

5 Diskussion

Obwohl das kompensatorische Lungenwachstums bereits bei vielen verschiedenen Spezies (24,30,73,98,119,136,170) beobachtet wurde, sind die molekularen Mechanismen, welche dieses Lungenwachstum initiieren und regulieren, bis heute weitgehend unklar (63).

Das kompensatorische Lungenwachstum verläuft bei den unterschiedlichen Säugetierarten grundsätzlich ähnlich, Unterschiede treten allerdings zwischen den Geschlechtern, dem Alter und dem hormonellen Status auf (28). Das in der vorgelegten Arbeit Anwendung findende Modell des post-Pneumonektomie Lungenwachstums der Inzuchtmaus C57Bl/6N eignet sich möglicherweise sehr gut für die Untersuchung der Induktion und Regulation der Alveolarisierung im adulten Organismus. Grundlage dafür ist allerdings die detaillierte Kenntnis der Kinetik und Quantität des kompensatorischen Wachstums, seiner Qualität, Lokalisation und Funktionalität, da insbesondere diese in den bisherigen Veröffentlichungen bezüglich des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus (27,97,194) keine Berücksichtigung finden. Das Tiermodell der Maus bietet auf Grund der Möglichkeiten genetisch manipulierter Stämme einzigartige experimentelle Möglichkeiten von hoher biologischer Aussagekraft. Um geschlechtsspezifische Einflussfaktoren weitestgehend zu minimieren, wurden nur männliche Tiere derselben Altersstufe (12-16 Wochen) verwendet.

Die Klasse der Säugetiere zeigt eine ausgeprägte Variationsbreite in den Organgewichten der Herzen, Lungen, Nieren und anderer großer Organsysteme der verschiedenen Spezies. Trotzdem folgen diese Organe großer und kleiner Säuger physiologisch ähnlichen Systemen bezüglich ihrer Morphologie und Funktion. Auch bei Mäusen findet sich ein konstantes Verhältnis von Lungenvolumen zu Körpergewicht. Um Volumina und morphometrische Parameter vergleichbar zu machen, wurden daher die Ergebnisse für das individuelle Gewicht normalisiert (durch dieses dividiert) (163).

Die Tatsache, dass in verschiedenen Säugetierspezies auch im Erwachsenenalter unter gewissen Umständen eine Rekonstitution des Lungenparenchyms und der gasaustauschenden Oberflächen stattfindet (45,63,74,75,99) legt die Existenz intrinsischer biologischer Regulationsmechanismen nahe, welche die pulmonale Gewebemöostase,

das Wachstum der Alveolen und die Neoalveolarisierung steuern (28,88,89,90,97,112,151).

Die hier vorgelegten Daten bilden die Grundlage zur weiteren funktionellen Untersuchung dieser Regulationsmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass es in der Maus über einem Zeitraum von drei Wochen nach einer linksseitigen Pneumonektomie zu einer vollständigen Wiederherstellung des Lungenvolumens und der Gasaustauschoberfläche kommt, die zu einer Normalisierung auch funktioneller Parameter in der Bodyplethysmographie führte.

Mit der Erstellung einer Wachstumskurve durch Bestimmung der Lungenvolumina des rechten Lungenflügels am 1., 3., 5., 7., 10. und 21. Tag nach linksseitiger Pneumonektomie, bei der im Mittel 30,6% des Lungenvolumens entfernt wurden, konnte im Vergleich zu einer nicht-operierten Kontrollgruppe gezeigt werden, dass es in diesem Zeitraum zu einer vollständigen Wiederherstellung des ursprünglichen Volumens der gesamten Lunge kommt.

Dabei ist die Volumenzunahme der einzelnen Lungenlappen der rechten Lunge unterschiedlich stark ausgeprägt, der kardiale Lappen zeigt die stärkste relative Volumenzunahme. Dieses ist möglicherweise durch die größte räumliche Entfaltungsmöglichkeit für den kardialen Lappen gegeben, da dieser bei der Maus unter dem Herzen transmediastinal auf die linke Seite gelangen kann und dort viel Platz im linken leeren Hemithorax einnehmen kann. Die Dehnung des Lungengewebes ist ein Schlüsselreiz der Initiierung des post-Pneumonektomie Lungenwachstums, und diese könnte durch die Evakuierung des linken Hemithorax am stärksten auf den kardialen Lappen wirken und in geringerer Stärke auf die übrigen Lappen (74,170).

Mittels der quantitativen Bestimmung der gesamt-Desoxyribonukleinsäure der Lungen wird ein annähernder Rückschluss auf die gesamte Zellmasse der Lungen möglich. Die DNA-Messungen in der vorliegenden Arbeit zeigten eine signifikante Erhöhung der gesamt-DNA-Menge der rechten Lunge eines linksseitig pneumonektomierten Tieres im Vergleich zu der rechten Lunge nicht-operierter Mäuse. Die Gesamt-DNA-Masse der rechten Lunge nach Pneumonektomie war vergleichbar derjenigen linker und rechter Lungen nicht operierter Mäuse. Dies bedeutet einen massiven Zugewinn an pulmonalen Zellen innerhalb der relativ kurzen Beobachtungszeit von 21 Tagen. Vergleichbare Ergebnisse wurde bereits vor kurzem beschrieben (75, 97).

Der signifikante Zuwachs an Zellzahl muss mit einer signifikanten Proliferation pulmonaler Zellen einhergehen. Untersuchungen zur Proliferation mit Bromodesoxyuridin (54) zeigten eine signifikante Zunahme des Proliferationsindex septaler Zellen (Abb. 4.4) den ersten 10 Tagen nach Pneumonektomie. Immunhistologische Untersuchungen mit dem nukleären Proliferationsmarker Ki67 an Tag 7 nach Pneumonektomie verglichen mit Kontrolltieren zeigte ebenfalls eine massiv vermehrte Proliferation in der Pneumonektomiegruppe (Abb. 4.5). Die weitere Spezifizierung der proliferierenden Zellen anhand der Ko-Expression zelltypspezifischer Antikörper und Ki67 zeigte (Abb. 4.6), dass alle wichtigen zellulären Kompartimente an dieser Proliferation beteiligt sind (Endothel, Bronchial- und Alveolarepithel, glatte Muskelzellen, Fibroblasten). Proliferation war in allen Bereichen der Lunge zu beobachten, mit teilweise besonderer Betonung in subpleuralen Bereichen, was eine lokoregionale Begünstigung des Lungenwachstums subpleural nahe legt. Die Lokalisation des Alveolenwachstums sowie der Bildung neuer Septen im adulten Organismus ist bisher nicht genau bekannt. In der späten fetalen und der postnatalen Lungenentwicklung werden die Alveolen durch die Generierung der sekundären Septen gebildet. Die primären Septen bilden die Lufträume in der letzten Phase der Lungenentwicklung vor der alveolären Phase, der sog. sakkulären Phase. Primäre Septen enthalten eine kapilläre Doppelmembran, also eine Kapillare für jede epitheliale Seite des primären Septums. Zwischen den Kapillarmembranen entstehende Elastinfasern und Fibroblasten heben diese mitsamt der anliegenden Epithelmembran als sekundäres Septum aus der Ebene des primären Septums heraus, und bilden somit eine neue Alveole (32). Dieses primordiale sekundäre Septum enthält ebenfalls eine kapilläre Doppelmembran, welche im weiteren Verlauf der Septenreifung zu einer einzigen Kapillarschicht im Septum verschmilzt. Burri et al. postulierten, dass Alveolen nur in Bereichen entstehen können, die wie die primären Alveolarsepten eine kapilläre Doppelmembran besitzen (32). Diese befinden sich in der adulten Lunge an den Grenzflächen der Alveolen zu den großen Luftwegen, den großen Gefäßen und zu der Pleura.

