

**Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

---

**Volumen-computertomographische in-vivo-Untersuchungen  
zum Schweregrad des Elastase-induzierten Lungenemphysems  
im Mausmodell**

**INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von  
Ina Schmonsees aus  
Zeven**

---

**Göttingen 2010**



**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. St. Andreas

**II. Berichterstatter/in:** PD Dr. med. Menke

**III. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:** 21.11.2011

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</b> .....	1
1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung .....	1
1.1.1 Definition .....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	1
1.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie .....	2
1.1.4 Klinik und Diagnostik .....	2
1.1.5 Therapie .....	3
1.2 Emphysem .....	3
1.2.1 Definition und Einteilung .....	3
1.2.2 Epidemiologie .....	4
1.2.3 Pathogenese und Pathophysiologie .....	4
1.2.4 Klinik und Diagnostik .....	5
1.2.5 Therapie .....	5
1.2.6 Maus-Modell .....	5
1.3 Flächendetektor-basierte Volumen-Computertomographie (fpVCT) .....	6
1.4 Fragestellungen .....	7
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	8
2.1 Tiermodell .....	8
2.2 Studiendesign und Gruppeneinteilung .....	8
2.3 Emphyseinduktion .....	9
2.4 Die Struktur der Mäuselunge .....	10
2.5 Flächendetektor-basierte Volumen-Computertomographie (fpVCT) .....	11
2.5.1 Technische Daten .....	11
2.5.2 Partialvolumeneffekte .....	12
2.5.3 Aufnahmeprotokoll .....	13
2.5.4 Fertigung der Aufnahmen .....	13
2.5.5 Datenrekonstruktion .....	14
2.5.6 Digitale Bildbearbeitung .....	14
2.5.7 Vergleich der Strukturdichte .....	15
2.5.8 Lungenvolumenmessung .....	16
2.6 Physikalisch-biomechanische Messungen .....	17
2.6.1 Lungenpräparation .....	17

2.6.2	Lungenvolumetrie.....	17
2.6.3	Statische Compliance und elastische Rückstellkräfte.....	18
2.7	Histologie.....	19
2.7.1	Entwässerung.....	19
2.7.2	Einbettung.....	20
2.7.3	Schneiden.....	20
2.7.4	Färben.....	21
2.8	Histologische Auswertung.....	22
2.8.1	Bestimmung des mittleren Alveolarabstands.....	22
2.9	Mathematische Methoden.....	22
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>24</b>
3.1	fpVCT-Aufnahmen.....	24
3.1.1	Die 3D-rekonstruierte Lunge.....	24
3.1.2	Computertomographische Dichtebestimmung.....	26
3.1.2.1	Dichte ohne Klemme.....	27
3.1.2.2	Dichte mit Klemme.....	27
3.1.2.3	Vergleich der Aufnahmemodi für die Dichtebestimmung.....	27
3.1.3	Computertomographische Volumenbestimmung.....	28
3.1.3.1	Lungenvolumina ohne Klemme.....	29
3.1.3.2	Lungenvolumina mit Klemme.....	29
3.1.3.3	Vergleich der Aufnahmemodi für die Volumenbestimmung.....	29
3.2	Pathologische Beurteilung der Lungen.....	30
3.2.1	Makroskopie.....	30
3.2.2	Histologie.....	30
3.2.3	Histologische Dichtebestimmung.....	31
3.3	Beurteilung der Lungen anhand biomechanischer Eigenschaften.....	32
3.3.1	Statische Compliance.....	32
3.3.2	Elastische Rückstellkraft.....	34
3.4	Ex-vivo-Lungenvolumenbestimmung.....	35
3.5	Regressionsanalysen.....	36
3.5.1	Dichtekorrelation.....	37
3.5.1.1	Dichtekorrelation ohne Klemme.....	37
3.5.1.2	Dichtekorrelation mit Klemme.....	38

3.5.2	Lungenvolumen .....	38
3.5.2.1	Volumenkorrelation ohne Klemme .....	39
3.5.2.2	Volumenkorrelation mit Klemme .....	39
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>41</b>
4.1	COPD .....	41
4.2	Emphyseinduktion .....	42
4.3	Histologisch-biomechanische Emphysebeurteilung .....	43
4.4	Emphysebeurteilung mittels fpVCT .....	44
4.4.1	Blickdiagnostik bei Betrachtung der fpVCT-Aufnahmen .....	44
4.4.2	Dichtekorrelation .....	45
4.4.3	Volumenkorrelation .....	46
4.4.4	Bewertung der Aufnahmeformen .....	47
4.5	Bedeutung der fpVCT für die präklinische Emphyseindagnostik .....	47
4.6	Bedeutung der fpVCT für die klinische Forschung .....	49
4.7	Studienlimitierungen und Ausblicke .....	50
4.7.1	Die Emphyseinduktion .....	50
4.7.2	Die histologische Aufarbeitung und ihre Auswertung .....	50
4.7.3	Die fpVCT-Aufnahmen .....	51
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>55</b>
6.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	55
6.2	Verzeichnis der Abbildungen .....	58
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>60</b>

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung**

#### **1.1.1 Definition**

Der Begriff COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) umfasst laut Definition der „Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – GOLD“ eine Gruppe von Lungenkrankheiten, die durch eine nicht vollständig reversible Obstruktion der Atemwege gekennzeichnet ist. Die daraus entstehende fortschreitende Limitierung des Atemflusses ist im Allgemeinen mit einer überschießenden Immunantwort der Lunge gegenüber Noxen vergesellschaftet (Pauwels et al. 2001). Die zwei morphologischen Entitäten, die unter dem Begriff der COPD zusammengefasst werden, sind die chronische obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem.

#### **1.1.2 Epidemiologie**

Die chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen nehmen laut Statistiken der WHO Platz 4 der weltweiten Todesursachen ein und werden bis zum Jahre 2020 auf den dritten Platz vorrücken (Mannino et al. 2006, Murray und Lopez 1997). Damit ist sie die einzige aus der Gruppe der am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen, deren Inzidenz trotz der enorm hohen Zahlen an Todesfällen weiter steigt (Lopez et al. 2006). Nach Schätzungen der WHO leiden etwa 80 Millionen Menschen weltweit an Erkrankungen aus dem Formenkreis der chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (De Boer et al 2007). Mehr als 3 Millionen von ihnen starben im Jahr 2005 an den Folgen. In Deutschland sind circa 5 Millionen Menschen betroffen – mit steigender Tendenz. Die BOLD-Studie („burden of obstructive lung disease“) zeigte, dass in Deutschland etwa 13% der über 40-Jährigen an einer COPD leiden (Buist et al. 2007). Kürzlich erschienene Studien zeigen eine starke Unterschätzung der COPD-Inzidenz (Tinkelman et al. 2006), welche unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass die Patienten erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch werden. Die hohe Prävalenz der Erkrankung bedingt die im Vergleich zu anderen dominanten Todesursachen enorm hohen gesundheitspolitischen Kosten, welche in den nächsten Jahren noch weiter ansteigen werden (Pauwels und Rabe 2004).

### 1.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie

Rauchen gilt als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Bronchitis oder eines Lungenemphysems. 80 bis 90 Prozent der COPD-Patienten sind Raucher (Andreas et al. 2008). Der genaue Mechanismus, der zum Ausbruch der Krankheit durch das Inhalieren von Tabakrauch führt, ist bisher nicht vollständig geklärt. Saetta et al. beschrieben in ihrer 2001 erschienenen Studie den Zusammenhang zwischen strukturellen und funktionellen Veränderungen in der Pathogenese der COPD. Demnach entwickeln alle Raucher eine Entzündung der Atemwege, deren Ausmaß mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Die Entzündung wird von einem Gewebs-Remodeling begleitet, das eine Hypertrophie glatter Muskelzellen sowie fibrotische Veränderungen beinhaltet (Szilasi et al. 2006) und zu der für die Krankheit charakteristischen Minderung des Atemflusses beiträgt.

Auch der mit dem Rauchen verbundene oxidative Stress spielt für die Krankheitsentstehung eine vielfältige Rolle (MacNee 2000). Er führt unter anderem zu einem Ungleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen, der Hauptursache für die Emphysementstehung. Durch die verstärkte Proteasenaktivität kommt es zu einem fortschreitenden Parenchymverlust, welcher eine Reduktion elastischer Rückstellkräfte und somit auch eine Atemflussminderung – insbesondere in der expiratorischen Phase – zur Folge hat (Mead et al. 1967).

Die Tatsache, dass etwa 15 bis 50 Prozent der Raucher eine COPD entwickeln (Lundbäck et al. 2003) und 5-10 % der COPD-Patienten nie geraucht haben (Stanescu et al. 1998), legt die Vermutung nahe, dass genetische Dispositionen eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Krankheitsentstehung spielen (Sandford et al. 1997, Wan und Silverman 2009).

### 1.1.4 Klinik und Diagnostik

Die Diagnose einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung basiert auf charakteristischen Anamnesen mit chronisch progredienten Symptomen wie Husten, gesteigerter Sputumproduktion und Atemnot, sowie dem Vorhandensein von typischen Risikofaktoren wie Tabakabhängigkeit und rezidivierenden bronchopulmonalen Infekten. Eine Lungenfunktionsprüfung dient der Quantifizierung der Atemwegsobstruktion und führt zur endgültigen Diagnosestellung. Hier ist vor allem die bei COPD-Patienten chronisch erniedrigte relative Einsekundenkapazität (FEV1/FVC) zu nennen. Bei schweren Formen der COPD kann es außerdem im Rahmen der Atemwegsobstruktion und dem folglich



eingeschränkten Gasaustausch zu einer respiratorischen Insuffizienz kommen. Hier hat sich diagnostisch die Bestimmung der CO-Diffusionskapazität zusammen mit einer arteriellen Blutgasanalyse bewährt. Durch die Hypoxie in den nicht belüfteten Gebieten kommt es im Rahmen des Euler-Liljestrand-Mechanismus zu einer Vasokonstriktion der Arteriolen. Infolgedessen erhöht sich der Druck in der Lungenstrombahn, was wiederum zu einem Cor pulmonale führen kann.

### **1.1.5 Therapie**

Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist es bisher nicht gelungen, die genauen zellbiologischen Prozesse zu entschlüsseln, welche zur Entstehung der COPD führen. Aus diesem Grunde mangelt es auch an zufriedenstellenden Therapiemöglichkeiten, die die Krankheit effektiv behandelbar machen würden.

Die einzige erwiesene Maßnahme, die bis dato ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern kann, ist die Tabakentwöhnung (Andreas et al. 2008, Anthonisen et al. 2002, Scanlon et al. 2000). Eine Langzeit-Sauerstofftherapie verbessert die Lebensqualität der Patienten mit chronischer Hypoxämie und erhöht ihre Lebenserwartung. Alle weiteren klinisch zugelassenen Therapieansätze, mit Ausnahme der antibiotischen Behandlung von Exazerbationen, dienen lediglich der Symptomlinderung. Die broncholytische Therapie erfolgt nach einem, dem Krankheitsstadium angepassten, Dreistufenschema, welches Beta-Sympathomimetika und/oder Anticholinergika, sowie - bei fortgeschrittenerer Erkrankung – auch Glukokortikosteroide umfasst.

## **1.2 Emphysem**

### **1.2.1 Definition und Einteilung**

Die WHO definiert das Lungenemphysem als eine irreversible Erweiterung der Lufträume distal der Bronchioli terminales mit konsekutiver Zerstörung der Wände betroffener Alveolen (WHO, COPD: Definition 2010)

Man unterscheidet ein zentrilobuläres, von welchem vor allem Raucher betroffen sind, von dem sehr viel selteneren panlobulären Emphysem, das hauptsächlich bei einem angeborenen  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel auftritt. Ihnen gemeinsam ist die progrediente Zerstörung des

Stützgerüsts der kleinen Lungeneinheiten, der Azini und der Alveolarwände. Während beim panlobulären Emphysem, welches vornehmlich basale Lungenabschnitte betrifft, die Alveolardestruktion gleichmäßig über die Azini verteilt ist, dehnt sich das meist apikal lokalisierte zentrilobuläre Emphysem von den zentralen Azinusabschnitten nach peripher aus.

### 1.2.2 Epidemiologie

In Deutschland leiden laut der deutschen Gesellschaft für Pneumologie etwa 400.000 Menschen an einem klinisch relevanten Lungenemphysem (Fabel und Konietzko 2005). Lediglich 2 % aller Emphysematiker leiden an einem angeborenen  $\alpha_1$ -Antitrypsinmangel. In der Mehrzahl der Fälle erkranken die Menschen infolge eines langjährigen Tabakkonsums (Hogg und Senior 2002). Nach Erhebungen des statistischen Bundesamtes verstarben im Jahr 2002 22.455 Menschen in Deutschland an den Folgen eines Lungenemphysems.

### 1.2.3 Pathogenese und Pathophysiologie

Das Emphysem ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Gewebsdestruktion, die, je nach vorherrschendem Typ, unterschiedliche Lungenbereiche befällt. Der Gewebsverlust führt zu einer Verminderung der Gasaustauschfläche mit konsekutiver Gasaustauschstörung, sowie zu einer Einschränkung der Eigenelastizität der Lunge. Die Atemwege, welche normalerweise durch den elastischen Zug offen gehalten werden, kollabieren und verursachen die für das Emphysem charakteristische Atemwegsobstruktion, die vor allem die Expirationsphase betrifft. Die genauen Mechanismen, die zur Emphysementstehung führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Man macht heute eine komplexe Interaktion verschiedener Faktoren für die Entstehung der Krankheit verantwortlich (Wright und Churg 2007). Hauptrisikofaktor ist auch hier der Tabakabusus. Durch den Tabakrauch kommt es, neben einer unspezifischen Entzündungsreaktion (Saetta et al. 2001), zu einer oxidativen Inaktivierung von  $\alpha_1$ -Antitrypsin (Carp et al. 1982), einem Schutzenzym, das die überschießende Aktivierung von Proteasen in der Lunge hemmt. Diese werden im Rahmen der Entzündung aus neutrophilen Leukozyten und Makrophagen freigesetzt und führen bei fehlender Hemmung zu einem proteolytischen Übergewicht, welches eine Gewebszersetzung zur Folge hat. Die Rolle potentieller genetischer Prädispositionen, wie bei dem bereits entschlüsselten Gendefekt des  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Mangels, wird in verschiedenen Studien diskutiert (DeMeo et al. 2007, Hersh et al. 2008, Hersh et al. 2009).