In den Semidünnschnittpräparaten, welche in der vorliegenden Arbeit zur stereologischen Untersuchung der Lungenstruktur verwendet wurden, fielen noch an Tag 21 nach Pneumonektomie Areale mit verdickten Alveolarsepten auf (Abb. 4.3). Diese waren ebenfalls subpleural lokalisiert. Bindegewebsfärbungen zeigten, dass die Verdickung durch eine Hyperzellularität bedingt war und nicht durch vermehrte Einlagerung von

Extrazellulärmatrix (Abb. 4.6G). Aus den erhobenen Morphometriedaten (vor allem: Ausgleich der alveolären Oberfläche unter Anstieg des mittleren Alveolardurchmessers nach Pneumonektomie) ergab sich als Schlußfolgerung eine Vergrößerung der alveolären Oberfläche durch zwei unterschiedliche Prozesse: 1. Neoalveolarisierung durch Generierung neuer Alveolarsepten, sowie 2. die Vergrößerung bereits vorhandener Alveolen. Der Befund, dass Zellproliferation in allen Bereichen der Lunge zu verzeichnen war, diese jedoch in subpleuralen Alveolen verstärkt erschien, könnte als Neoalveolarisierung subpleural sowie Expansion vorbestehender Alveolen, Bronchi und Gefäße in den zentraleren Lungenarealen gedeutet werden. Diese Hypothese bedarf jedoch genauerer Analyse durch weitergehende Untersuchungen.

Die Untersuchung lungenfunktioneller Parameter der Mäuse in vivo zeigte, dass drei Tage nach der unilateralen Pneumonektomie eine deutliche Verschlechterung der Lungenfunktion mit vermindertem Tidalvolumen und verminderter mittlerer Atemstromstärke, einschließlich der maximalen expiratorischen Atemstromstärke, erhöhter Atemfrequenz, erhöhter In- und Expirationszeit vorlag (Abb. 4.7).

21 Tage nach Pneumonektomie hatte eine Normalisierung dieser Parameter stattgefunden. Dies zeigt, einhergehend mit der histologischen, auch eine funktionelle Rekonstitution durch kompensatorisches Lungenwachstum.

Durch die unilaterale Pneumonektomie wird ein signifikanter Anteil nicht nur der Gasaustauschoberfläche sondern auch des pulmonalen Gefäßbettes entfernt. Dieses könnte zum Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes und damit zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie führen. Eine rechtsventrikuläre Hypertrophie wäre ein indirekter Hinweis auf das Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie. Es konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Massenzunahme des rechten Ventrikels festgestellt werden, eine signifikante pulmonale Hypertonie in diesem Pneumonektomiemodell ist damit zum untersuchten Zeitpunkt (21 Tage nach Pneumonektomie) nicht zu erwarten. Analog zu diesem Befund gibt es keine Hinweise auf die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie bei Patienten nach unilateraler Pneumonektomie (99,132,179). Die Möglichkeit der Lunge, durch Vasodilatation und Rekrutierung wenig oder nicht perfundierter Gefäße, einen erhöhten transpulmonalen Blutfluß ohne Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes zu erreichen, ist hinreichend bekannt (46, 111).

Für Kaninchen und Hunde ist eine Altersabhängigkeit des kompensatorischen Lungenwachstums nachgewiesen worden (36). Untersuchungen an adulten Hunden zeigten,

dass bei ihnen kompensatorisches Lungenwachstum nur nach der Entfernung von mehr als 50% des Lungenvolumen (rechte Lungenhälfte) auftritt (73,74), nicht allerdings nach der Resektion der linken Lunge, die einen Volumenanteil von 45% hat. Hundewelpen scheinen allerdings die Fähigkeit zu einer vollständigen Wiederherstellung der Lungenkapazität auch nach Entfernung kleinerer Lungenanteile zu haben (167). Im Gegensatz dazu wurde im Rattenmodell keine Altersabhängigkeit des Prozesses gefunden (178). In der vorliegenden Arbeit wurde die Altersabhängigkeit des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus nicht berücksichtigt, es wurden nur adulte Mäuse im Alter von 12-14 Wochen untersucht, da dieses Modell zur zukünftigen Evaluierung der Mechanismen des adulten Lungenwachstums dienen soll.

Unterschiedliche Faktoren wurden bereits im Hinblick auf die auslösenden Faktoren und den Ablauf des kompensatorischen Lungenwachstums untersucht. Eine entscheidende Rolle scheint dabei der mechanische Zug auf das verbliebene Lungengewebe zu spielen, der eine Stimulation der Zellproliferation bewirkt (109). Im Gegensatz dazu bewirkte die Verhinderung der mediastinalen Verschiebung mittels Einbringen einer Silikonprothese in den frei gewordenen Hemithorax eine Inhibition der regenerativen Vorgänge (74). Kaza et al. stellten fest, dass es im Verlauf des kompensatorischen Lungenwachstums zu einem frühen Anstieg des Proliferationsindex (Hyperplasie) und im Anschluss daran zu einem Anstieg der Protein-zu-DNA-Ratio (Hypertrophie) kommt (90). Entgegen der ursprünglichen Lehrmeinung, dass das kompensatorische Lungenwachstum ausschließlich auf einer Vermehrung oder Dehnung der Alveolen beruhe, wiesen Hsia et al. an Hundewelpen nach, dass proportional zur Zunahme der Alveolenmenge eine Vermehrung der bronchiolären Segmente und azinären Verzweigungsstellen stattfand (75). Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den in dieser Arbeit erhobenen stereologischen Daten. Die massenspezifischen Volumina der Lufträume, sowohl in den alveolären Gängen als auch in den Alveolen selber und die gesamte am Gasaustausch beteiligte Oberfläche pneumonektomierter Mäuse 21 Tage post operationem zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der nicht-operierten Kontrollgruppe. Lediglich die alveolären Septen der pneumonektomierten Mäuse stellten sich teilweise signifikant verdickt dar, als Hinweis auf noch ablaufende Differenzierungsvorgänge der neu gebildeten Alveolarsepten. Veränderungen der Bronchien (Ausdehnung des Bronchialepithels in vorherige Alveolargänge, vermehrte Verzweigung der kleinen Bronchien) wurden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Eine alleinige

Vergrößerung der Alveolarregion ohne paralleles Wachstum der luftleitenden Strukturen könnte zu einer relativen Obstruktion führen; eine solche wurde bei der Lungenfunktionsuntersuchung pneumonektomierter Mäuse nicht detektiert (der mittelexpiratorische Atemfluss ist ein guter Parameter für Obstruktion in dem Maus head-out Bodyplethysmographen) (64, 180). Eine proportionale Zunahme der luftleitenden Systeme ist als grundlegende Voraussetzung für die Wiederherstellung der gemessenen regelrechten Lungenfunktion in Hunden beschrieben worden (75). Ob aufgrund der deutlich geringeren Gasmengen in Mauslungen ebenfalls eine Expansion der terminalen Bronchiolen notwendig ist, ist derzeit unklar.

Takeda et al. zeigten, dass Hundewelpen ein Jahr nach einer rechtsseitigen Pneumonektomie eine normale Funktion des Gasaustausches aufweisen. Die Werte der Sauerstoffaufnahme, des Lungenvolumens und der arteriellen Blutgase entsprachen den Normwerten nicht-operierter Kontrolltiere. Post mortem konnte an diesen Tieren 18 Monate nach der Operation an Hand des Volumens der Alveolarsepten und der zellulären Kompartimente der Septen demonstriert werden, dass diese ebenfalls den Normwerten entsprachen (167). Andere funktionelle Untersuchungen als Bodyplethysmographie wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, Gasaustauschparameter wie z.B. CO-Diffusion wären von höchstem Interesse, sind jedoch derzeit in der Maus noch nicht etabliert.

Beim erwachsenen Menschen wurde kein kompensatorisches Lungenwachstum beobachtet, Kinder zeigen nur eine partielle Restitution durch Lungenwachstum nach Teilresektion des Lungengewebes (99). Implantationen von Teilen einer adulten humanen Lunge in Kinder resultierten lediglich in einer Dehnung des Transplantates während der Wachstumsphase, eine Neoalveolarisierung blieb aus (50).