### 1.2.4 Klinik und Diagnostik

Patienten, die an einem Lungenemphysem leiden, lassen sich anhand ihrer klinischen Erscheinung nach einer 1966 erschienen Veröffentlichung von Burrows et al. in zwei Typen einteilen: Als „pink puffer“ bezeichnet man kachektische Patienten mit meist erheblicher Ruhedyspnoe und Fassthorax, die vermehrte Atemarbeit (Einsetzen der Atemhilfsmuskulatur, Tachypnoe und Lippenbremse) zur Kompensation der respiratorischen Insuffizienz leisten. Sie leiden mit mäßig erniedrigtem  $pO_2$  und normalem  $pCO_2$  an einer respiratorischen Partialinsuffizienz.

Der „blue bloater“ ist ein pyknisch-adipöser Typ mit eher bronchitischer Symptomatik (Husten und Auswurf) und ausgeprägter Zyanose im Rahmen einer globalen respiratorischen Insuffizienz.

Als diagnostische Methoden dienen die bereits für die allgemeine COPD-Diagnostik beschriebenen Verfahren. In Zukunft werden die sich ständig verbessernden bildgebenden Verfahren mehr und mehr an Bedeutung gewinnen (Calverley und Walker 2003, Reilly 2006). Für die klinische in-vivo-Emphysemdiagnostik stellt die hochauflösende Computertomographie (HRCT) den derzeitigen Goldstandard dar.

### 1.2.5 Therapie

Die medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten des Lungenemphysems sind aufgrund der irreversiblen Gewebsdestruktion begrenzt. Eine symptomorientierte Therapie entspricht dem allgemeinen Behandlungsregime für chronisch obstruktive Lungenerkrankungen. Außerdem ist bei schweren Verläufen mit Betonung der Lungenober- und Randfelder eine chirurgische Intervention im Sinne einer Volumenreduktion oder der Exzision einzelner Emphysebullae möglich. Als letzte Therapieoption gilt die Lungentransplantation.

### 1.2.6 Maus-Modell

Tiermodelle können, insbesondere bei langsam progredienten chronischen Erkrankungen wie dem Lungenemphysem, wichtige Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Pathomechanismen liefern und infolgedessen zu neuen Therapieansätzen führen. So führten die ersten erfolgreichen Emphyseminduktionen an Mäuse- und Rattenlungen zur Entstehung der Protease-Antiprotease Hypothese. Dieser folgte dann die Entwicklung von  $\alpha_1$ -

Proteinaseinhibitoren nach, welche sich zurzeit in klinischer Erprobung befinden (Campbell 2000).

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurde ein elastaseinduziertes Emphysemmodell verwendet, das sich in mehreren Vorläuferstudien bezüglich der Reproduzier- und Wirksamkeit als vielversprechend erwiesen hat (Andreas et al. 2006, Lüthje et al. 2009 a und 2009 b). Ein bisher ungelöstes Problem bestand jedoch in der longitudinalen Beurteilung der erzeugten Emphyseme. Eine verlässliche Aussage konnte bisher nur anhand postmortal erhobener Daten aus histopathologischen Untersuchungen getroffen werden. Diese Studie sollte nun mit dem Einsatz eines Flächendetektor-basierten Volumen-Computertomographen Abhilfe schaffen. Aus den in vivo durchgeführten Aufnahmen erfolgte die Berechnung von Dichte und Volumen für jede untersuchte Lunge. Ein Vergleich der Ergebnisse mit ex vivo erhobenen histologischen sowie biomechanischen Daten sollte zeigen, wie hoch die Korrelation der Methoden für die Schweregradbeurteilung der Lungenemphyseme ist.

### **1.3 Flächendetektor-basierte Volumen-Computertomographie (flat panel Volume CT, fpVCT)**

Die Anwendung hochauflösender CT-Systeme in der Kleintierdiagnostik hat in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen. Sie ermöglicht eine nichtinvasive, qualitativ hochwertige Beurteilung pathologisch veränderter Organsysteme und erleichtert die Überwachung von Krankheitsprogression und Wirksamkeit therapeutischer Anwendungen. Durch die Anwendung effizienter radiologischer Methoden in vivo kann die Notwendigkeit entfallen, Versuchstiere in verschiedenen Krankheitsstadien zu opfern. Dies ermöglicht eine unter ethischen und Kostenerwägungen wünschenswerte Einsparung von Versuchstieren. Wir haben uns im Rahmen der Studienplanung für den Einsatz einer neuartigen Bildgebungstechnik, der fpVCT, entschieden. Klinische CT-Geräte der neuesten Generation würden zwar Aufnahmen in weniger als einer halben Sekunde ermöglichen, könnten aber die für die Darstellung der Mäuselunge benötigte Auflösung, nicht liefern. So liegt der Alveolardurchmesser von Mäusen bei etwa 80  $\mu\text{m}$ , die Auflösung eines 64-Schicht-Computertomographen jedoch bei minimal 0,35 mm. Die fpVCT ist ein bisher auf die Kleintierforschung beschränktes neuartiges Verfahren, welches durch den gezielten Einsatz von Flächendetektoren hochauflösende, isotrope Volumendarstellungen liefert. Die Scanzeiten sind mit 2-8 Sekunden deutlich geringer als bei alternativen Geräten wie dem Micro-CT, in dem die Tiere über Minuten bis Stunden verbleiben müssen. Hierdurch wird der

Einsatz von Röntgenkontrastmitteln bei der fpVCT ermöglicht, ohne die Weichgewebe, wie zum Beispiel Tumore, nicht darstellbar wären. Die applizierten Substanzen verbleiben nur sehr kurz im Körper und werden rasch über die Niere ausgeschieden. Die maximale Objektgröße des Micro-CTs liegt bei unter 10 cm. Demgegenüber können mit dem fpVCT Strukturen mit einem Durchmesser von bis zu 33 cm erfasst werden.

Einen weiteren Vorteil bietet die gegenüber dem Micro-CT deutlich geringere Strahlenbelastung. So liegt die anhand eines 16-cm-Phantoms ermittelte Strahlendosis des hier verwendeten Gerätes bei 0,172 mGy/mAs (Valencia et al. 2006), während eine Maus in einem Messfeld mit einem Durchmesser von 20 cm im Micro-CT mit 0,63 mGy/mAs belastet wird (Boone et al. 2004). Bisher erschienene Studien erbrachten vielversprechende Ergebnisse für die zunächst auf präklinische Untersuchungen beschränkte Anwendung der fpVCT (Bartling et al. 2006, Greschus et al. 2005, Hannig et al. 2005, Valencia et al. 2006).

#### 1.4 Fragestellungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Kann durch die intratracheale Anwendung unterschiedlicher Dosen von Elastase in der Maus ein Lungenemphysem mit abgestuftem Schweregrad hervorgerufen werden?
- Werden unterschiedliche Emphysem-Schweregrade in der fpVCT-Untersuchung quantifizierbar abgebildet?
- Korrelieren die mittels der fpVCT-Untersuchung gewonnenen Daten mit funktionellen und anatomischen Parametern, die die Ausprägung des Emphysems beschreiben?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Tiermodell

Für die Studie wurden 32 weibliche NMRI-Mäuse (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) mit einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von 23,7 Gramm verwendet. Da die männlichen Tiere bei einem mehrwöchigen Untersuchungszeitraum schnell an Gewicht zunehmen würden, wurden bei dieser Studie ausschließlich weibliche Tiere mit einem konstanteren Körpergewicht verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser sowie bei einem konstanten 12-Stunden-Rhythmus von Licht und Dunkelheit. Alle Interventionen an lebenden Tieren erfolgten entsprechend einem durch die klinikeigene Tierschutzkommission und die Bezirksregierung Braunschweig unter Aktenzeichen 509.42502/01-30.02 genehmigten Tierversuchsprotokoll.

### 2.2 Studiendesign und Gruppeneinteilung

Alle in der Studie durchgeführten Untersuchungen erfolgten verblindet. Den Tieren wurden eindeutige Nummern zugeteilt, welche die Zuordnung des jeweiligen Tieres zu einer Gruppe verhindern sollten. Erst nach Abschluss der Studie wurde die Verblindung im Zuge der Auswertung aufgehoben und die Daten den einzelnen Gruppen zugeordnet. Zu Beginn der Studie wurde jedes Tier zufällig einer von 4 Gruppen zugeteilt. Diese bestanden aus einer Kontrollgruppe sowie 3 Gruppen von Mäusen, die mit unterschiedlichen Dosen von Elastase behandelt wurden. Die erste Elastasegruppe erhielt eine Hochdosis-Behandlung, die zweite 2/3 dieser Dosis und die dritte 1/3 dieser Dosis. Der Behandlungszeitraum erstreckte sich über 4 Wochen, in denen den Elastase-Mäusen fünfmal die jeweilige Dosis Pankreaselastase verabreicht wurde, während die Mäuse der Kontrollgruppe fünfmal mit reiner Phosphat-gepufferter Salzlösung behandelt wurden. Nach einem behandlungsfreien Zeitraum von einer Woche wurden von allen Mäusen Flächendetektor-basierte Volumencomputertomographische Aufnahmen (flat panel Volume CT, GE Global Research, Niskayuna, NY, USA) des Thorax angefertigt.

### 2.3 Emphyseminduktion

Die Emphyseminduktion erfolgte mit dem Ziel, ein Modell zu schaffen, welches dem menschlichen Emphysem mit seinen typischen histologischen Umbauvorgängen am ehesten entspricht. Im Rahmen von Vorläuferstudien (Luethje et al. 2009 a und 2009 b) stellte sich heraus, dass eine mehrmalige Applikation von geringen Elastasedosen der einmaligen Applikation einer hohen Dosis überlegen ist. Dieses begründet sich nicht nur in der deutlich geminderten Akuttoxizität (niedrigere Sterberate während der Induktionsphase), sondern vor allem in der Erzeugung eines homogeneren und funktionell wie auch morphologisch ausgeprägteren Lungenemphysems.

Jede Maus erhielt fünf Einzelbehandlungen in wöchentlichen Intervallen. Die Elastase-Tiere erhielten Pankreaselastase vom Schwein, gelöst in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), wohingegen die Kontrolltiere mit reiner Phosphat-gepufferter Salzlösung behandelt wurden.

Jede Behandlungseinheit begann mit der Induktion einer Inhalationsanästhesie, bei der das Tier in einen verschließbaren Glasbehälter gesetzt wurde, welcher vorher mit 200 µl des Inhalationsanästhetikums Isofluran (1-Chloro-2, 2,2-trifluoroethyldifluoromethylether; Abbot GmbH, Wiesbaden) präpariert wurde.

Sobald die Spontanatmung entsprechend verlangsamt war, wurde das Tier dem Gefäß entnommen und auf einer im Winkel von 60° gegenüber der Horizontalen geneigten Lagerungshilfe fixiert. Anschließend erfolgte die Intubation mit Hilfe eines selbstgefertigten Mundspatels aus Aluminiumblech und unter Ausrichtung des Lichtstrahls einer Kaltlichtquelle (KL 1500CD, Schott AG, Bad Gandersheim) von außen auf den Halsbereich der Maus. Unter diesen Bedingungen konnte die Trachealöffnung des Tieres als Lichtpunkt identifiziert und gezielt angesteuert werden. Als Tubus wurde eine klinikübliche Vasofix®-Venenverweilkanüle mit 1,1 mm Außendurchmesser ohne Mandrin verwendet. Unmittelbar nach erfolgter Intubation wurde die Maus mit Hilfe eines Mini-Vent Typ 845 Small Animal Ventilators (Harvard Apparatus/Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstätten) mit 120 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 150 µl mechanisch beatmet. Hierbei wurde ein Gemisch aus O<sub>2</sub> und Isofluran (in der Regel 2 %; Narkosetiefe durch Einstellung der Gasfraktion steuerbar) verwendet. Das Narkosegas wurde dem Trägergas in einem Verdampfer Vapor 1.9 (Drägerwerk AG, Lübeck) beigemischt. Zur Ansättigung mit Wasserdampf wurde das Gasgemisch vor Verabreichung durch Wasser geleitet.

Nachdem eine korrekte Beatmung sichergestellt war, wurde der Beatmungsschlauch zur Instillation der zu verabreichenden Flüssigkeiten für kurze Zeit vom Tubus entfernt. Die

Verabreichung der Elastase erfolgte mit Hilfe einer Insulinspritze in einem Volumen von 50  $\mu$ l PBS. Die verabreichte Elastase-Dosis betrug 1,2 U/100g Körpergewicht Pankreaselastase vom Schwein (Sigma Chemie, Taufkirchen) für die Hochdosis-Gruppe, 0,8 U/100g Körpergewicht für die  $\frac{2}{3}$ -Dosis Gruppe und 0,4 U/100g Körpergewicht für die  $\frac{1}{3}$ -Dosis Gruppe. Um eine bestmögliche Verteilung der Lösung bis in die Peripherie des Bronchialbaums zu unterstützen, wurde die Flüssigkeit gemeinsam mit 200  $\mu$ l Raumluft stoßartig in die Trachea geblasen. Anschließend wurde der Tubus umgehend wieder an den Beatmungsschlauch angeschlossen, um eine korrekte Beatmung sicherzustellen. Nachdem eine ausreichende Fixierung des Tieres gewährleistet war, erfolgte ein Lagerungswechsel in die Horizontale für jeweils 2 Minuten auf jeder Seite. Auch dieses Manöver diente der möglichst gleichmäßigen Verteilung der Elastase mit dem Ziel der Ausbildung eines homogenen und pathologisch charakteristischen Emphysems. Für die anschließende Narkoseausleitung wurde das Tier auf eine auf 37 °C temperierte Wärmeplatte gelegt, bis die einsetzende Spontanatmung eine Extubierung möglich machte.

Die Kontrolltiere wurden nach gleichem Protokoll mit sterilfiltrierter PBS behandelt.

Zwischen den Kontrolltieren und den Elastase-Gruppen wurde nach den Behandlungen ein signifikanter Unterschied im Befinden deutlich. Während die Kontrolltiere sich nach der Extubation schnell erholten und ein artgerechtes Verhalten im Käfig zeigten, verharrten die Elastase-Tiere als Zeichen der Belastung durch die Behandlung mit stark gekrümmten Rücken und gesträubtem Fell in Kauerstellung.