Eine Langzeitstudie an Patienten, bei denen zwischen dem 2. und dem 40. Lebensjahr eine Lungenteilresektion durchgeführt wurde, ergab für die verschiedenen Altersstufen unterschiedliche Ergebnisse: wurde die Pneumonektomie im Alter von 0-5 Jahren durchgeführt, unterschied sich die spätere Lungenfunktion kaum von der einer vollständigen Lunge, bei 6-20-jährigen zeigte sich eine signifikant geringere Ventilationskapazität, bei >20-jährigen trat nochmals eine deutlichere Verminderung auf. Trotzdem wiesen alle Studienteilnehmer nach 30 Jahren Beobachtungszeit eine gute Lungenfunktion auf, ein Hinweis auf langfristige Funktionalität der Anpassungsmechanismen (99). Lungenfunktion allein lässt jedoch keine Rückschlüsse auf

regenerative Prozesse des Lungenparenchyms zu, da die Lunge eine hohe funktionelle Kompensationsfähigkeit aufweist.

Die in dieser Arbeit untersuchten Parameter vermitteln ein detailliertes Bild des kompensatorischen Lungenwachstums bei der Maus.

Innerhalb eines Zeitraumes von drei Wochen nach linksseitiger Pneumonektomie tritt eine rasche und vollständige Regeneration verlorenen Gewebes in der verbliebenen Lunge ein. Eine signifikante zelluläre Proliferation wichtiger struktureller pulmonaler Zelltypen, die Wiederherstellung der ursprünglichen alveolären Septenmasse und –oberfläche sowie eine Normalisierung der Atemparameter konnte gezeigt werden. Die Volumenzunahme der 4 Lungenlappen der rechten Mauslunge war disproportional, die stärkste Expansion war im kardialen Lappen zu beobachten. Das post-Pneumonektomie Lungenwachstum der Maus ist hervorragend reproduzierbar.

Damit bildet diese Studie an der C57Bl/6-Inzuchtmaus die Grundlage für weiterführende funktionelle Untersuchungen der Regulationsmechanismen des kompensatorischen Lungenwachstums in adulten Säugetieren (112).

Das Verständnis dieser Mechanismen kann als Wegbereiter für die Therapie des Menschen dienen. Das Ziel solcher Untersuchungen sind neue Therapiestrategien einer iatrogenen Induktion von Neoalveolarisierung und Expansion der Gasaustauschoberfläche beim erwachsenen Menschen.

6 Zusammenfassung

Das kompensatorische Lungenwachstum nach unilateraler Pneumonektomie wurde bisher bei verschiedenen Säugetierspezies nachgewiesen. Die Mechanismen der Initiierung und Steuerung des kompensatorischen Lungenwachstums sind bis heute weitgehend unverstanden.

In dieser Arbeit wurde das post-Pneumonektomie Lungenwachstum an C57BL6-Inzuchtmäusen untersucht, insbesondere das Ausmaß und die Kinetik der Volumenzunahme (Volumenbestimmung), die zelluläre Proliferation (Immunhistologie), die strukturellen Veränderungen des Lungenparenchyms auf Basis morphometrischer Untersuchungen, die Lokalisation der Neubildung von Alveolarsepten (Immunhistologie, Histochemie), die Typisierung der proliferierenden Zellen (Immunhistologie) sowie Parameter der Lungenfunktion in vivo.

Es zeigte sich nach linksseitiger Pneumonektomie eine rasche und vollständige Regeneration des Lungenvolumens, der Zellzahl, der Alveolaroberfläche und der Alveolarsepten in der verbleibenden rechten Lunge. Der Zugewinn an Alveolaroberfläche wurde zu etwa gleichen Teilen durch Neoalveolarisierung (Septenbildung) und Expansion vorbestehender Alveolen erreicht. Endothelzellen, Bronchial- und Alveolarepithelzellen, glatte Muskelzellen sowie alveoläre Fibroblasten proliferierten während des Lungenwachstums. Es wurden Hinweise auf eine prädominante Septenbildung in subpleuralen Arealen gefunden. Die Untersuchungen spontan atmender Mäuse mittels eines Bodyplethysmographen zeigten am dritten Tag nach Pneumonektomie eine Abnahme des Tidalvolumens, des mittelexpiratorischen und maximalen Atemstromes und der Inspirations- und Expirationszeit sowie eine Zunahme der Atemfrequenz. Eine weitgehende Normalisierung dieser Lungenfunktionsparameter war am 21. Tag nach der Pneumonektomie zu verzeichnen.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Tiermodell des kompensatorischen Lungenwachstums der Maus gut geeignet ist, die Induktion und Regulation des Lungenwachstums sowie der Neoalveolarisierung im adulten Säugetier zu untersuchen. Dies eröffnet unter anderem die Möglichkeit der Nutzung genmanipulierter Mauslinien für spezifische biologische Fragestellungen zu intrinsischen Programmen, welche das Wachstum und die Neubildung von Alveolarsepten regulieren.

Das Verständnis dieser Regulationsmechanismen ist derzeit eine der größten Herausforderungen der Pneumologie in Hinblick auf neue therapeutische Ansätze für diverse Lungenerkrankungen, welche mit dem Umbau oder dem Verlust von Alveolarsepten einhergehen.

7 Summary

Compensatory growth of the lung after unilateral pneumonectomy could be shown in different mammalian species. However, the mechanisms of this compensatory growth remain unclear.

This study focused on the post-pneumonectomy lung growth of the wildtype C57BL6-inbred mouse. The quantity and kinetics of lung volume restoration, the cellular proliferation, structure of the regenerated lung parenchyma and the localisation of the neo-alveolarization were assessed. Pulmonary function was investigated using a mouse head-out body-plethysmograph.

Compensatory growth of the right lung after left sided pneumonectomy leads to rapid and complete restoration of the initial lung volume, cell number, alveolar surface and function. The restoration of the gas-exchange surface was established by two parallel processes, neo-alveolarization and expansion (not distension) of pre-existing alveoli. Phenotypical characterization of the proliferating cells revealed that all major structural cell types (endothelial cells, bronchial and alveolar epithelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells) proliferate during compensatory lung growth. The significant increase of the proliferation-index seemed to be locally accentuated in subpleural areas.

Mid-expiratory airflow and tidal volume of the spontaneously breathing mouse were significantly decreased 3 days after pneumonectomy, whereas breathing frequency was increased, 21 days after pneumonectomy lung function parameters were normalised.

In conclusion this work showed that the C57Bl6-mouse is suitable model to investigate the induction and regulation of compensatory lung growth and neo-alveolarization in adult mammals. This study provides a basis for future studies in genetically altered mice, which will allow to address the intrinsic regulative pathways of the lung growth that could help to develop new therapeutic strategies leading to a successful induction of alveolarization in adult mammals.

8 Literaturverzeichnis

1. Aase K, Abramsson A, Karlsson L, Betsholtz C, Eriksson U. Expression analysis of PDGF-C in adult and developing mouse tissues. *Mech Dev* 2002; 110 (1-2): 187- 91
2. Adamson IYR, King GM. Postnatal development of the rat lung following retarded fetal lung growth. *Pediatr Pulmonol* 1988; 4: 230- 236
3. Amit T, Barkley, Guy J, Youdim MBH. Specific binding sites for prolactin and growth hormone in the adult rabbit lung. *Mol Cell Endocrinol* 1987; 49: 17- 24
4. Ansari MA, de Mello DE, Devaskar UP. Effect of prenatal glucocorticoid on fetal lung ultrastructural maturation in hyt/hyt mice with primary hypothyroidism. *Biol Neonate* 2000; 77 (1): 29- 36
5. Atabai K, Ishigaki M, Geiser T, Ueki I, Matthay MA, Ware LB. Keratinocyte growth factor can enhance alveolar epithelial repair by nonmitogenic mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283 (1): L 163-9
6. Barlett D Jr. Postnatal growth of the mammalian lung: Influence of low and high oxygen tensions. *Respir Physiol* 1970; 9: 58- 64
7. Barlett D. Postnatal growth of the mammalian lung: Influence of excess growth hormone. *Respir Physiol* 1971; 12: 297- 304
8. Barlett D Jr, Remmers JE. Effects of high altitude exposure on the lung of young rats. *Respir Physiol* 1971; 13: 116- 125
9. Bellabarba D, Fortier S, Belisle S, Lehoux JG. Triiodothyronine nuclear receptors in liver, brain and lung neonatal of rats. Effects of hypothyreodism and thyroid replacement therapy. *Biol Neonate* 1984; 45: 41- 48