## 2.4 Die Struktur der Mäuselunge

Die Struktur der Mäuselunge unterscheidet sich in vielfältiger Weise von der menschlichen Lunge. Allein die Größenunterschiede bedingen eine 6000-fach erniedrigte totale Lungenkapazität (1 ml versus 6 Liter), sowie einen 2,6-fach niedrigeren mittleren Alveolardurchmesser (80  $\mu$ m versus 210  $\mu$ m). Diese Gegebenheiten stellen hohe Anforderungen an ein bildgebendes Verfahren, das mit dem Ziel der Strukturanalyse eines solchen Organs angewendet wird. Hier müssen Partialvolumeneffekte sowie eine größenbedingte, unvollständige Auflösung mit in die Datenanalyse einbezogen werden. Das von uns verwendete System der Flächendetektor-basierten Volumen-Computertomographie (fpVCT) wird im folgenden Kapitel erläutert.



## **2.5 Flächendetektor-basierte Volumen-Computertomographie (flat panel Volume CT, fpVCT)**

### **2.5.1 Technische Daten**

Die fpVCT arbeitet im Gegensatz zur Multislice CT mit Flachbettdetektoren. Dabei handelt es sich um eine Matrix von Photodetektoren auf einer amorphen Siliziumschicht, denen ein Szintillationskristall vorgeschaltet ist. Das hier verwendete fpVCT der Firma GE Global Research (Niskayuna, NY, USA) ist ein klinisch nicht zugelassener Prototyp mit zwei Flachbettdetektoren (Abb. 1). Diese sind in einem Winkel von  $120^\circ$  zur Systemachse aufeinander zugekippt und rotieren, zusammen mit der Röntgenröhre, um ein festes Rotationszentrum. Im Rahmen des Standardprotokolls werden bei einer  $360^\circ$  umfassenden Rotation 1000 Projektionsbilder aus unterschiedlichen Winkeln gewonnen, welche sofort auf einem Computer zwischengespeichert werden. Die Detektorelementmatrix umfasst  $1024 \times 1024$  Elemente mit einer jeweiligen Kantenlänge von  $200 \times 200 \mu\text{m}$ . Insgesamt entsteht so eine aktive Fläche von  $20,5 \times 20,5 \text{ cm}^2$ . Der in der Gantry rotierende Röntgenstrahler besteht aus einer luftgekühlten Röntgenröhre mit Wolframanode (Performix 630, General Electrics Health Care), welche eine nominelle Fokusgröße von  $0,7 \text{ mm}$  aufweist. Bei einer maximalen Röhrenspannung von  $140 \text{ KV}$  und einem Röhrenstrom bis zu  $400 \text{ mA}$  ergibt sich anhand der begrenzten Dosiskapazität der Detektoren eine absolute Röhrenleistung von  $20 \text{ KW}$ . Die Rotationszeit beträgt entsprechend dem jeweiligen Protokoll 2 bis 8 Sekunden. Je nach Größe des zu untersuchenden Objektes und des gewünschten axialen Bildausschnitts (field of view, FOV) kann entweder im Ein- (FOV=  $12,8 \times 12,8 \text{ cm}^2$ ) oder Zweidetektorbetrieb (FOV=  $33,3 \times 33,3 \text{ cm}^2$ ) gearbeitet werden. Die Distanz von der Röntgenquelle zum Isozentrum beträgt  $540 \text{ mm}$ , bis zu den Detektoren  $783 \text{ mm}$ . Daraus ergibt sich ein geometrischer Vergrößerungsfaktor von  $1,43$ . Die maximale Auflösung des Gerätes beträgt laut Herstellerangaben  $250 - 200 \mu\text{m}$  isotrop bei  $10\%$  MTF („modulation transfer function“).

Im Vergleich mit gängigen MSCT-Systemen weist das fpVCT eine in etwa dreifache Strahlenbelastung auf.

**Abbildung 1: fpVCT-Prototyp (GE Global Research Center, Niskayuna, NY, USA)**

### 2.5.2 Partialvolumeneffekte

Die Grauwerte, die bei der Computertomographie den durchleuchteten Strukturen zugeordnet werden, hängen von den jeweiligen Absorptionseigenschaften für Röntgenstrahlen (Röntgenabschwächung) ab und werden gemäß der Skalierung nach Hounsfield in Hounsfield-Einheiten (HE) angegeben. Bei der Aufnahme und Rekonstruktion der von den Detektoren erfassten Informationen treten sogenannte Partialvolumeneffekte auf. Diese entstehen durch die Mittelung verschiedener Röntgendichtewerte innerhalb eines Voxels. Der Intensitätswert eines Voxels wird dabei aufgrund der unzureichenden Auflösung des Gerätes von den mittleren Schwächungskoeffizienten mehrerer benachbarten Strukturen mit unterschiedlicher Dichte bestimmt.

Am ausgeprägtesten ist dieser Informationsverlust an Grenzregionen (z. B. Übergang Luft und Gewebe) und bei Strukturen, die kleiner als die gewählte Schichtdicke sind. Dort kommt es dann zu unscharf abgebildeten Rändern. Je kleiner die zu untersuchenden Objekte, desto größer ist deren Oberfläche im Vergleich zum Volumen und desto mehr tritt eine, durch den Partialvolumeneffekt erzeugte, Verfälschung der Daten auf (Peitgen et al. 2006).

### 2.5.3. Aufnahmeprotokoll

Da es sich bei den zu untersuchenden Objekten um Kleintiere handelte, genügte das im Eindetektorbetrieb abgedeckte Volumen zur Abbildung des Brustkorbs.

Alle Untersuchungen wurden im Standardprotokoll mit einer Rotationsdauer von 8 Sekunden, 1000 Projektionen pro Rotation und 360 aktiven Detektorzeilen durchgeführt. Daraus ergibt sich eine maximale Z-Achsenabdeckung von 4,2 cm. Die Schichtdicke betrug 0,1 mm. Die Röhrenspannung betrug 80 kV und der Röhrenstrom 4100 mA.

### 2.5.4 Fertigung der Aufnahmen

Eine Woche nach Abschluss der letzten Induktionsbehandlung erfolgten die fpVCT- Thorax-Aufnahmen von den Mäusen. Zunächst wurde jedes Tier inhalativ narkotisiert (s. Abschnitt 2.3), so dass die Intubation mit darauf folgender kontrollierter Ventilation problemlos durchgeführt werden konnte. Diese erfolgte abermals mit dem Mini-Vent Typ 845 Small Animal Ventilators (Harvard Apparatus/Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstätten) mit 160 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 175  $\mu$ l. Schließlich wurde das Tier unter Beatmung auf dem CT-Tisch abgelegt. Als Lagerungshilfe diente eine selbst gefertigte Schaumstoffvorrichtung, in der das Tier rücklings und mit gespreizten Extremitäten fixiert wurde. Jede Maus wurde zweimal untersucht. Die erste Aufnahme erfolgte nach vollständiger Inspiration, welche durch einen kurzfristigen Beatmungsstopp (Abschalten des Beatmungsgerätes, Tubus unverändert mit Beatmungsgerät verbunden) gewährleistet wurde. Ein Entweichen von Luft (Eigenbestreben der Lunge sich zusammenzuziehen führt zur Expiration) konnte durch diese Aufnahme nicht verhindert werden. Am ehesten wurde diese Aufnahme daher in Expiration durchgeführt. Anschließend wurde die Maus, um eine regelrechte Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, für einige Minuten weiter beatmet. Zusätzlich zum Ventilationsstopp wurde für die zweite Aufnahme eine Klemme am Tubus angebracht, so dass während der Aufnahme keine Luft über den Tubus entweichen konnte. Ein Entweichen von Luft am Tubus vorbei konnte, insbesondere bei größeren Mäusen mit entsprechend größerem Trachealdurchmesser, bei beiden Aufnahmen nicht sicher verhindert werden, da kein geblockter Tubus verwendet wurde. In welcher Phase des Atemzyklus sich die Mäuse bei den Aufnahmen befanden, kann insgesamt nicht sicher gesagt werden. Nach Abschluss der Aufnahmen wurden die Tiere erneut auf einer Wärmeplatte gelagert, bis die einsetzende Spontanatmung eine Extubation erlaubte.

### 2.5.5 Datenrekonstruktion

Die anschließende Rekonstruktion der von den Detektoren erfassten Informationen erfolgt auf einem Parallelrechner, welcher die Berechnung der dreidimensionalen Datensätze vornimmt. Dazu kommt ein modifizierter Feldkampalgorithmus zum Einsatz. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden alle Rekonstruktionen des Lungenareals der Mäuse mit dem gleichen Parameter durchgeführt: Bildmatrixgröße 512 x 512 und eine isotrope Voxelgröße von 0,06 mm. Diese Voxelgröße entspricht etwa dem Drittel der Auflösung des Systems und verursacht damit in Konformität mit dem Samplingtheorem keine zusätzlichen Digitalisierungsartefakte.

### 2.5.6 Digitale Bildbearbeitung

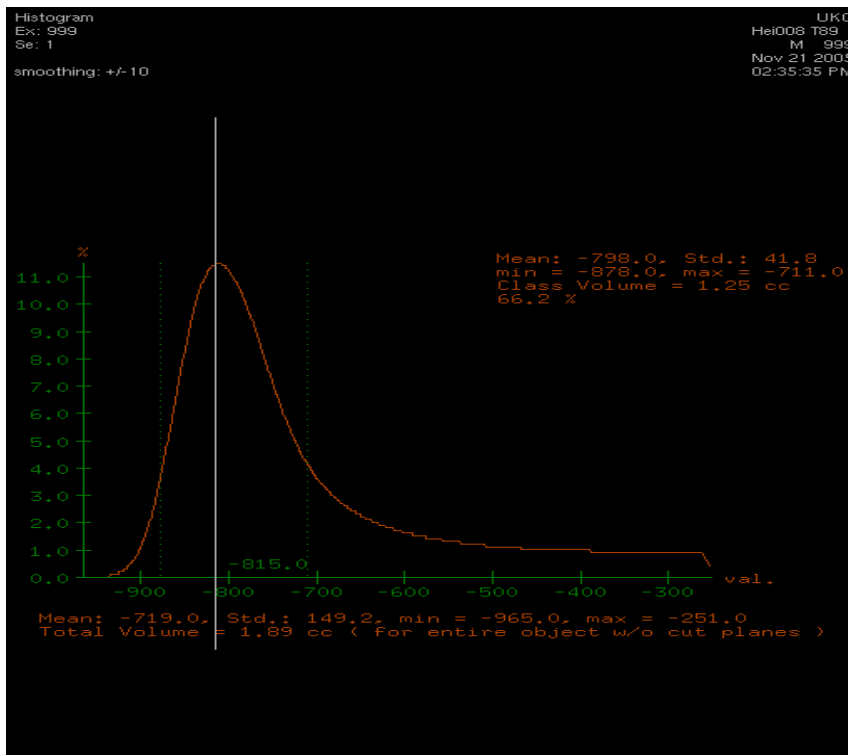
Die rekonstruierten CT-Datensätze wurden im DICOM-Format (Digital Imaging and Communications in Medicine) an einen Auswertearbeitsplatz (Advantage Windows 4.2, General Electrics Health Care, Milwaukee, WI) übertragen. Mit den hier verfügbaren Werkzeugen erfolgte als erster Schritt der Bildnachbearbeitung die Segmentierung der Datensätze mithilfe des globalen Schwellwertverfahrens. Dabei wird der Grauwert jedes einzelnen Pixels mit einem vorher festgelegten Schwellwert verglichen. Strukturen, deren Grauwerte außerhalb des gewählten Schwellwertbereichs liegen (hier lungenfremde Strukturen wie Herz und mediastinale Organe), werden mit Hilfe dieses Verfahrens aus den Aufnahmen extrahiert. Die Bestimmung der optimalen Schwellwerte erfolgte mit Hilfe von Histogrammen, die die durchschnittlichen Grauwertverteilungen in den Aufnahmen anzeigen. Dabei wurde stichprobenartig für je 2 Lungen aus jeder Gruppe der Mittelwert aus den am häufigsten vorkommenden Grauwerten notiert. Ein abschließender Wertevergleich und deren Mittelung erbrachten den geeigneten Schwellwert. In einigen Fällen konnten Strukturen, die der Lunge sehr eng anlagen und durch Luftfüllung ähnliche Grauwerte aufwiesen, wie zum Beispiel die Trachea, nicht vollständig aus den Aufnahmen entfernt werden. In diesen Fällen wurde eine manuelle Nachbearbeitung vorgenommen. Hierzu war es nötig, die axialen Schnittbilder mittels einer Volume Rendering Funktion in eine dreidimensionale Ansicht umzuwandeln. Die Lunge konnte nun von allen Seiten betrachtet und eventuelle, lungenfremde Reststrukturen konnten leicht aufgespürt werden. Diese wurden anschließend mit Hilfe des Regionenwachstumverfahrens so weit wie möglich aus den Aufnahmen entfernt. Dieses Prinzip fasst benachbarte Pixel ähnlicher Intensität zu einer Region zusammen und entfernt sie aus den Aufnahmen. Dafür gibt der Untersucher einen

Startpunkt an, von dem aus sich eine Markierung entlang Geweben gleicher Dichte ausbreitet. Als Kriterium, ob ein Nachbarvoxel der sich ausdehnenden Struktur hinzugefügt wird, dient dabei der Vergleich seines HE-Wertes mit der mittleren Dichte aller schon zusammengefügteten Voxel, welche ständig neu berechnet wird.

### **2.5.7 Vergleich der Strukturdichte**

Die mittleren Röntgenabschwächungen des jeweiligen Lungengewebes wurden dem zugehörigen Histogramm, welches an dem Auswertungsarbeitsplatz aus den segmentierten Datensätzen generiert wurde, entnommen (Abb.2). Durch die graphische Ermittlung des Hochpunktes des jeweiligen HE-Wertebereichs wurde der Wert erfasst, dem die höchste Anzahl an Voxel zugeordnet werden konnte. Hierdurch können die am häufigsten vorkommenden Grauwerte erfasst werden, deren Auftreten von der Absorptionseigenschaft des untersuchten Gewebes abhängt. Der ermittelte Wert wurde daher zunächst als Maß für die mittlere Röntgenabschwächung im Gewebe angenommen. Je mehr Röntgenstrahlen während einer Aufnahme absorbiert werden, desto größer ist die Röntgenabschwächung. Gewebe mit einer hohen Dichte absorbieren mehr Strahlen als solche mit einer niedrigen. Aufgrund dieser Zusammenhänge soll die mittlere Röntgenabschwächung im Folgenden als Dichteäquivalent verwendet werden. Die jeweiligen Werte wurden für jedes Tier tabellarisch (Microsoft Excel) aufgetragen.

**Abbildung 2: Histogramm zur Ermittlung der mittleren Röntgenabschwächung am Beispiel einer Hochdosis-Maus (VCT Histo Diagnostische Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen)**



### 2.5.8 Lungenvolumenmessung

Um eine einheitliche Volumenberechnung zu gewährleisten, wurde zunächst in allen segmentierten Aufnahmen eine Kürzung der Trachea bis auf 2,5 cm oberhalb der Bifurkation vorgenommen. Um die Übertragung der einzelnen Grauwerte der Aufnahmen in das Tabellenkalkulations-Programm Excel zu ermöglichen, wurden die segmentierten Lungen reformatiert abgespeichert (Schichtdicke und Abstand zwischen den Schichten 0,1 mm, FOV 2,5 cm). Das zugehörige Histogramm wurde mit einem selbst geschriebenen Programm (VCT Histo Diagnostische Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen) in ein Excel-kompatibles Format umgewandelt. Für die Berechnung der Volumina wurden alle Bildpunkte der segmentierten Lungen summiert und das Ergebnis anschließend mit der Voxelgröße multipliziert.

## **2.6 Physikalisch- biomechanische Messungen**

### **2.6.1 Lungenpräparation**

Die Präparation der Lunge erfolgte nach einem, in Vorläuferstudien etablierten, Verfahren (Lüthje 2009 a und 2009 b). Hierfür wurde die jeweilige Maus erneut in einen mit Isofluran präparierten Glasbehälter gesetzt. Nachdem keine Spontanatmung mehr erkennbar war und das Tier keinerlei Reaktion auf Schmerzreize zeigte, wurde es mit einem Genickbruch schmerzlos getötet. Nachdem die Maus rücklings auf der Unterlage fixiert war, erfolgte zunächst die stumpfe Präparation des Halsbereichs zur Darstellung der Trachea. Um ein Entweichen von Luft vor der eigentlichen Messung zu verhindern, wurde sofort nach der Öffnung der Trachea zwischen zwei Knorpelspangen eine stumpfe Injektionskanüle (Außendurchmesser 1,1 mm) im distalen Trachealstumpf platziert und beides mit einer chirurgischen Naht luftdicht verschlossen. Der anschließenden Öffnung des Brustkorbs durch einen transversalen Schnitt entlang des Rippenbogens folgten die Durchtrennung des Peritoneums und die Ablösung der Leber vom Zwerchfell. Durch die nun folgende Eröffnung des Pleuraspalts mit einer feinen chirurgischen Schere wird der im Pleuraspalt herrschende Unterdruck neutralisiert, so dass das Organ durch die Zugkraft der elastischen Rückstellkräfte kollabiert.

Als nächstes entfernten wir die vordere knöcherne Thoraxwand durch zwei longitudinale Schnitte bis zur Clavicula. Die freie Sicht auf die Lungen und das Mediastinum machten das Aufsuchen des rechten Ventrikels möglich, aus dem mit einer dünnen Kanüle bis zu 1,0 ml Blut entnommen werden konnte, um den Restblutgehalt der Lunge möglichst gering zu halten. Anschließend konnten wir die Lunge vorsichtig, mit durch die Kanüle luftdicht verschlossener Trachea, aus der Brusthöhle lösen. Dabei musste sehr behutsam vorgegangen werden, um das Lungengewebe nicht zu verletzen.

### **2.6.2 Lungenvolumetrie**

Für die ex-vivo-Bestimmung der Lungenvolumina wurde ein mit Wasser gefülltes Becherglas auf eine Waage (BL 1500, Sartorius AG, Göttingen) gestellt und diese auf 0 zurückgesetzt. Anschließend wurde die an der Kanüle befestigte Lunge vollständig unter die Wasseroberfläche gedrückt und die Masse der dadurch verdrängten Wassermenge in g

ermittelt. Aufgrund der Dichte des Wassers von 1 g/ml entspricht der auf der Waage angezeigte Wert in g dem Lungenvolumen in ml.

### 2.6.3 Statische Compliance und elastische Rückstellkräfte

Die Messung der statischen Compliance ist eine anerkannte Methode zur Quantifizierung der Dehnbarkeit emphysematischer Lungen. Aufgrund des Verlustes an elastischen Fasern kommt es schon bei geringen, transpulmonalen Drücken zu einer raschen Aufdehnung des Lungengewebes. Eine weitere Folge des Faserverlustes ist die nachlassende elastische Rückstellkraft. In der gesunden Lunge sorgt der elastische Zug für ein Offenhalten der kleinen Atemwege. Lässt die Elastizität nach, kollabieren die Atemwege und es kommt zu einer erschwerten Entlüftung der Lunge. Zur Bestimmung der statischen Compliance und der elastischen Rückstellkraft wurde die präparierte Lunge zunächst mit der Unterseite nach oben vollständig in Wasser getaucht. Dadurch wurde eine Antrocknung des unfixierten Gewebes vermieden, die eine Verfälschung der Messwerte zur Folge gehabt hätte. An die mit der Trachea verbundenen Kanüle wurde dann ein Schlauchsystem angeschlossen, welches wiederum zu einem Dreiwegehahn führte.

Ein kliniküblicher Perfusomat (Typ Secura 871702/8, Braun, Melsungen), der mit einer luftgefüllten 50-ml-Perfusorspritze präpariert wurde, diente der kontinuierlichen Luftinsufflation mit einem Fluss von 15 ml/h. Am verbleibenden Anschluss des Dreiwegehahns befand sich eine Druckmesseinheit (Linearcorder Mark 7 WR 3101, Harvard Apparatus/Hugo –Sachs –Elektronik, March-Hugstetten), welche die im geschlossenen System ansteigenden Drücke registrierte. Es erfolgte nun eine kontinuierliche Luftinsufflation bis zu einem Druckanstieg auf 12,5 cm H<sub>2</sub>O. Nach Erreichen dieses Zielwertes wurde über einen weiteren Dreiwegehahn, der ins Schlauchsystem integriert war, die insufflierte Luft durch eine englumige Injektionskanüle abgelassen, bis sich der intrapulmonale Druck dem der Atmosphäre angepasst hatte. Durch die Weiterleitung des von der Druckmesseinheit registrierten Spannungssignals an einen A/D-Wandler, welcher wiederum die Aufzeichnung über einen Personal Computer ermöglichte, gelang es, Druckanstieg und -abfall über die Zeit zu registrieren. Ein in der Softwareumgebung LabView (National Instruments) erstelltes Programm diente der Speicherung und Auswertung der gewonnenen Druckdaten. Anhand der aufgezeichneten Druck-Zeit-Kurven konnte unter Berücksichtigung des bekannten konstanten Flusses nachfolgend die statische Compliance berechnet werden. Die Compliance C ist definiert als  $C = \Delta V / \Delta P$  und wurde aus der Steigung des gemessenen Druckes über die Zeit



bei bekanntem Fluss (15 ml/h) ermittelt. Anschließend erfolgte die Berechnung der elastischen Rückstellkraft mithilfe des aufgezeichneten Druckabfalls über die Zeit nach Öffnung des Systems zur Atmosphäre. Hierfür wurde eine exponentielle Decay-Funktion erster Ordnung ( $P = P_0 e^{-(t-t_0)/\tau}$ ) mit Hilfe der Computersoftware Microcal Origin gefittet, um anschließend die Zeitkonstante  $\tau$  bestimmen zu können. Dabei ist  $P$  der aktuelle Druck,  $P_0$  der Anfangsdruck,  $e$  die Eulersche Zahl,  $t$  die aktuelle Zeit und  $t_0$  die Anfangszeit. Nach Beendigung der Messung wurde die aus dem Wasserbad entnommene Lunge zur Fixation in eine 4 %ige Paraformaldehydlösung gegeben und erneut mittels des Perfusors auf einen Druck von 12,5 cmH<sub>2</sub>O gebläht, der dann über 2 Stunden konstant gehalten wurde. Diese Prozedur gewährleistet eine Gewebsfixation der vollständig entfalteten Lunge, wie es die späteren histologischen Verfahren notwendig machten. Anschließend wurde das Organ für weitere 14 Stunden mit verschlossenen Luftwegen in 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und so für die Gewebsuntersuchung aufbereitet.

## 2.7 Histologie

### 2.7.1 Entwässerung

Die Paraformaldehyd-fixierten Proben wurden zur Entwässerung in einen Automaten zur Paraffinierung (TP 1020, Leica, Bensheim) gegeben. Hier durchliefen die Präparate 12 Behälter mit unterschiedlichen Fixationslösungen:

Schritt 1:	60% Ethanol	für	1 Stunde
Schritt 2:	70% Ethanol	für	1 Stunde
Schritt 3:	80% Ethanol	für	1 Stunde
Schritt 4:	96% Ethanol	für	1 ½ Stunden
Schritt 5:	100% Ethanol	für	1 ¼ Stunden
Schritt 6:	100% Ethanol	für	1 ½ Stunden
Schritt 7:	100% Ethanol	für	1 ½ Stunden
Schritt 8:	100% Chloroform	für	1 ¼ Stunden

- Schritt 9: 100% Chloroform für 1 ½ Stunden
- Schritt 10: Paraffin für 1 Stunde
- Schritt 11: Paraffin für 1 Stunde
- Schritt 12: Paraffin für 1 Stunde.

### 2.7.2 Einbettung

Um ein späteres Schneiden der Präparate zu ermöglichen, wurden die Paraffin-fixierten Proben mit Hilfe des Einbettautomaten EG 1140C (Leica, Bensheim) in Wachsblöcken eingebettet. Dazu musste jede Lunge möglichst mittig in eine Metall-Form gelegt werden, in die dann auf 60°C erhitztes, flüssiges Wachs gegossen wurde. Sobald die Lunge durch das auf der Kühlplatte gehärtete Paraffin in der Form fixiert war, wurde eine Trägerplatte aus Kunststoff (Histosette, Simport, Beloeil, Kanada) unter gleichzeitigem Nachgießen von Wachs von oben aufgesetzt. Nachdem das Wachs durch die Kühlplatte vollständig ausgehärtet war, konnte das Präparat mithilfe eines chirurgischen Einmalskalpells aus der Form entfernt und an den Kanten geglättet werden. Der vollständig ausgehärtete Paraffinblock war nun schnittfertig.

### 2.7.3 Schneiden

Das Schneiden der Präparate erfolgte mit dem Microtom RM 2165 (Leica, Bensheim), in welches zunächst eine Klinge (Microtome Blades N35H, Feather, *Tokyo, Japan*) sowie das Präparat nach Herstellerangaben eingespannt wurden. Als Schnittdicke wählten wir 5 µm. Um möglichst die gesamte Lunge beurteilen zu können, wurden jeweils 5 Schnitte aus drei transversalen Ebenen des Ober-, Mittel- und Unterlappens gewonnen. Dazu wurden nach den ersten 5 Schnitten 200-350 µm Gewebe verworfen, um dann erneut 5 Proben zu erhalten. Nachdem sich die feinen Schnitte in einem auf 50 °C erhitzten Wasserbad vollständig geglättet hatten, konnte die Auftragung auf die SuperFrost®Plus Objektträger (Menzel, Lommatzsch, Deutschland) mit einer Größe von 25 x 75 x 1.0 mm erfolgen. Die aufgezogenen Schnitte mussten zunächst auf einer Wärmeplatte für 10 Minuten angewärmt und anschließend über 45 Minuten in einem Trockenschrank bei 54 °C getrocknet werden.

Vor der Färbung wurden die Objektträger über Nacht in speziellen Präparatekoffern zwischengelagert.

### 2.7.4 Färben

Alle Präparate wurden mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach folgendem Schema behandelt:

1. Entparaffinierung:

Xylol	10 Minuten
100% Ethanol	1-3 Minuten
100% Ethanol	1-3 Minuten
96% Ethanol	1-3 Minuten
96% Ethanol	1-3 Minuten
75% Ethanol	1-3 Minuten

Spülen mit Aqua dest.

2. Hämalaun 10 Minuten

3. Bläuen im warmen Leitungswasser

4. mikroskopische Kontrolle der Zellkerne

5. Eosin 1 Minute

6. Entwässerung:

Spülen mit Aqua dest.

70% Ethanol	1 Minute
96% Ethanol	1 Minute
96% Ethanol	1 Minute
100% Ethanol	1 Minute
100% Ethanol	3 Minuten.

Im Anschluss wurden die Schnitte so lange in einem Xylolbad gelagert, bis die endgültige Fixierung der Präparate mit entsprechenden Deckgläsern (Menzel, Lommatzsch, Deutschland) in der Größe 24 x 60 mm und dem Kleber Histomount erfolgen konnte.

## 2.8 Histologische Auswertung

Für die Auswertung der Gewebsschnitte wurden pro Lunge 10 Präparate ausgewählt. Mittels eines computergestützten, invertierten Mikroskops (BX S1, Olympus, Hamburg, Deutschland), einem zehnfach vergrößernden Objektiv und einer Videokamera wurden diese Präparate untersucht. Mit Hilfe des Programms DVC® wurde ein zufällig gewählter Ausschnitt auf den Bildschirm eines Personal Computers übermittelt. Der jeweils eingestellte Bereich wurde mit dem Programm Image Pro abfotografiert. Die endgültige Auswertung und Datensicherung erfolgte mit dem Programm CoreIDRAW®.