10. Ben-Harari RR, Amit T, Youdim MB. Binding of oestradiol, progesterone and prolactin in rat lung. *J Endocrinol* 1983; 97(2): 301-10
11. Bennett RA, Colony PC, Addison JL, Rannels DE. Effects of prior adrenalectomy on postpneumonectomy lung growth in the rat. *Am J Physiol* 1985; 248: E70- E74
12. Berger LC, Burri PH. Timing and quantitative recovery in the regenerating rat lung. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 777- 783
13. Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 2001; 3(5): 512- 516
14. Betsholtz C, Raines E. Platelet-derived growth factor: a key regulator of connective tissue cells in embryogenesis and pathogenesis. *Kidney Int.*1997; 51: 1361- 1369
15. Bhakoo ON, Narang A, Karthikeyan G, Kumar P. Spectrum of respiratory distress in very low birthweight neonates. *Indian J Pediatr* 2000; 67, 803- 804
16. Bhatt AJ, Amin SB, Chess PR, Watkins RH, Maniscalco WM. Expression of vascular endothelial growth factor and Flk-1 in developing and glucocorticoid-treated mouse lung. *Pediatr Res* 2000; 47 (5): 606- 13
17. Bostrom H, Gritli-Linde A, Betsholtz. PDGF-A/ PDGF alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not for early lung branching morphogenesis. *Dev Dyn* 2002; 223(1): 155- 62
18. Boström H, Willetts K, Pekny M, Leveen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Törnell J, Heath JK, Betsholtz C. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 1996; 85(6): 863- 73

19. Bourbon JR, Rieutort M, Engle MJ, Farrell PM. Utilization of glykogen for phospholipid synthesis in fetal rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1982; 712, 382-389
20. Breitbach C. Zur mikroskopischen Anatomie der Lunge von Ratte, Maus, Meerschweinchen und Kaninchen. *Dissertationsarbeit*, München 1986
21. Bremer JL. The fate of the remaining lung tissue after lobectomy or pneumonectomy. *J Thorac Surg* 1937; 6: 336- 343
22. Brody JS, Buhain WJ. Hormonal influence on post-pneumonectomy lung growth in the rat. *Respir Physiol* 1973; 344- 355
23. Brody JS, Buhain WJ. Hormone-induced growth of the adult lung. *Am J Physiol* 1972; 223: 1444- 1450
24. Brody JS, Burki R, Kaplan N. Deoxyribonucleic acid synthesis after unilateral pneumonectomy in the rabbit. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 307- 316
25. Brody JS, Lahiri S, Simpser M, Motoyama EK, Velazquez T. Lung elasticity and airway dynamics in Peruvian natives to high altitude. *J Appl Physiol* 1977; 42: 245- 251
26. Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithel cell proliferation in human fetal lung in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281 (4):L1001- 10
27. Brown LM, Malkinson AM, Rannels DE, Rannels SR. Compensatory lung growth after partial pneumonectomy enhances tumorigenesis induced by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res* 1999; 59: 5089- 92

28. Brown LM, Rannels SR, Rannels DE. Implications of post-pneumonectomy compensatory lung growth in pulmonary physiology and diseases. *Respir Res* 2001; 2: 340- 347
29. Bucher JR, Roberts RJ. The development of the newborn rat lung in hyperoxia: a dose response study of lung growth, maturation, and changes in antioxidant enzyme activity. *Pediatr Res* 1981; 15: 999- 1008
30. Buhain WJ, Brody JS. Compensatory growth of the lung following pneumonectomy. *J Appl Physiol* 1973; 35: 898- 902
31. Burri PH. The postnatal growth of the rat lung. III. Morphology. *Anat Rec* 1974; 180: 77- 98
32. Burri PH. Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. In: McDonald JA, Lenfant C (ed.). *Lung Biology in Health and Disease*. New York: Dekker Inc.; 1997; 100: p 1- 32.
33. Burri PH, Dbaly J, Weibel ER. The postnatal growth of the rat lung. I Morphometry. *Anat Rec* 1974; 178: 711- 730
34. Burri PH, Hislop AA. Structural consideration. Early intervention in childhood asthma. *Eur Respir J Suppl* 1998; 27: 59s- 65s
35. Burri PH, Weibel ER. Morphometric estimation of pulmonary diffusing capacity. I. Effect of PO₂ on the growing lung, adaptation of the growing rat lung to hypoxia. *Respir Physiol* 1971; 11: 247- 264
36. Cagle PT, Langston C, Thurlbeck WM. The effect of age on Postpneumonectomy growth in rabbits. *Pediatr Pulmonol* 1988; 5: 92-95
37. Cagle PT, Thurlbeck WM. Postpneumonectomy compensatory lung growth. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1314-1326

38. Chinoy MR, Graybill MM, Miller SA, Lang CM, Kauffman GL. Angiopoetin-1 and VEGF in vascular development and angiogenesis in hypoplastic lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283 (1): L60- 6
39. Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 1994; 269: 32023- 32026
40. Cohn R. Factors affecting the postnatal growth of the lung. *Anat Rec* 1939; 75: 195- 205
41. Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, Plaisance S, Dor Y, Keshet E, Lupu F, Nemery B, Dewerchin M, van Veldhoven P, Plate K, Moons L, Collen D, Carmeliet P. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature Medicine* 2002; 8(11): 1329
42. Cui D, Jafri A, Thet LA. Effect of 70% oxygen on postresectional lung growth in rats. *J Toxicol Environ Health* 1988; 1: 71- 86
43. Cunningham EL, Brody JS, Jain BP. Lung growth induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 1974; 37: 362- 366
44. Dammann CE, Ramadurai SM, McCants DD, Pham LD, Nielsen HC. Androgen regulation of signalling pathways in late fetal mouse lung development. *Endocrinology* 2000; 141 (8): 2923-9
45. De Carlo Massaro G, Radaeva S, Clerch LB, Massaro D. Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283 (2): L305-9
46. Deetjen P, Speckmann EJ (ed.). *Lehrbuch Physiologie*; Urban & Fischer, 3. Auflage, 1999

47. De Troyer A, Desir D, Copinschi G. Regression of lung size in adults with growth hormone deficiency. *Q J Med* 1980; 49: 329- 340
48. Distler J, Hirth A, Kurowska-Stoarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003; 47(3): 149-61
49. Dubaybo BA, Bayasi G, Rubeiz GJ. Changes in tumor necrosis factor in postpneumonectomy lung growth. *J Thorac Cardiovas Surg* 1995; 110: 396-404
50. Duebener LF, Takahashi Y, Wada H, Tschanz SA, Burri PH, Schafers HJ. Do mature pulmonary lobes grow after transplantation into immature recipients? *Ann. Thorac. Surg* 1999; 68: 1165- 70
51. Ema M et al. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia- inducible factor 1 α regulates VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94, 4273-4278
52. Faridy EE, Sanii MR, Thliveris JA. Influence of maternal pneumonectomy on fetal lung growth. *Respir Physiol* 1988; 72: 195-210
53. Fehrenbach A, Bube C, Hohlfeld JM, Stevens P, Tschernig T, Hoymann HG, Krug N, Fehrenbach H. Surfactant homeostasis is maintained in vivo during keratinocyte growth factor-induced rat lung type II cell hyperplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(9): 1264-70
54. Fehrenbach H, Fehrenbach A, Pan T, Kasper M, Mason RJ. Keratinocyte growth factor-induced proliferation of rat airway epithelium is restricted to Clara cells in vivo. *Eur Respir J* 2002; 20(5): 1185-97
55. Fehrenbach H, Ochs M. Studying lung ultrastructure. In Uhlig S, Taylor AE, ed. *Methods in pulmonary research*; Birkhäuser Verlag, Basel 1998; S. 429-54