### 2.8.1 Bestimmung des mittleren Alveolarabstands

Die Bestimmung des mittleren Alveolarabstands ist eine anerkannte histopathologische Methode zur Beurteilung der Lungengewebsdichte, welche erstmalig 1962 von Dunhill beschrieben wurde (Dunhill 1962). Man projiziert dabei eine Linie mit einer definierten Länge (hier 1mm) auf das auszuwertende Bild. Ziel ist die Zählung der auf dieser Linie liegenden Alveolarsepten. Befinden sich Gefäße oder Bronchioli auf dem Ausschnitt, so werden ihre Schnittpunkte mit der Linie als  $\frac{1}{2}$  gezählt. Kreuzt die Linie ein Blutgefäß vollständig, wird dies als eine 1 gewertet. Die anschließende Berechnung des mittleren Alveolarabstands (Lm) erfolgte mit nachstehender Formel:

---

Dabei ist die Länge der verwendeten Linie 1mm und die Anzahl aller Linien 10.

Daraus folgt: Je dichter das betrachtete Gewebe, desto größer die Anzahl der Alveolarstrukturen die die Linie schneiden, und desto kleiner somit der mittlere Alveolarabstand.

## 2.9 Mathematische Methoden

Die statistische Auswertung und Beurteilung der Untersuchungsergebnisse erfolgte durch die Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Excel® (Microsoft Office Inc., 2003, USA) sowie der Grafik- und Statistiksoftware Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc. San

Diego, CA, USA). Alle experimentell erhobenen Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Zur statistischen Analyse der Ergebnisse aus den einzelnen Gruppen wurde ein Einwege-ANOVA mit nachfolgendem multiplen Vergleichstest nach Student-Newman-Keuls verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt. Für die Beschreibung des statistischen Zusammenhangs der erhobenen Daten wurden Korrelationen mit Hilfe linearer Regressionsanalysen und der Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman vorgenommen.

### 3. ERGEBNISSE

Ziel der Studie war die vergleichende Beurteilung des Schweregrads Elastase-induzierter Lungenemphyse mit Hilfe pathologischer, radiologischer und biomechanischer Verfahren. Der Grad der jeweiligen Krankheitsausprägung wurde durch eine Gruppeneinteilung in eine Hochdosis-, eine  $\frac{2}{3}$ -Dosis- und eine  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe festgelegt. Die Tiere erhielten eine jeweils definierte Menge Pankreaselastase vom Schwein (Elastasegruppen), während die Kontrollgruppe mit reiner Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) behandelt wurde. Die Zusammensetzungen der einzelnen Gruppen variierten je nach Untersuchungsmethode und werden in den Abbildungen der einzelnen Unterpunkte dargestellt.

#### 3.1 fpVCT-Aufnahmen

Da bei den computertomographischen Untersuchungen pro Tier 2 Aufnahmen (mit und ohne abgeklemmten Tubus) angefertigt wurden, erfolgte hier, neben der bekannten Einteilung in eine Kontroll- und drei Elastase-Gruppen, eine gesonderte Betrachtung der zwei Aufnahmeformen. Da einzelne Versuchstiere während der Aufnahmen mit abgeklemmtem Tubus verstarben, verzichteten wir in der letzten Versuchsreihe auf das Anbringen der Klemme, wodurch dieser Gruppe vergleichbar weniger Tiere angehören.

##### 3.1.1 Die 3D-rekonstruierte Lunge

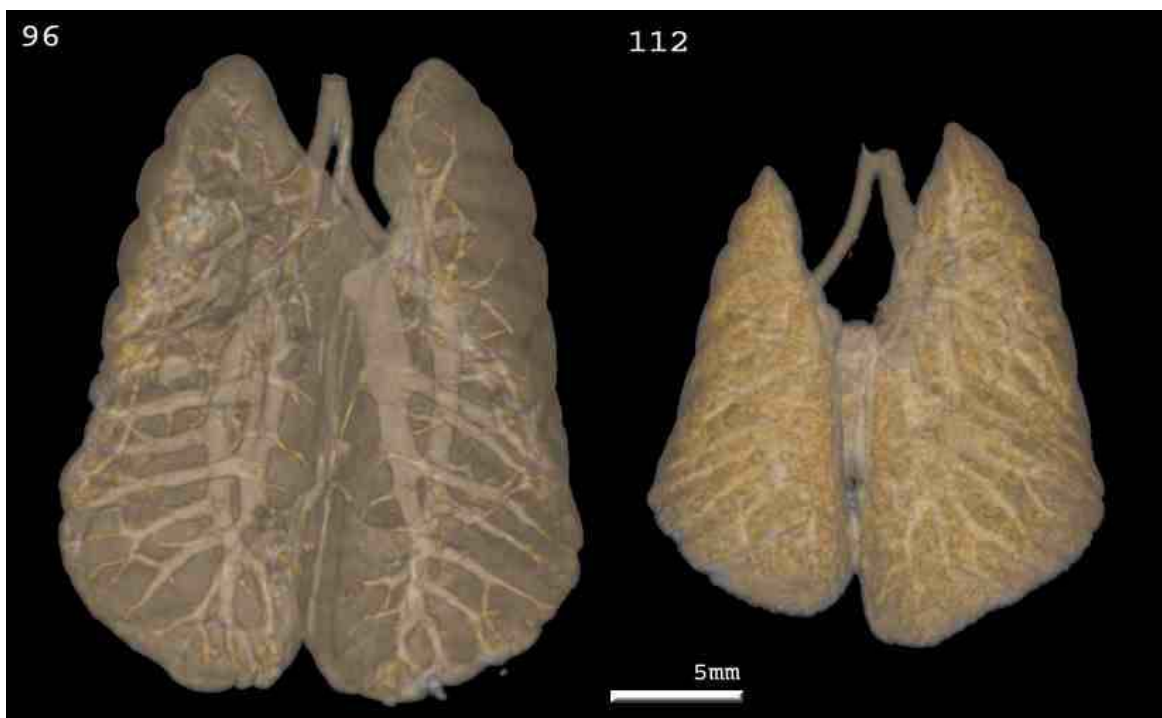
Um eine 3D-Rekonstruktion der CT-Aufnahmen zu ermöglichen, war es nötig, Schwellwerte festzulegen, welche die Grundlagen der späteren Daten-Segmentierung bildeten. Es mussten ein oberer und ein unterer Dichtewert bestimmt werden. Der untere Wert wurde auf -1000 Hounsfield-Einheiten festgelegt, was nach der gleichnamigen Skala dem Wert für Luft entspricht. Als geeigneter oberer Schwellwert wurde durch den Vergleich der durchschnittlichen Dichteverteilungen in den Histogrammen – 251 HE ermittelt.

Die vergleichende Betrachtung der segmentierten Lungen an der Workstation lieferte bereits wichtige Erkenntnisse über die anzunehmende Beschaffenheit des jeweiligen Lungengewebes. Trotz des verblindeten Vorgehens ließ sich schon anhand der eindeutigen Größenunterschiede zwischen Kontroll- und Elastase-Lungen eine Gruppenzugehörigkeit

erahnen. Die Elastaselungen waren gegenüber den Kontrolllungen sichtbar vergrößert (Abb. 3). Um welche Elastase-Gruppe es sich jeweils handelte, war hingegen kaum vorhersagbar. Auch eine rein optische Unterscheidung der Bilder anhand der angewandten Aufnahmemethode war nicht möglich. Im Vergleich der Gewebsdichte erschienen die Kontrolllungen gegenüber den Emphysemlungen erheblich dichter, was an der gelblichen Färbung der Lungen erkennbar ist (Abb.3) Die Färbung entsteht durch das Bildbearbeitungsprogramm der Workstation, welches, je nach Dichte des dargestellten Gewebes, eine bestimmte Farbe vergibt. Die Lungen der mit Elastase behandelten Tiere erscheinen in der 3D-Rekonstruktion eher gräulich.

Die vorangehenden Vermutungen bestätigten sich in der objektiven Dichtequantifizierung, die im Folgenden besprochen werden soll.

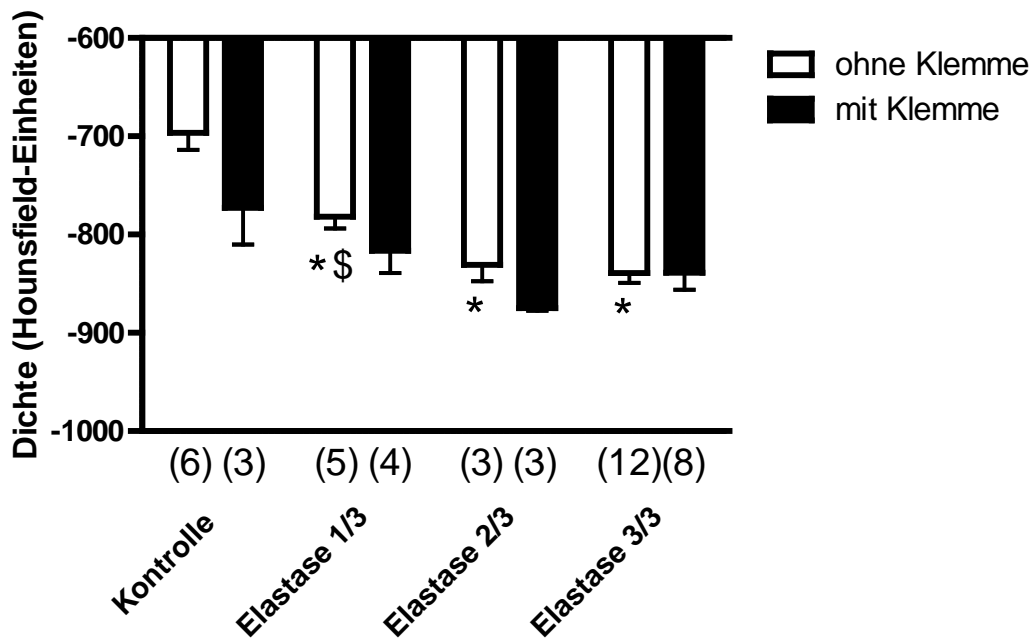
**Abbildung 3 : Größenvergleich Emphysem und Kontrolllunge**



### 3.1.2 Computertomographische Dichtebestimmung

In der graphischen Darstellung der mittels fpVCT registrierten mittleren Röntgenabschwächung lässt sich eine negative Abhängigkeit der gemessenen Werte von der applizierten Elastasedosis erkennen (Abb.4). Mit steigender Elastasedosis sinken die durchschnittlich ermittelten Hounsfield-Einheiten, was einer Dichteminderung der betreffenden Lungen entspricht. Auch die Art der Aufnahme (mit oder ohne am Tubus angebrachter Klemme) beeinflusst offensichtlich die ermittelten Dichteverteilungen. Aus diesem Grund sollen die zwei Aufnahmearten zunächst getrennt besprochen und anschließend miteinander verglichen werden.

**Abbildung 4: Abhängigkeit der Röntgenabschwächung von der applizierten Elastase Dosis; dargestellt sind die mittleren Hounsfield-Einheiten in Hu im Gruppenvergleich**



\* signifikant verschieden von Kontrolle

\$ signifikant verschieden von 3/3



### 3.1.2.1 Dichte ohne Klemme

In den Dichteverteilungen der Aufnahmen ohne am Tubus angebrachter Klemme zeigt sich eine mit steigender Elastasedosis sinkende Röntgenabschwächung, wobei im Bereich der beiden höchsten Elastasedosierungen ein Plateau erreicht wird. Die Lungen $\frac{1}{4}$ -Dosis-Gruppe ( $-781,8 \pm 27,1$  Hu) wiesen gegenüber der Kontrollgruppe ( $-696,5 \pm 42,1$  Hu) eine um 12,2 % verringerte Dichte auf. In der $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe ( $-830,7 \pm 29,0$  Hu) und der Hochdosisgruppe ( $-839,3 \pm 34,7$  Hu) war die Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe um 19,3 % bzw. 20,5 % verringert. Die durchgeführte Varianzanalyse mit Hilfe des Student-Newman-Keuls-Tests bestätigte, dass der Dichteabfall gegenüber der Kontrollgruppe für jede der drei Elastase-Gruppen signifikant war ( $p < 0,001$ ). Im Vergleich der Elastasegruppen untereinander war lediglich die Differenz der  $\frac{1}{3}$ - zur Hochdosisgruppe statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2.2 Dichte mit Klemme

Im Gruppenvergleich wiesen die Aufnahmen mit am Tubus angebrachter Klemme ebenfalls eine von der Elastase-Dosis abhängige Dichtereduktion auf, wobei der Dichtewert in der Hochdosisgruppe jedoch numerisch geringer als in der  $\frac{2}{3}$ -Dosisgruppe war. Die mittleren Dichten sanken von  $-772,7$  Hu ( $\pm 64,7$ ) der Kontrollgruppe über  $-816,5$  Hu ( $\pm 45$ ) der  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe auf  $-875$  Hu ( $\pm 4,4$ ) in der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe. Dies bedeutet eine prozentuale Abnahme um 5,7 bzw. 13,3% entgegen der Kontrollgruppe. Die Hochdosisgruppe zeigte, verglichen mit der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe, einen 4,1%igen Wiederanstieg der Dichte auf  $-838,9$  Hu ( $\pm 49,3$ ).

Die geschilderten Dichteabnahmen stellten sich in der Varianzanalyse als nicht signifikant heraus.

### 3.1.2.3 Vergleich der Aufnahmemodi für die Dichtebestimmung

Die Aufnahmen der Tiere, bei denen eine Klemme am Tubus angebracht wurde, wiesen eine insgesamt niedrigere Dichte auf, als die der Gruppe ohne Klemme. Im direkten Vergleich beider Aufnahmeformen ergibt sich eine prozentuale Dichtedifferenz der Kontrollgruppen von 10,94 %. Die  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppen differieren um 4,44 % und die  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe um 5,34 %.

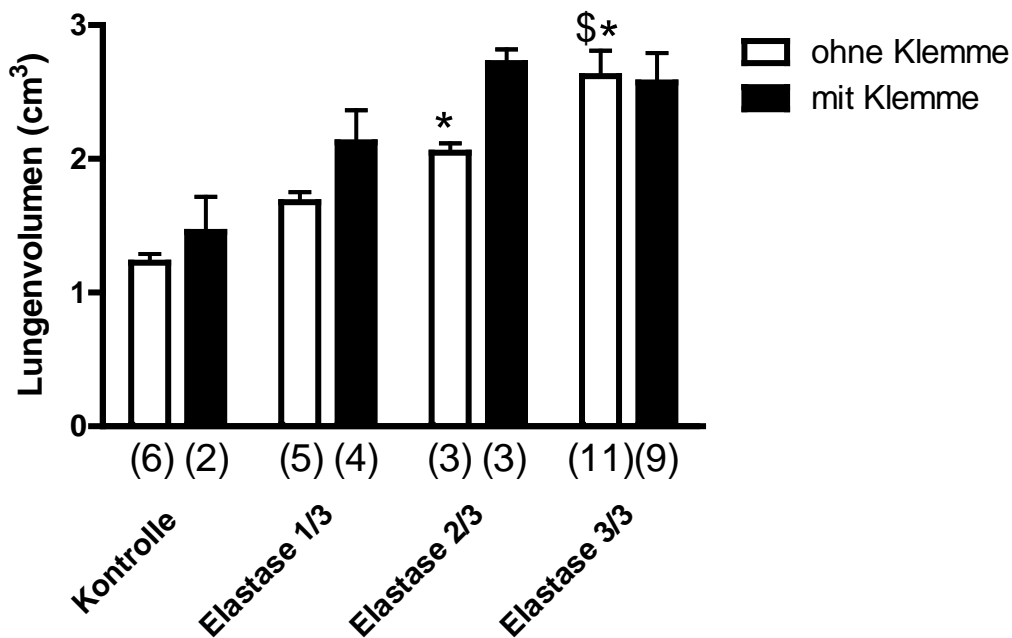
Das Dichteverhalten der Lungen der Hochdosisgruppen weicht mit 0,05 % nur geringfügig von den Aufnahmen ohne Klemme ab.

### 3.1.3 Computertomographische Volumenbestimmung

Die statistische Auswertung der mittels fpVCT bestimmten Lungenvolumina ergab eine positive Abhängigkeit von der jeweils applizierten Elastasedosis (Abb. 5). Je höher die Elastasedosis, desto größer waren die ermittelten Volumina. Eine Ausnahme bildete die Hochdosisgruppe in den Aufnahmen mit Klemme, welche eine rückläufige Tendenz aufwies.

Es zeigten sich abermals deutliche Abweichungen in den zwei Aufnahmeformen, weshalb auch hier eine getrennte Besprechung mit abschließendem Vergleich erfolgen soll.

**Abbildung 5: Mittlere Lungenvolumina in cm<sup>3</sup> in Abhängigkeit von der applizierten Elastasedosis**



\* signifikant verschieden von Kontrolle  
\$ signifikant verschieden von 1/3

### 3.1.3.1 Lungenvolumina ohne Klemme

Die aus den Aufnahmen ohne am Tubus angebrachte Klemme errechneten Volumina erhöhten sich stetig mit zunehmender Elastasedosis.

Gegenüber den Kontrolllungen mit einem durchschnittlichem Volumen von  $1,2 \text{ cm}^3 (\pm 0,2)$ , stiegen die Volumina der Elastasegruppen von  $1,7 \text{ cm}^3 (\pm 0,2)$  der  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe über  $2 \text{ cm}^3 (\pm 0,1)$  der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe auf  $2,6 \text{ cm}^3 (\pm 0,6)$  der Hochdosisgruppe an. Der Student-Newman-Keuls-Test zeigte signifikante Volumenzunahmen der  $\frac{2}{3}$ - und Hochdosis-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Innerhalb der Elastasegruppen präsentierte sich lediglich die Differenz der  $\frac{1}{3}$ - zur Hochdosisgruppe als signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.3.2 Lungenvolumina mit Klemme

Auch hier konnte eine positive Abhängigkeit der Lungenvolumina von der Elastasedosis festgestellt werden, die sich jedoch in der Hochdosisgruppe als rückläufig präsentiert. Statistisch gesehen stieg das mittlere Volumen von  $1,5 \text{ cm}^3 (\pm 0,4)$  in der Kontrollgruppe über  $2,1 \text{ cm}^3 (\pm 0,5)$  der  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe, auf  $2,7 \text{ cm}^3 (\pm 0,2)$  der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe. Das mittlere Volumen der Hochdosisgruppe zeigte, entgegen der Tendenz der anderen Elastasegruppen, eine numerische Volumenreduktion gegenüber der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe um 5,3 % auf  $2,6 \text{ cm}^3 (\pm 0,7)$ . Die mittels Student-Newman-Keuls-Tests durchgeführte Varianzanalyse ergab keine signifikanten Differenzen im Gruppenvergleich.

### 3.1.3.3 Vergleich der Aufnahmemodi für die Volumenbestimmung

Die aus den Daten mit am Tubus angebrachter Klemme errechneten Volumina erwiesen sich, mit Ausnahme der Hochdosisgruppe, höher als in den Aufnahmen ohne Klemme. Es ergab sich eine Volumendifferenz der Kontrollgruppen von  $0,2 \text{ cm}^3$ , was einem prozentualen Anteil von 18,7 % entspricht. Die  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppen differierten mit  $0,4 \text{ cm}^3$  um 26,6 %, die  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppen mit  $0,7 \text{ cm}^3$  um 32,8 %.

Im Vergleich der Hochdosisgruppen untereinander zeigte sich ein um  $0,5 \text{ cm}^3$  und 1,8 % nur geringfügig erhöhtes Volumen in den Aufnahmen ohne Klemme.

Dies entspricht dem deutlichen Volumenabfall der Hochdosisgruppe in den Durchleuchtungen mit Klemme.

## **3.2 Pathologische Beurteilung der Lungen**

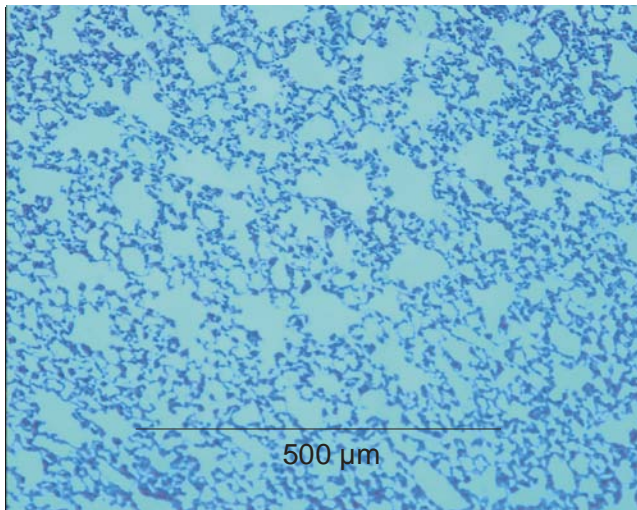
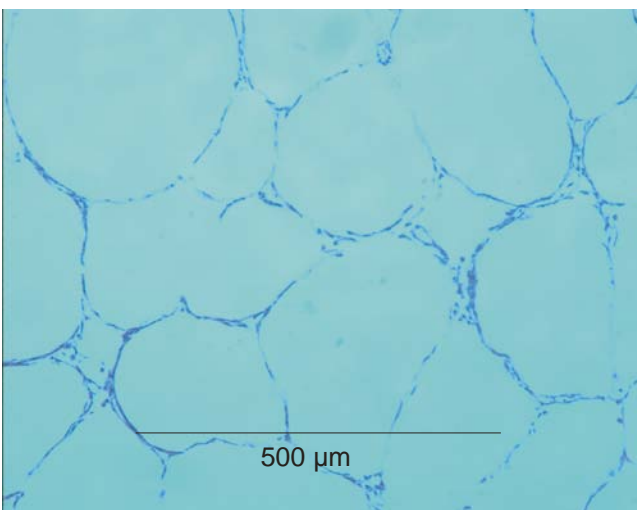
### **3.2.1 Makroskopie**

Bei der makroskopischen Beurteilung der Lungen fiel bereits während der Präparation ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Emphysemtieren auf.

Die Lungen der mit PBS behandelten Mäuse (Kontrollen) kollabierten, bedingt durch die hohe Anzahl elastischer Fasern, sofort nach Eröffnung des Pleuraspalts. Die durch die Elastaseapplikation emphysematisch veränderten Lungen hingegen zeigten nur eine geringe und sehr träge Größenabnahme. Am deutlichsten war der Unterschied im Vergleich der Hochdosis- mit der Kontrollgruppe. Makroskopisch wiesen die Kontrolllungen eine glatte Oberfläche von blass-rosa Farbe und eine regelrechte Form auf. Bei den Emphysemlungen konnte eine grob strukturierte Oberfläche mit, vor allem in der Hochdosis-Gruppe, dem bloßen Auge sichtbar vergrößerten Lungenbläschen festgestellt werden. Die Lungenoberfläche war im Vergleich zu den Kontrolllungen eher gelblich-bräunlich gefärbt. Viele der emphysematisch veränderten Lungen wiesen meist im Oberlappen lokalisierte, atelektatische Bezirke auf. Bei der Abtastung fühlten sich die Lungen brüchig und insgesamt weniger elastisch als die Kontrolllungen an.

### **3.2.2 Histologie**

Auch die mikroskopische Beurteilung der Lungen offenbarte eindeutige strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Während die Lungen der Kontrolltiere eine physiologische, kleinwabige Gewebestruktur aufwiesen (Abb.6), zeigten die Emphysem-Gruppen eine mit der Elastase-Dosis zunehmende Erweiterung der Alveolarräume (Abb.7). Auch die Alveolarsepten erschienen dünner als bei den Kontrolltieren.

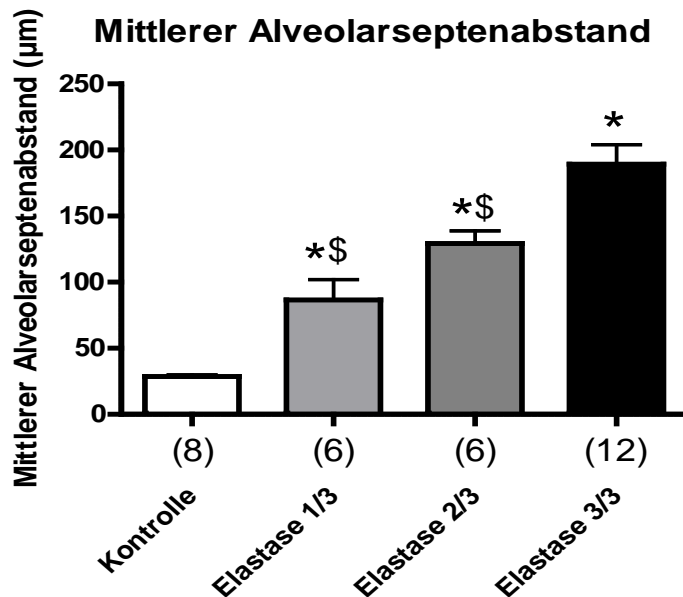
**Abbildung 6: Histologie Lunge, Kontrollmaus****Abbildung 7: Histologie Lunge, Emphysemmaus (Hochdosisgruppe)**

### 3.2.3 Histologische Dichtebestimmung

Zur Quantifizierung des Emphysems wurde der mittlere Alveolarseptenabstand für jede Gruppe bestimmt (Dunhill 1962). In der graphischen Auswertung ist eine lineare, positive Abhängigkeit der Alveolarseptenabstände von der applizierten Elastasedosis erkennbar (Abb. 8). Der mittlere Alveolarseptenabstand betrug bei den Kontrolltieren  $28,72$  ( $\pm 3,4$ )  $\mu\text{m}$ . Bei den Emphysemgruppen vergrößerte er sich von  $86,63$  ( $\pm 34,2$ )  $\mu\text{m}$  in der  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe über  $129,17$  ( $\pm 23,8$ )  $\mu\text{m}$  in der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe bis auf  $189,31$  ( $\pm 49$ )  $\mu\text{m}$  in der Hochdosis-Gruppe. Vergleicht man die Kontrollgruppe mit der  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe, fällt eine signifikante Verdreifachung ( $p < 0,01$ ) der Abstände auf, im Vergleich mit der Hochdosis-

Gruppe sogar eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Verfünffachung (Abb.8). Auch die übrigen, im Rahmen des Newman-Keuls-Test durchgeführten Vergleiche, präsentierten sich, mit Ausnahme der  $\frac{1}{3}$ -Gruppe versus der  $\frac{2}{3}$ -Gruppe ( $p > 0,05$ ) als statistisch signifikant.

**Abbildung 8: Mittlerer Alveolarseptenabstand in Abhängigkeit von der applizierten Elastasedosis**



\* signifikant verschieden von Kontrolle  
\$ signifikant verschieden von 3/3

### 3.3 Beurteilung der Lungen anhand biomechanischer Eigenschaften

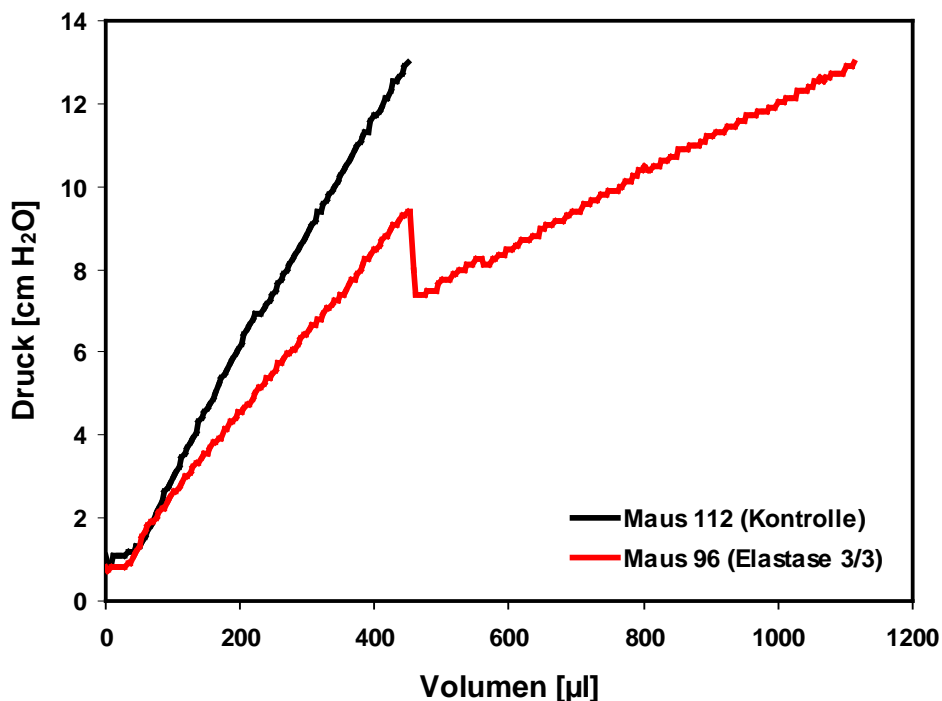
Mit Hilfe biomechanischer Untersuchungen ist es möglich, emphysebedingte, strukturelle Veränderungen der Lunge im Sinne eines Verlustes an elastischen Fasern festzustellen und quantitativ zu erfassen. Diese wirken sich sowohl auf die Dehnbarkeit (Compliance), als auch auf die elastische Rückstellkraft (Recoil) aus. Beides wurde im Rahmen unserer Studie bestimmt und miteinander korreliert.