56. Findlay RD, Taeusch HW, Walther FJ. Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. *Pediatrics* 1996; 97: 48-52
57. Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel , Damert A, Risau V. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 1997; 63(1): 51-60
58. Frank L, Bucher JR, Roberts RJ. Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol* 1978; 45: 699-704
59. Friedli B, Kent G, Kidd BS. The effect of increased pulmonary blood flow on the pulmonary vascular bed in pigs. *Pediatr res* 1975; 9(6): 547-53
60. Ford GT, Galaugher W, Forkert L, Fleetham JA, Thurlbeck WM, Anthonisen NR. Static lung function in puppies after pneumonectomy. *J Appl Physiol* 1981; 50: 1146-1150
61. Foster DJ, Yan X, Bellotto DJ, Moe OW, Hagler HK, Estrera AS, Hsia CC. Expression of epidermal growth factor and surfactant proteins during postnatal and compensatory lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(5): L981-90
62. Gaultier C, Harf A, Girard F. Lung mechanics in growing guinea pigs treated with growth hormone. *J Dev Phys* 1986; 8: 315-321

63. Gilbert KA, Rannels DE. From Limbs to Lungs: A Newt Perspective on Compensatory Lung Growth. *News Physiology Science* 1999; Volume 14
64. Glaab T, Daser A, Braun A, Neuhaus-Steinmetz U, Fabel H, Alarie Y, Renz H. Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280 (3): L565-73
65. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000; 342, 1500-07
66. Guo J, Yi ES, Havill AM, Sarosi I, Whitcomb L, Yin S, Middleton SC, Piguet P, Ulich TR. Intravenous keratinocyte growth factor protects against experimental pulmonary injury. *Am J Physiol* 1998; 275 (4 Pt 1): L800-5
67. Halliday HL. Synthetic or natural surfactants: the case for natural surfactant. *J Perinat Med* 1996; 24: 417-426
68. Hardie WD, Bruno MD, Huelsman KM, Iwamoto HS, Carrigan PE, Leikauf GD, Whitsett JA, Korfhagen TR. Postnatal lung function and morphology in transgenic mice expressing transforming growth factor- alpha. *Am J Pathol* 1997; 151 (4): 1075-83
69. Hardie WD, Piljan-Gentle A, Dunlavy MR, Ikegami M, Korfhagen TR. Dose-dependent lung remodelling in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281 (5): L1088-94
70. Healy AM, Morgenthau L, Zhu X, Farber HW, Cardoso WV. VEGF is deposited in the subepithelial matrix at the leading edge of branching airways and stimulates neovascularization in the murine embryonic lung. *Dev Dyn* 2000; 219, 341-352

71. Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995; 80: 213-223
72. Hick C, Hick A. Kurzlehrbuch Physiologie; *Gustav Fischer Verlag*, 2. Auflage, 1997, S.111-128
73. Hsia CCW, Herazo LF, Fryder-Doffey F, Weibel ER. Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy. *J Clin Invest* 1994; 94: 405- 412
74. Hsia CCW, Wu EY, Wagner E, Weibel ER. Preventing mediastinal shift after pneumonectomy impairs regenerative alveolar tissue growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 281: L1279- L1287
75. Hsia CC, Zhou XS, Bellotto DJ, Hagler HK. Regenerative growth of respiratory bronchioles in dogs. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2000; 279 (1): L136- 42
76. Ikegami M, Jobe AH, Pettenazzo A, Seidner SR, Berry DD, Ruffini L. Effects of maternal treatment with corticosteroids, T₃, TRH, and their combinations on lung function of ventilated preterm rabbits with and without surfactant treatments. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 892- 898
77. Islam S, Narra V, Cote GM, Manganaro TF, Donahoe PK, Schnitzer JJ. Prenatal vitamin E treatment improves lung growth in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatric Surg* 1999; 34 (1): 172-6 discussion 176-7
78. Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tudor RM, Voelkel NF, Abman SH. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279 (3): L600-7
79. Jankov RP, Luo X, Campbell A, Belcastro R, Cabacungan J, Johnstone L, Frndova H, Lye SJ, Tanswell AK. Fibroblast Growth Factor Receptor- 1 and

- Neonatal Compensatory Lung Growth after 95% Oxygen Exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Mar 5 (epub ahead of print)
80. Jobe AH. Pulmonary surfactant therapy. *N Engl J Med* 1993; 328: 851-868
 81. Johnson RLJ, Cassidy SS, Grover R, Ramanathan M, Estrera A, Reynolds RC, Epstein R, Schutte J. Effect of pneumonectomy on the remaining lung in dogs. *J Appl Physiol* 1991; 70: 849-858
 82. Jouanneau E, Bachelot T. Cerebral tumors and neoangiogenesis. *Neurochirurgie* 1999; 45 (4): 293-300
 83. Kalinichenko VV, Zhou Y, Shin B, Stolz DB, Watkins SC, Whitsett JA, Costa RH. Wild-type levels of the mouse Forkhead Box f1 gene are essential for lung repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282 (6): L1253-65
 84. Karl HW, Russo LA, Rannels DE. Inflation-associated increases in lung polyamine uptake: role of altered pulmonary vascular flow. *Am J Physiol* 1989; 257: E729- E735
 85. Karl HW, Wolpert EB, Rannels DE. Minimizing perioperative hypoxemia does not affect postpneumonectomy lung growth. *Am J Physiol* 1988; 255: E65-E69
 86. Kaner RJ, Crystal RG. Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung. *Mol Med* 2001; 7, 240-246
 87. Kaza AK, Cope JT, Fiser SM, Long SM, Kern JA, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. Contrasting natures of lung growth after transplantation and lobectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123 (2): 288-94
 88. Kaza AK, Kron IL, Kern JA, Long SM, Fiser SM, Nguyen RP, Tribble CG, Laubach VE. Retinoic Acid Enhances Lung Growth After Pneumonectomy. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1645-50

89. Kaza AK, Kron IL, Leuwerke SM, Tribble CG, Laubach VE. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation* 2002; 106 (12 Suppl 1): I120-I124
90. Kaza AK, Kron IL, Long SM, Fiser SM, Stevens PM, Kern JA, Tribble CG, Laubach. Epidermal growth factor receptor up-regulation is associated with lung growth after lobectomy. *Ann Thorac Surg* 2001; 72(2): 380-5
91. Kaza AK, Laubach VE, Kern JA, Long SM, Fiser SM, Tepper JA, Nguyen RP, Shockey KS, Tribble CG, Kron IL. Epidermal growth factor augments postpneumonectomy lung growth. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 916-922
92. Kazlauskas A. Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 5-14
93. Kennedy JD. Lung function outcome in children of premature birth. *J Paediatr Child Health* 1999; 35, 516-521
94. Khadempour MH, Ofulue AF, Sekhon HS, Cherukupalli Km, Thurlbeck WM. Changes of growth hormone, somatomedin C, and bombesin following pneumonectomy. *Exp Lung Res* 1992; 18: 421-432
95. Klein JM, McCarthy TA. Inhibition of tyrosine kinase activity decreases expression of surfactant protein A in a human lung adenocarcinoma cell line independent of epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1355 (3): 218-30
96. Labbe A, Delcros B, Dechelotte P, Nouailles C, Grizard G. Comparative study of the binding of prolactin and growth hormone b rabbit and human lung cell membrane fractions. *Biol Neonate* 1992; 61: 179-187
97. Landesberg LJ, Ramalingam R, Lee K, Rosengart TK, Crystal RG. Upregulation of transcriptions factors in lung in the early phase of

- pneumonectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ;2001, 281: L1138-L1149
98. Langston C, Sachdeva R, Cowan MJ, Haines J, Crystal RG, Thurlbeck WM. Alveolar multiplication in the contralateral lung after unilateral pneumonectomy in the rabbit. *Am Respir Dis* 1977; 115: 7-13
 99. Laros CD, Westermann CJJ. Dilatation, compensatory growth, or both after pneumonectomy during childhood and adolescence. A thirty-year follow-up study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93: 570-576
 100. Lebeche D, Malpel S, Cardoso WV. Fibroblast growth factor interactions in the developing lung. *Mech Dev* 1999; 86 (1-2): 125-36
 101. Le Cras TD, Hardie WD, Fagan K, Whitsett JA, Korfhagen TR. Disrupted Pulmonary Vascular Development And Pulmonary Hypertension in Transgenic Mice Overexpressing Transforming Growth Factor-(alpha). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; Epub ahead of print
 102. Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282 (6): L1272-8
 103. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hemotological abnormalities. *Genes Dev* 1994; 8: 1875-1887
 104. Li H, Fredriksson L, Li X, Eriksson U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene* 2003; 22(10): 1501-10
 105. Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(2): 91-8