#### 3.3.1 Statische Compliance

Die für die Studie ermittelte statische Compliance gilt als Maß für die passive Dehnbarkeit eines Organs bzw. einer Körperstruktur. Für die in unserem Fall zu ermittelnde

Lungencompliance erfolgte eine Blähung der Lungen mit einem definierten Volumen pro Zeit. Verglichen mit den Kontrolltieren, deren Verlaufskurven einen steilen und annähernd linearen Verlauf zeigten, waren bei den elastasebehandelten Tieren die Druckanstiege durch intermittierende Druckabfälle unterbrochen, sodass die Druckkurve ein sägezahnartiges Muster zeigte (Abb.9).

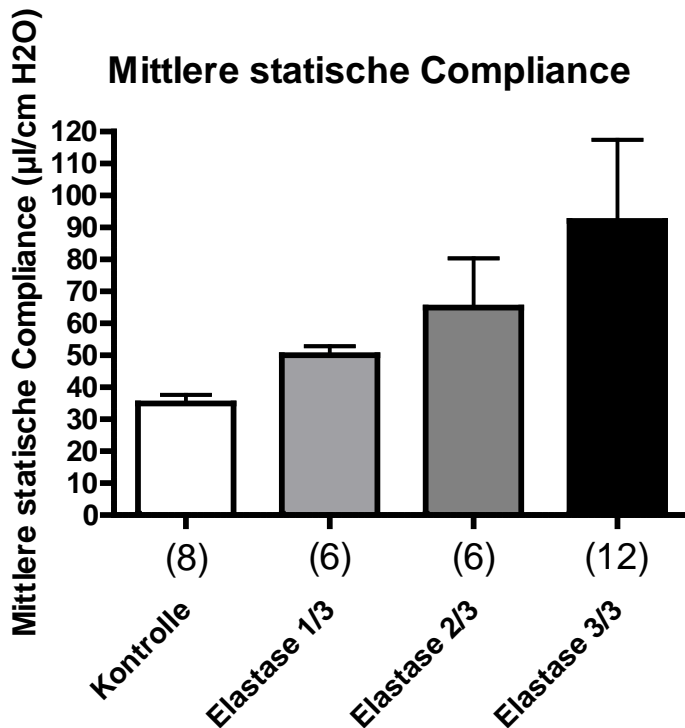
**Abbildung 9: Statische Compliance**



Die wahrscheinlichste Ursache für den irregulären Kurvenverlauf sind bestehende, atelektatische Bezirke infolge ventilartiger Verschlüsse kleiner Bronchien innerhalb der Emphysemungen, die sich bei Erreichen eines bestimmten Druckes schlagartig aufdehnen und dann zu einem Druckabfall führen. Bei genauer Betrachtung der präparierten Lungen während der Luftinsufflation wurde die plötzliche Belüftung der Atelektasen durch eine auf bestimmte Areale der Lunge begrenzte, Größenzunahme auch mit dem bloßen Auge sichtbar. In der statistischen Auswertung zeigte sich eine positive Abhängigkeit der Compliance von der applizierten Elastasedosis (Abb. 10). Es ergab sich eine mittlere statische Compliance der Kontrolltiere von  $34,9 (\pm 6,16) \mu\text{l}/\text{cm H}_2\text{O}$ . Die Lungen der elastasebehandelten Tiere zeigten eine mit steigender Elastasedosis zunehmende Compliance. Diese reichte von  $50,17 (\pm 6,71) \mu\text{l}/\text{cm H}_2\text{O}$  bei den Tieren der  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe, über  $64,96 (\pm 40,81) \mu\text{l}/\text{cm H}_2\text{O}$  in der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe, bis hin zu einer mittleren statischen Compliance von  $92,02 (\pm 56,96) \mu\text{l}/\text{cm}$

H<sub>2</sub>O. In der statistischen Datenanalyse zeigte sich der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen im Newman-Keuls-Test als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

**Abbildung 10: Statische Compliance in Abhängigkeit von der Elastasedosis**



### 3.3.2 Elastische Rückstellkraft

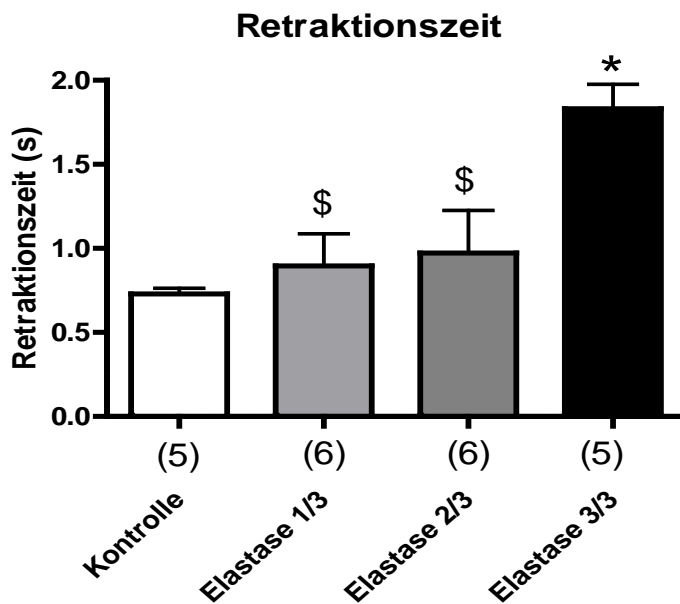
Die elastische Rückstellkraft quantifiziert das Bestreben der Lunge sich aufgrund der interstitiellen Einlagerung elastischer Fasern nach einer erfolgten Dehnung (Inspiration) von alleine wieder auf ihre Ursprungsgröße zurück zu ziehen (Expirationstellung). Bei einem strukturellen Umbau mit zunehmendem Verlust von elastischen Fasern, wie es bei emphysematösen Lungen der Fall ist, kommt es zu einer verminderten Retraktionskraft. Um diese zu bewerten, wurde die Zeitkonstante Tau bestimmt, welche sich aus dem durch Entweichen von vorher insufflierter Luft entstehenden Druckabfall über die Zeit bis zum Erreichen des Ausgangsdruckes errechnen lässt. Aufgrund der Abhängigkeit zur Zeit wird die Rückstellkraft im Folgenden Rückstellzeit genannt. In Abbildung 11 ist die Abhängigkeit der Rückstellzeit von der Elastasedosis dargestellt. Bei den Kontrolltieren zeigte sich ein gleichmäßiger exponentieller Druckabfall, wohingegen es bei den Emphysemgruppen zu einem treppenartigen Abfall des Druckes kam. Ähnlich wie bei den Compliance-Messungen,



bei denen die Druckzunahme durch atelektatische Bezirke verzögert wird, kommt es hier am ehesten zu einer durch ventilartig verschlossene kleine Bronchien verursachten Hemmung der Retraktion.

In der statistischen Auswertung ergab sich eine mit steigender Elastasedosis zunehmende Zeitkonstante Tau. Diese betrug bei den Kontrolltieren  $0,73 (\pm 0,03)$  s und steigerte sich von  $0,9 (\pm 0,19)$  s der  $\frac{1}{3}$  Dosis-Gruppe über  $0,97 (\pm 0,25)$  s der  $\frac{2}{3}$  Dosis-Gruppe auf  $1,83 (\pm 0,15)$  s in der Hochdosisgruppe. Im Gruppenvergleich zeigten sich die Unterschiede aller Gruppen verglichen mit der Hochdosisgruppe als signifikant ( $p < 0,01$ ).

**Abbildung 11: Abhängigkeit der elastischen Retraktionszeit von der Elastasedosis**



\* signifikant verschieden von Kontrolle  
\$ signifikant verschieden von 3/3

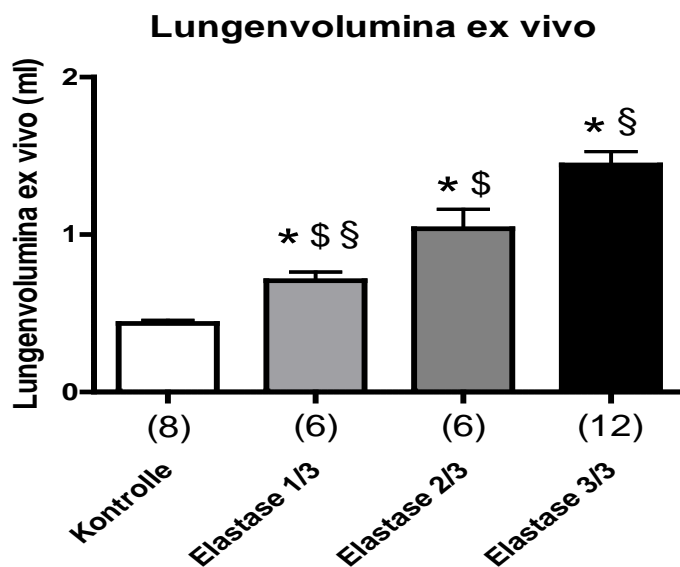
### 3.4 Ex-vivo-Lungenvolumenbestimmung

Die statistische Auswertung der postmortem ermittelten Lungenvolumina zeigte, parallel zu den Ergebnissen der computertomographischen Messungen, eine positive lineare Abhängigkeit von der applizierten Elastasedosis (Abb.12). Während die Kontrollgruppe ein mittleres Lungenvolumen von  $0,44 (\pm 0,04)$  ml aufwies, nahm das Lungenvolumen mit

steigender Elastasedosis von 0,71 ( $\pm$  0,3) ml der  $\frac{1}{3}$ -Dosis-Gruppe über 1,04 ( $\pm$  0,3) ml der  $\frac{2}{3}$ -Dosis-Gruppe bis auf 1,44 ( $\pm$  0,21) ml in der Hochdosis-Gruppe zu.

Im Gruppenvergleich präsentierten sich alle Unterschiede als signifikant ( $p < 0,001$ , 0,01 und 0,05).

**Abbildung 12: Abhängigkeit der Lungenvolumina von der Elastasedosis**



\* signifikant verschieden von Kontrolle

§ signifikant verschieden von 2/3

§ signifikant verschieden von 3/3

### 3.5 Regressionsanalysen

Die durchgeführten Regressionsanalysen der ermittelten Dichten und Volumina sollten prüfen, inwiefern die computertomographischen Ergebnisse mit den histopathologischen Verfahren korrelieren. Außerdem soll beurteilt werden, welche der beiden fpVCT-Aufnahmeformen die größte Korrelation mit den Vergleichsmethoden aufweist, weshalb auch hier eine getrennte Darstellung der Aufnahmen mit und ohne Klemme erfolgt.

### 3.5.1 Dichtekorrelation

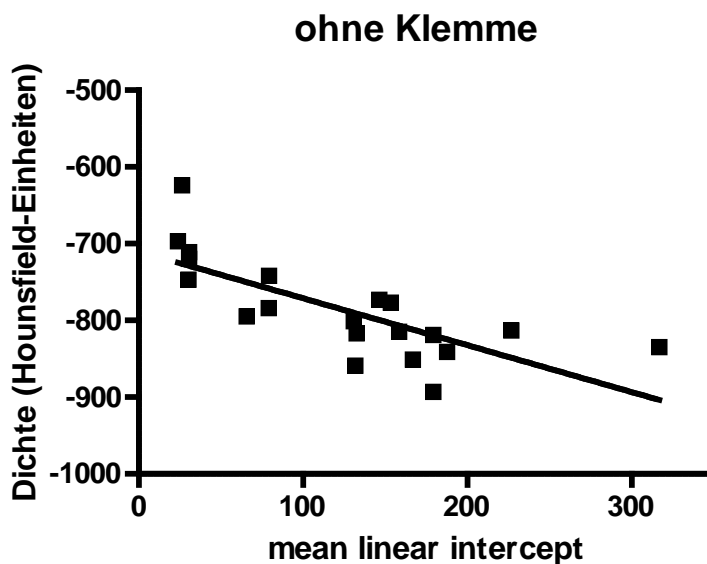
Für die Dichtekorrelation wurden die Ergebnisse der histologischen Dichtebestimmung (mittlerer Alveolarseptenabstand) und der computertomographisch ermittelten Dichten mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse miteinander verglichen (Abb. 13 und 14).

Sowohl für die Aufnahmen mit, als auch ohne Klemme, zeigte sich ein negativer Zusammenhang der Dichtemessungen. Eine hohe Gewebsdichte ging mit zunehmenden Hounsfield-Einheiten (Annäherung an 0) und kleiner werdenden mittleren Alveolarseptenabständen einher.

#### 3.5.1.1 Dichtekorrelation ohne Klemme

Die durchgeführte lineare Regression für die Aufnahmen ohne Klemme zeigt eine insgesamt niedrige Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade (Abb. 13). Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen den computertomographisch und histologisch ermittelten Dichten ( $p < 0,0002$ ). Als Bestimmtheitsmaß ergab sich  $r^2 = 0,55$ .