- 106.Lindahl P, Boström H, Karlsson L, Hellström M, Kalen M, Betsholtz C.
Role of platelet-derived growth factors in Angiogenesis and Alveogenesis.
Current Topics in Pathology, Volume 3/ 1999. Desmouliere A, Tuchweber B
(eds); Springer-Verlag Berlin Heidelberg;
- 107.Lindahl P, Karlsson L, Hellstrom M, Gebre-Medhin S, Willetts K, Heath JK,
Betsholtz C. Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack
of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung
development. *Development* 1997; 124(20): 3943-53
- 108.Lindenberg JA, Brehier A, Ballard PL. Triiodothyronin nuclear binding in fetal
and adult rabbit lung and cultured cells. *Endocrinology* 1978; 103: 1725-1731
- 109.Liu M, Skinner SJ, Xu J, Han RN, Tanswell AK, Post M. Stimulation of fetal
rat lung cell proliferation in vitro by mechanical stretch. *Am J Physiol Lung Cell
Mol Physiol* 1992; 263: L376-83
- 110.Loeb JN. Corticosteroids and growth. *N Engl J Med* 1976; 295: 547-552
- 111.Löllgren H. Kardiopulmonale Funktionsdiagnostik. Verlag Novartis, 3.
Auflage, 2000; S.147-150
- 112.Massaro D, Massaro GD. Pre- and postnatal lung development, Maturation and
Plasticity. Invited Review: Pulmonary alveoli: formation, the “call for oxygen”
and other regulators. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L345-
L358
- 113.Massaro D, Massaro GD. Retinoids, alveolus formation, and alveolar
deficiency: clinical implications.*Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(3): 271-4
- 114.Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P. Postnatal
development of alveoli: regulation and evidence for a critical period. *J Clin
Invest* 1985; 76: 1297-1305

115. Massaro GD, Massaro D, Chambon P. Retinoic acid receptor- α regulates pulmonary alveolus formation in mice after, but not during, perinatal period. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284(2): L431-3
116. Massaro GD, Massaro D, Chan WY, Clerch LB, Ghyselinck N, Chambon P, Chandraratna RA. Retinoic acid receptor- β : an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli. *Physiol Genomics* 2000; 4(1): 51-7
117. McBride JT. Lung volume after an increase in lung distension in pneumonectomized ferrets. *Appl Physiol* 1992; 73: 2448-2451
118. McBride JT. Postpneumonectomy airway growth in the ferret. *J Appl Physiol* 1985; 58: 1010-1014
119. McBride JT, Kirchner KK, Russ G, Finkelstein J. Role of pulmonary blood flow in postpneumonectomy lung growth. *Thorax* 1992; 36:424-427
120. McCoy DM, Salome RG, Kusner DJ, Iyar SS, Mallampalli RK. Identification of sex- specific differences in surfactant synthesis in rat lung. *Pediatr Res* 1999; 46(6): 722-30
121. Mendelson CR, Johnston JM, MacDonald PC, Snyder JM. Multihormonal regulation of surfactant synthesis by human fetal lung in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53: 307-311
122. Moore, Pesaud. Embryologie-Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. 4. Auflage, S. 267- 271; Schattauer- Verlag, 1996
123. Morishige WK, Guernsey DL. Triiodothyronine receptors in rat lung. *Endocrinology* 1978; 102: 1628-1632
124. Morishige WK, Joun NS. Influence of glucocorticoids on postnatal lung development in the rat: possible modulation by thyroid hormones. *Endocrinology* 1982; 111: 1587-1594

125. Morishige WK, Joun NS, Guernsey DL. Thyroidal influence on postnatal lung development in the rat. *Endocrinology* 1982; 110: 444-451
126. Nattie EE, Wiley CW, Barlett Jr D. Adaptive growth of the lung following pneumonectomy in rats. *J Appl Physiol* 1974; 37: 491-495
127. Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U, Kips J, Alarie Y, Renz H. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy* 2000; 121 (1): 57-67
128. Nichols KV, Floros J, Dynia DW, Veletza SV, Wilson CM, Gross I. Regulation of surfactant protein A mRNA by hormones and butyrate in cultured fetal rat lung. *Am J Physiol* 1990; 259: L488-L495
129. Niessen KH. Pädiatrie. Lehrbuch der Pädiatrie, Thieme-Verlag, 5. Auflage, 1999; S. 126, S.154
130. Nobuhara KK, di Fiore JW. Insulin-like growth factor-I gene expression in three models of accelerated lung growth; Department of Surgery, Harvard Medical School, Boston, USA; 1998
131. Noguchi A, Samaha H. Development changes in tropoelastin gene expression in the rat lung studied by in situ hybridization. *Am J Respir cell Mol Biol* 1991; 5: 571-578
132. Oswald-Mammosser M, Kessler R, Massard G, Wihlm JM, Weitzenblum E, Lonsdorfer J. Effect of lung volume reduction surgery on gas exchange and pulmonary hemodynamics at rest and during exercise. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(4): 1020-5

133. Price WA, Moats-Staats BM, Sekhorn HS, Chrzanowska BL, Thurlbeck WM, Stiles AD. Expression of the insulin-like growth factor system in postpneumonectomy lung growth. *Exp Lung Res* 1998; 24(2): 203-17
134. Rannels DE. Role of physical forces in compensatory growth of the lung. *Am J Physiol* 1989; 257: L179-L189
135. Rannels DE, Burkhardt LR, Watkins CA. Effects of age on the accumulation of lung protein following unilateral pneumonectomy in rats. *Growth* 1984; 48: 297-308
136. Rannels DE, Karl HW, Bennett RA. Control of compensatory lung growth by adrenal hormones. *Am J Physiol* 1987; 253: E343-E348
137. Rannels DE, Rannels SR. Compensatory growth of the lung. In *The Lung: Scientific Foundations*; Vol I. Edited by Crystal RG, West JB, Barnes PJ, Cherniak NS, Weibel ER. New York: Raven Press; 1997: 1035-1046
138. Rannels DE, Rannels SR. Compensatory growth of the lung following partial pneumonectomy. *Exp Lung Res* 1988; 14: 157-182
139. Rannels DE, Stockstill B, Crapo JD. Adrenalectomy modifies the cellular response to left pneumonectomy in the rat (abstract). *Am Rev Resp Dis* 1991; 143: A519
140. Rannels DE, Stockstill B, Mercer RR, Crapo JD. Cellular changes in the lungs of adrenalectomized rats following pneumonectomy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 351-362
141. Rannels DE, Russo LA. Compensatory Growth. In: Crystal RG, West JB, (ed.) *The Lung*. New York: *Raven Press* ; 1991: 699-709

142. Rannels DE, Stockstill B, Mercer RR, Crapo JD. Cellular changes in the lung of adrenaectomized rats following left pneumonectomy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 351-362
143. Rannels DE, White DM, Watkins CA. Rapidity of compensatory lung growth following pneumonectomy in adult rats. *J Appl Physiol* 1979; 46: 326-333
144. Rannels SR, Rannels DE. Alteration in type II pneumocytes after partial pneumonectomy. *Am J Physiol* 1988; 254: C684-C690
145. Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, Davies PF. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow-conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;
146. Rodriguez MP, Sosenko IRS, Antigua MC, Frank L. Prenatal hormone treatment with thyrotropin releasing hormone and with thyrotropin releasing hormone plus dexamethasone delays antioxidant enzyme maturation but does not inhibit a protective antioxidant enzyme response to hyperoxia in newborn rat lung. *Pediatr Res* 1991; 30: 522-527
147. Rosenblum DA, Volpe MV, Dammann CE, Lo YS, Thompson JF, Nielsen HC. Expression and activity of epidermal growth factor receptor in late fetal rat lung is cell- and sex- specific. *Exp Cell Res* 1998; 239(1): 69-81
148. Ruel J, Coulombe P, Dussault JH. Characterization of nuclear 3, 5, 3'-trijodthyronine receptors in the developing rat lung: effects of Hypo- and hyperthyroidism. *Pediatr Res* 1982; 16: 238-242
149. Rüsse I, Sinowatz F. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 1. Auflage, S.371-374, Verlag Paul Parey, 1991
150. Sadler TW. Medizinische Embryologie. 9. Auflage, S. 241-247; Thieme-Verlag, Stuttgart, 1998

151. Sakamaki Y, Matsumoto K, Mizuno S, Miyoshi S, Matsuda H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(5): 525-33
152. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26 (1), 57-60
153. Schulz H, Johnner C, Eder G, Ziesenis A, Reitmeier P, Heyder J, Balling R. Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences. *Acta Physiol Scand* 2002; 174(4): 367-75
154. Seeger W, Grube C, Günther A, Schmidt R. Surfactant Inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *Eur Respir J* 1993; 6: 971-977
155. Shaffer SG, O'Neill D, Bradt SK, Thibeault DW. Chronic vascular pulmonary dysplasia associated with neonatal hyperoxia exposure in the rat. *Pediatr Res* 1987; 21: 14-21
156. Shimizu S, Gabazza EC, Taguchi O, Yasui H, Taguchi Y, Hayashi T, Ido M, Shimizu T, Nakagaki T, Kobayashi H, Fukudome K, Tsuneyoshi N, D'Alessandro-Gabazza CN, Izumizaki M, Iwase M, Homma I, Adachi Y, Suzuki K. Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(10): 1416-26
157. Smith FJC, Hein JW, Thomson RM, Drinker CK. Bodily changes and development of pulmonary resistance in rats living under compressed air conditions. *J Exp Med* 1932; 56: 63-78
158. Smith BT, Sabry K. Glucocorticoid-thyroid synergism in lung maturation: A mechanism involving epithelial-mesenchymal interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1951-1954

159. Smith CI, Searls RL, Hilfer SR. Effects of hormones on functional differentiation of mouse respiratory epithelium. *Exp Lung Res* 1990; 16: 191-209
160. Soriano P. Abnormal kidney development and haematological disorders in pDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 1994; 8: 1888-1896
161. Soriano P. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell survival and for normal patterning of the somites. *Development* 1997; 124: 2691-2700
162. Sosenko IRS, Frank L. Thyroid hormone receptors depresses antioxidant enzyme maturation in fetal lung. *Am J Physiol* 1987; 253: R592-R598
163. Stahl WR. Scaling of respiratory variables in mammals. *J Appl Physiol* 1967; 22 (3): 453- 60
164. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. *J Microsc* 1984; 134: 127- 136
165. Strauss WM. Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue. Unit 2.2; Harvard Medical School and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA, 1998
166. Stryer L. Lehrbuch Biochemie, Spektrum Verlag. 4. Auflage, 1995.
167. Takeda SI, Hsia CCW, Wagner E, Ramanathan M, Estrera AS, Weibel ER. Compensatory alveolar growth normalizes gas-exchange function in immature dogs after pneumonectomy. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1301-1310
168. Thompson Me. Lung growth in response to altered metabolic demand in hamsters: influence of thyroid function and cold exposure. *Respir Physiol* 1980; 40: 335-347

169. Thurlbeck WM. Postnatal growth and development of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1975; 111: 803-844
170. Thurlbeck WM, Galaugher W, Mathers J. Adaptive response to pneumonectomy in puppies. *Thorax* 1981; 36: 424-427
171. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 11, 72-82
172. Townsley MI, Parker JC, Korthuis DJ, Taylor AE. Alterations in hemodynamics and Kf,c during lung mass resection. *J Appl Physiol* 1987; 63: 2460-2466
173. Vicencio AG, Eickelberg O, Stankevich MC, Kashgarian M, Haddad GG. Regulation of TGF-beta ligand and receptor expression in neonatal rat lungs exposed to chronic hyoxia. *J Appl Physiol* 2002; 93(3): 1123-113
174. Walmrath D, Günther A, Gohfrani HA, Schermuly R, Schneider T, Grimminger F, Seeger W. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe ARDS and sepsis. *Am J Am Respir Crit Care Med* 1996. 154: 57-62
175. Wandel G, Berger LC, Burri GH. Morphometric analysis of adult rat lung after bilobectomy. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 968-972
176. Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(5): L 924-40
177. Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispè JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998; 275: L110-L117

178. Watkins CA, Burkhart LR, Rannels DE. Lung growth in response to unilateral pneumonectomy in rapidly growing rats. *Am J Physiol* 1985; 284: E162-E169
179. Weg IL, Rossoff L, McKeon K, Micheal Graver L, Scharf SM. Development of pulmonary hypertension after lung volume reduction surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(2): 552-6
180. Wegmann M. (Zentrallaboratorium für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Phillips-Universität zu Marburg). Non-invasive measurement of the midexpiratory airflow (EF₅₀). *per email*
181. Weibel ER. Stereological Methods: Practical Methods for Biological Morphometry. New York: *Academic Press* 1972
182. Welsh DA, Guery BPH, Deboisblanc BP, Dobard EP, Creussy C, Mercante D, Nelson S, Summer WR, Mason CM. Keratinocyte growth factor attenuates hydrostatic pulmonary edema in an isolated, perfused rat lung model. *AJP-Heart and Circulatory Physiology* 2001; Vol 280, Issue 3, H1311-H1317
183. Wilcox BR, Murray GF, Friedman M, Pimmel RL. The effects of early pneumonectomy on the remaining pulmonary parenchyma. *Surgery* 1979; 86: 294-300
184. Wu B, Kikkawa Y, Orzalesi MM, Motoyama EK, Kaibara M, Zigas CJ, Cook CD. The effect of thyronine on the maturation of fetal rabbit lungs. *Biol Neonate* 1973; 22: 161-168
185. Wu EY, Hsia CCW, Estrera AS, Epstein RH, Ramanathan M, Johnson RL. Preventing a mediastinal shift after pneumonectomy does not abolish physiological compensation. *J Appl Physiol* 2000; 89: 182-191
186. Yuan S, Hannam V, Belcastro R, Cartel N, Cabacungan J, Wang J, Diambomba Y, Johnstone L, Post M, Tanswell AK. A role for Platelet-Derived Growth

Factor-BB in Rat Postpneumonectomy Compensatory Lung Growth.
Pediatr Res 2002; 52: 25-33

187.Zeng X, Wert SE, Federici R, Peters KG, Whitsett JA. VEGF enhances pulmonary vasculogenesis an disrupts lung morphogenesis in vivo. *Dev Dyn* 1998; 211 (3): 215-27

188.Zhou Y, Hoyle GW, Zhang J, Morris G, Lasky JA. A novel murine PDGF-D splicing variant results in significant differences in peptide expression and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308(1): 126-32

Quellennachweis der Bilder:

189.Dunker HR. in Benninghoff A/ Drenckhahn D (Hrsg.). Anatomie. 13/14. Auflage, S.363. Verlag Urban & Fischer

9 Anhang

PNX-1

LfNr	g/ Exd	kardial	kranial	Mitte	kaudal	Lunge ges
3A	22,00	0,09	0,11	0,07	0,19	0,45
7A	22,70	0,11	0,16	0,10	0,21	0,57
12A	22,10	0,07	0,14	0,09	0,18	0,48
15A	18,90	0,09	0,12	0,09	0,18	0,48
21A	23,50	0,08	0,13	0,10	0,18	0,49
22A	21,10	0,08	0,12	0,09	0,18	0,49
1F	21,70	0,09	0,13	0,09	0,18	0,49
2F	24,40	0,09	0,12	0,09	0,19	0,48
Mittelwert	22,05	0,086	0,130	0,089	0,186	0,493
STABW	1,54	0,01	0,02	0,01	0,01	0,03
Standardfehler	0,54	0,004	0,007	0,004	0,004	0,010

PNX-3

LfNr	g/ Exd	kardial	kranial	Mitte	kaudal	Lunge ges
4A	21,00	0,09	0,15	0,08	0,16	0,48
6A	25,20	0,13	0,17	0,11	0,23	0,63
16A	23,10	0,10	0,12	0,08	0,21	0,51
24A	24,00	0,12	0,15	0,12	0,25	0,63
25A	24,00	0,08	0,11	0,09	0,18	0,46
5F	23,90	0,09	0,13	0,09	0,20	0,51
6F	25,10	0,10	0,16	0,10	0,22	0,57
14F	22,40	0,09	0,13	0,09	0,20	0,51
Mittelwert	23,59	0,099	0,138	0,095	0,204	0,537
STABW	1,40	0,01	0,02	0,01	0,03	0,07
Standardfehler	0,495	0,003	0,007	0,003	0,010	0,025

PNX-5

LfNr	g/ Exd	kardial	kranial	Mitte	kaudal	Lunge ges
5A	24,3	0,123	0,178	0,09	0,19	0,581
10A	23,2	0,103	0,16	0,105	0,23	0,598
14A	25	0,183	0,2	0,124	0,284	0,791
17A	26,9	0,115	0,148	0,112	0,178	0,553
18A	26	0,116	0,125	0,102	0,217	0,56
3F	24,5	0,105	0,15	0,104	0,22	0,579
4F	24	0,11	0,133	0,1	0,21	0,553
18F	26,4	0,116	0,15	0,102	0,219	0,637
Mittelwert	25,03	0,121	0,1555	0,1049	0,2185	0,6065
STABW	1,2839	0,0257	0,024	0,00984	0,0315	0,074
Standardfehler	0,452	0,009	0,008	0,003	0,011	0,214

PNX-7

LfNr	g/ Exd	kardial	kranial	Mitte	kaudal	Lunge ges
8A	24	0,144	0,139	0,134	0,275	0,692
9A	21	0,115	0,146	0,091	0,181	0,533
11A	25	0,148	0,189	0,138	0,263	0,711
19A	24,5	0,125	0,156	0,123	0,222	0,626
20A	23,6	0,124	0,136	0,102	0,216	0,579
16F	25,6	0,132	0,153	0,131	0,248	0,659
15F	23,9	0,106	0,123	0,109	0,201	0,539
17F	25,2	0,116	0,138	0,117	0,214	0,585
Mittelwert	24,1	0,126	0,147	0,118	0,228	0,615
STABW	1,431	0,0145	0,0197	0,0165	0,0319	0,067
Standardfehler	0,506	0,005	0,006	0,0058	0,011	0,024

PNX-10

LfNr	g Exd	kardial	kranial	Mitte	kaudal	Lunge ges
1A	24	0,157	0,209	0,104	0,226	0,696
2A	22,5	0,11	0,147	0,108	0,174	0,539
13A	23,9	0,154	0,137	0,099	0,189	0,579
23A	28,1	0,155	0,187	0,118	0,259	0,719
27A	22,4	0,122	0,169	0,11	0,194	0,596
26A	23,6	0,115	0,189	0,118	0,253	0,675
20F	24,4	0,123	0,15	0,105	0,245	0,623
21F	24,1	0,125	0,147	0,108	0,251	0,631
Mittelwert	24,13	0,133	0,167	0,109	0,224	0,632
STABW	1,77	0,02	0,03	0,03	0,03	0,06
Standardfehler	0,63	0,001	0,010	0,010	0,010	0,021

PNX-21

LfNr	g/ Exd	kardial	kranial	Mitte	kaudal	Lunge ges
7F	27,8	0,163	0,169	0,135	0,246	0,713
8F	28,5	0,159	0,155	0,116	0,267	0,707
9F	26,7	0,184	0,166	0,137	0,265	0,752
10F	26,4	0,179	0,171	0,137	0,246	0,736
11F	26,4	0,154	0,169	0,141	0,253	0,717
12F	25,8	0,159	0,171	0,139	0,248	0,717
13F	25,3	0,165	0,157	0,139	0,248	0,709
19F	25,1	0,176	0,161	0,125	0,28	0,742
Mittelwert	26,5	0,1674	0,1649	0,1336	0,2566	0,7241
STABW	1,1735	0,0109	0,0064	0,0086	0,0126	0,0158
Standardfehler	0,415	0,004	0,002	0,003	0,004	0,006

Kontrollen

LfNr	g/ Exd	kardial	kranial	Mitte	kaudal	re ges	li ges	Lunge ges
3B	20,4	0,08	0,08	0,06	0,13	0,35	0,15	0,494
7B	24,0	0,06	0,1	0,06	0,16	0,38	0,14	0,527
12B	22,7	0,085	0,11	0,09	0,17	0,46	0,24	0,695
15B	22,8	0,086	0,12	0,08	0,15	0,47	0,17	0,644
21B	24,9	0,082	0,11	0,08	0,17	0,44	0,21	0,649
22B	23,3	0,083	0,1	0,08	0,14	0,41	0,19	0,599
4B	22,7	0,079	0,11	0,06	0,16	0,39	0,18	0,577
6B	23,7	0,088	0,12	0,09	0,17	0,47	0,18	0,648
16B	24,4	0,083	0,13	0,08	0,19	0,47	0,2	0,669
24B	24,0	0,079	0,12	0,08	0,16	0,43	0,2	0,633
25B	24,4	0,084	0,09	0,09	0,16	0,42	0,2	0,627
5B	24,7	0,059	0,1	0,08	0,18	0,42	0,18	0,599
10B	24,4	0,106	0,13	0,09	0,22	0,54	0,25	0,79
14B	24,8	0,108	0,13	0,08	0,19	0,51	0,23	0,746
18B	25,8	0,085	0,13	0,08	0,18	0,47	0,21	0,674
17B	25,6	0,074	0,11	0,08	0,15	0,41	0,2	0,614
8B	22,4	0,067	0,09	0,07	0,14	0,36	0,18	0,545
9B	23,1	0,085	0,12	0,07	0,17	0,44	0,21	0,648
11B	25,1	0,109	0,14	0,12	0,25	0,63	0,26	0,885
1B	25,0	0,084	0,14	0,09	0,17	0,49	0,18	0,669
2B	23,4	0,088	0,15	0,1	0,18	0,52	0,25	0,761
13B	25,1	0,07	0,12	0,08	0,16	0,42	0,19	0,611
26B	23,4	0,077	0,1	0,08	0,15	0,41	0,19	0,598
27B	22,2	0,08	0,16	0,09	0,19	0,51	0,2	0,714
23B	25,0	0,07	0,11	0,07	0,17	0,42	0,18	0,602
Mittelwert	23,892	0,082	0,117	0,080	0,169	0,450	0,198	0,649
STABW	1,259	0,012	0,019	0,014	0,025	0,061	0,028	0,085
Standardfehler	0,251	0,003	0,004	0,003	0,005	0,012	0,006	0,017

Darstellung der individuellen Werte.

Die Tabellen stellen die Volumina der Lungenlappen der einzelnen Versuchstiere, identifiziert durch die laufende Nummer (LfNr), am Exstirpationstag (Exd), entsprechend 1, 3, 5, 7, 10, 21 Tage nach der linksseitigen Pneumonektomie (PNX), im Vergleich zu den nicht operierten Kontrolltieren, dar, außerdem den jeweiligen Mittelwert mit der Standardabweichung und den Standardfehler der einzelnen Parameter, auf deren Basis die Wachstumskinetik erstellt wurde.

(LfNr= laufende Nummer, g / Exd= Gewicht am Entnahmetag, ges= gesamt, re= rechts, li= links, STABW= Standardabweichung, PNX= Pneumonektomie, A und F= operiertes Tier, B= Kontrolltier)

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Werner Seeger für die Möglichkeit, in seinem Labor diese Dissertationsarbeit durchführen zu dürfen, sowie für die Bereitstellung sämtlicher für die Dissertation notwendiger Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Robert Voswinckel für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit, sowohl in wissenschaftlicher wie auch in menschlicher Hinsicht und die stete Bereitschaft zu Unterstützung und Hilfestellung.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiter des Labors Prof. Dr. Seeger der Medizinischen Klinik 2 für ihre freundliche Unterstützung und ihren Rat, insbesondere Tanja Mehling.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Hans Fehrenbach und Frau Dr. Antonia Fehrenbach der klinischen Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“ der Philipps-Universität Marburg für die Durchführung der stereologischen Untersuchungen und Michael Wegmann von der Phillips-Universität für die Durchführung der Lungenfunktionstests.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Marga und Dietmar Motejl danken, die dies alles erst ermöglicht haben.