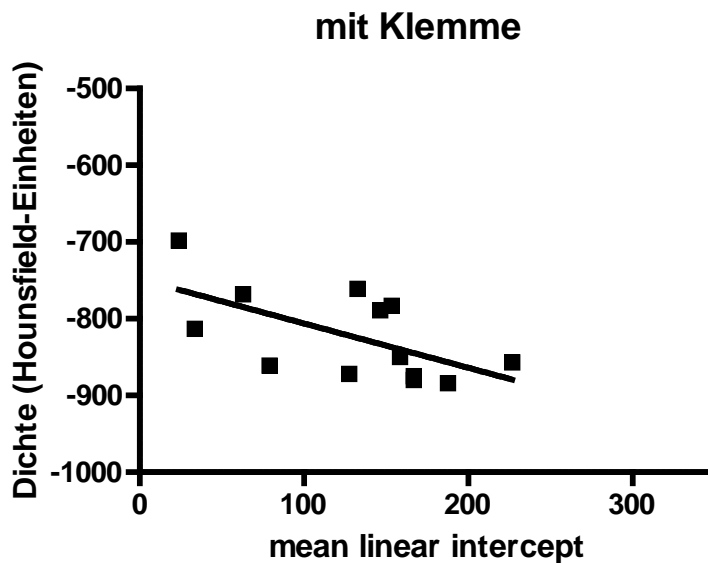
**Abbildung 13: Korrelation der mittleren Alveolarseptenabstände mit den im fpVCT ermittelten Hounsfield-Einheiten für die Aufnahmen ohne Klemme**



#### 3.5.1.2 Dichtekorrelation mit Klemme

Die Ergebnisse der linearen Regression für die Aufnahmen mit Klemme zeigten eine erheblich größere Streuung der Werte um die Regressionsgerade als die der Aufnahmen ohne Klemme. Gestützt wird diese Annahme durch das vergleichsweise niedrige Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,37$ . Dennoch konnte auch hier eine signifikante Korrelation der Dichtemessungen bewiesen werden ( $p < 0,029$ ).

**Abbildung 14: Korrelation der mittleren Alveolarseptenabstände mit den im fpVCT ermittelten Hounsfield-Einheiten für die Aufnahmen mit Klemme**



### 3.5.2 Lungenvolumen

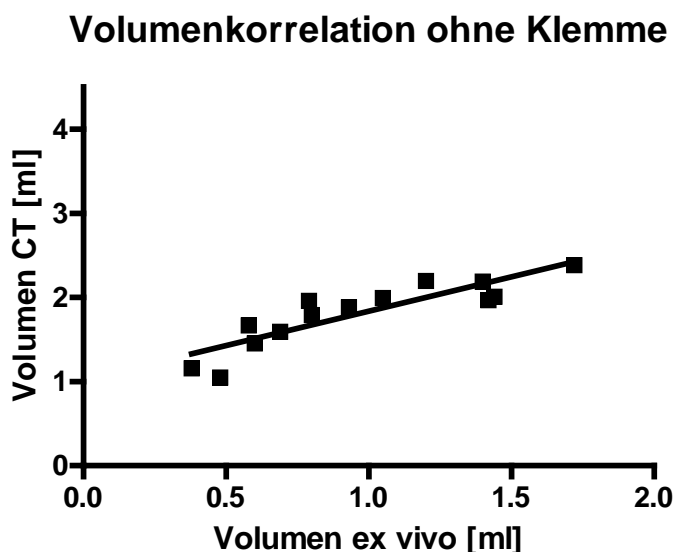
Zur Schätzung der Beziehung zwischen den computertomographisch und ex vivo ermittelten Lungenvolumina, führten wir eine weitere lineare Korrelationsanalyse durch.

Es zeigte sich für beide Aufnahmeformen ein positiver Zusammenhang zwischen den verglichenen Messmethoden (Abb. 15 und 16).

#### 3.5.2.1 Volumenkorrelation ohne Klemme

Die lineare Regression der radiologisch ermittelten Lungenvolumina für die Aufnahmen ohne Klemme zeigt eine sehr geringe Datenstreuung entlang der Regressionsgeraden (Abb. 15). Die Messergebnisse der computertomographischen Volumenbestimmung korrelieren signifikant mit den ex vivo gemessenen Volumina ( $p < 0,0001$ ). Hierfür spricht auch das vergleichsweise hohe Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0,77$ . Bei der Erstellung der Korrelationsanalyse fiel auf, dass die radiologisch bestimmten Volumina zu den ex vivo bestimmten Volumina etwa im Verhältnis von 2:1 standen.

**Abbildung 15: Korrelation Lungenvolumen ohne Klemme**



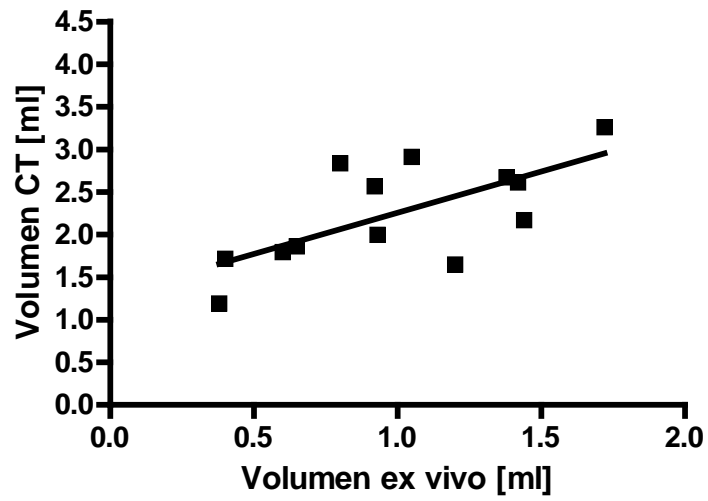
### 3.5.2.2 Volumenkorrelation mit Klemme

Die lineare Korrelation der ermittelten Volumina für die Aufnahmen mit Klemme lässt, wie in der Korrelation der Dichte, eine große Streuung der Daten um die Regressionsgerade erkennen (Abb. 16).

Auch das Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0,46$  ist vergleichsweise niedrig. Dennoch zeigte sich auch hier eine signifikante Korrelation der verglichenen Methoden ( $p < 0,01$ ). Wie im Fall der Volumenkorrelation ohne Klemme waren die radiologisch bestimmten Lungenvolumina durchweg größer als die ex vivo bestimmten Vergleichswerte.

**Abbildung 16: Korrelation Lungenvolumen mit Klemme**

### Volumenkorrelation mit Klemme



## 4. DISKUSSION

### 4.1 COPD

Die Erforschung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung ist in Anbetracht ihrer zunehmenden Inzidenz und der damit verbundenen Kosten von wachsendem volkswirtschaftlichen und gesundheitspolitischen Interesse. Alle bis dato verfügbaren Therapieansätze beschränken sich auf die Symptomlinderung und sind nicht in der Lage eine Krankheitsprogression zu verhindern. Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung und Bewertung neuer Therapiekonzepte stellt das Vorhandensein geeigneter diagnostischer Verfahren dar. Eine Verbesserung der in-vivo-Bildgebung könnte die Verlaufsbeurteilung dringend benötigter, medikamentöser Langzeitstudien erheblich vereinfachen. Croxton et al. wiesen 2002 im Rahmen eines Workshops des National Heart, Lung, and Blood Institutes (NHLBI) auf die Dringlichkeit der Weiterentwicklung von in-vivo-Bildgebungstechniken zur exakteren Beurteilung chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen hin. Die mittels hochauflösender Computertomographie (HRCT), MRT oder PET gewonnenen Aufnahmen ermöglichen exakte Bewertungen der erkrankten Organe und könnten den bisherigen präklinischen und klinischen Standards bald überlegen sein. So erwies sich beispielsweise die computertomographische Beurteilung des Emphysemzustandes in einer Langzeitstudie an Patienten mit alpha1-Antitrypsin-Mangel als sensitiver im Vergleich zur Bestimmung des FEV1-Wertes (Dirksen et al. 1999). Vor allem in frühen Stadien der Erkrankung können CT-Aufnahmen Hinweise auf bereits bestehende, emphysematische Läsionen geben, ohne dass klinische Anzeichen einer Atemwegobstruktion bestehen (Sanders et al. 1988). So konnte in einer jüngst erschienenen Studie die Überlegenheit der multislice Computertomographie gegenüber dem FEV1-Wert in der Früherkennung der COPD durch Messung der Dicke der Atemwegswände belegt werden (Yuan et al. 2009).

Bevor es zu einer der vielfältigen, potentiellen Anwendungen neuer bildgebender Verfahren kommen kann, sind präklinische Studien erforderlich, die zumeist einen Einsatz von Kleintieren nötig machen. Die im Vergleich zum Menschen deutlich kleineren zu betrachtenden Strukturen stellen besondere Anforderungen an die verwendete Untersuchungsmethode. Eines der Systeme, die diesen Anforderungen dennoch entsprechen, ist die Flächendetektor-basierte Volumen-Computertomographie (fpVCT).

Um die Validität dieses neuartigen Verfahrens hinsichtlich der Schweregradbeurteilung von Emphysemen zu prüfen, wurden in dieser Studie Untersuchungen an einem Mausmodell des Elastase-induzierten Lungenemphysems durchgeführt.

## 4.2 Emphyseminduktion

Die wichtigsten Erkenntnisse, die man im Laufe der Zeit über die zellbiologischen Hintergründe der Emphysementstehung erworben hat, sind auf Untersuchungen an Tiermodellen zurückzuführen. Seit Gross et al. 1965 den Grundpfeiler zur Emphyseminduktion bei Tieren durch intratracheale Applikation verschiedener Proteinasen legte, hat man in nachfolgenden Studien versucht, ein Tiermodell zu finden, welches am ehesten in der Lage ist, die Komplexität der Krankheit widerzuspiegeln. In der Literatur findet sich eine Reihe von Methoden zur Emphyseminduktion. Neben der Verwendung von verschiedenen Elastasen werden Emphyseme durch Begasung mit Tabakrauch (Hautamaki et al. 1997, Nikula et al. 2000) und mithilfe genetisch veränderter Mäuse – wie transgenen oder Knockout-Mäusen – induziert (Campbell 2000, D'Armiento et al. 1992, Shapiro 2007). Kasahara et al. gelang 2000 ferner eine Emphysemerzeugung durch Induktion von Apoptose in Lungenendothelzellen in denen zuvor der VEGF-Rezeptor 2 blockiert wurde. Die gebräuchlichste Methode stellt jedoch das Elastase-Modell dar (Shapiro 2000 a). Dies beruht einerseits darauf, dass es relativ einfach und kostengünstig durchzuführen ist und andererseits, dass es viele Aspekte der Krankheit des Menschen, wie zum Beispiel die chronische Entzündung durch Ansammlung von Neutrophilen und Makrophagen, rekapituliert (Shapiro 2000 b). Die Elastase-induzierte Emphysemerzeugung an Versuchstieren eignet sich insgesamt gut zur Durchführung von Langzeitstudien mit dem Ziel der Erprobung neuer therapeutischer Strategien und weniger zur Erforschung weiterer, an der Krankheit beteiligter, pathogenetischer Mechanismen (Fehrenbach 2006). Das von uns verwendete Tiermodell hat sich in mehreren Vorläuferstudien hinsichtlich der morphologischen und funktionellen Ausprägung sowie der Reproduzierbarkeit des Lungenemphysems als sehr verlässlich herausgestellt (Lüthje et al. 2009 a und b). Durch die mehrzeitige, intratracheale Applikation einer auf das Körpergewicht abgestimmten Dosis Pankreaselastase werden die Lungen nach und nach kumulativ geschädigt, was dem chronisch progressiven Verlauf der Krankheit am nächsten kommt. Während der Elastaseapplikation werden die Tiere zudem nach einem vorgegebenen Schema



Lagewechseln unterzogen, die für eine gleichmäßige Verteilung der Elastase im Bronchialsystem sorgen und somit zur Ausbildung eines homogeneren Emphysems beitragen.

### **4.3 Histologisch-biomechanische Emphysementeilung**

Eines der Studienziele war, zu zeigen, ob man mithilfe des verwendeten bildgebenden Verfahrens unterschiedliche Schweregrade eines Lungenemphysems diskriminieren kann. Zu diesem Zweck mussten die Befunde aus der bildgebenden Untersuchung mit einem validen Gold-Standard verglichen werden. Um Emphyseme mit unterschiedlichem Schweregrad hervorzurufen, wurden Mäuse mit verschiedenen Dosierungen von Pankreaselastase behandelt. Als Gold-Standard zur Untersuchung, ob dies auch tatsächlich Emphyseme eines unterschiedlichen Schweregrads bewirkte, wurden histologische und funktionell-biomechanische Untersuchungen durchgeführt.

Eine der wichtigsten und ältesten Techniken zur quantitativen Bewertung des Emphysemschweregrades ist die Bestimmung des mittleren Alveolarseptenabstands nach MS Dunhill aus dem Jahre 1962. Als histomorphologisches Dichtekorrelat lassen sich mit dieser Methode valide Aussagen über die strukturelle Beschaffenheit der Lungen treffen. Ein Vergleich der einzelnen Gruppen im Balkendiagramm zeigte eine annähernd lineare Zunahme der Alveolarseptenabstände mit ansteigender, applizierter Dosis an Pankreaselastase (Abb. 8). Somit war eines der Hauptmerkmale des Lungenemphysems erfüllt, nämlich die zunehmende Erweiterung der distalen Atemwege. Eine lineare Abhängigkeit von der Elastasedosis zeigten ferner die *ex vivo* bestimmten Lungenvolumina als Zeichen der fortschreitenden Überblähung und des air trapping-Phänomens (Abb. 12), sowie die statische Compliance als Ausdruck einer nachlassenden Elastizität des emphysematischen Lungengewebes (Abb. 9). Diese entsteht durch einen Verlust an elastischen Fasern im Rahmen des Protease-vermittelten Gewebeabbaus. Auch die zur Quantifizierung der elastischen Rückstellkraft bestimmte Zeitkonstante  $\tau$  nahm mit der applizierten Elastasedosis zu, wenngleich hier keine lineare Abhängigkeit zu erkennen war. Sie ist ebenfalls Ausdruck einer reduzierten Elastizität mit einer verminderten Retraktionskraft. Bei der Bestimmung der statischen Compliance und Rückstellkraft waren ferner rezidivierende Druckabfälle zu beobachten, die am ehesten durch ventilartige Kompression von Bronchien und daraus resultierende minderbelüftete bis atelektatische Bezirke hervorgerufen wurden. Mit dem Vorhandensein dieser Bezirke zeigt sich ein weiterer typischer Aspekt der Krankheit in dem von uns genutzten Modell zur Erzeugung eines

Lungenemphysems. Zusammenfassend betrachtet, bestätigt die eindeutige Dosisabhängigkeit der untersuchten Parameter das Vorhandensein von Emphysemen unterschiedlicher Ausprägung, die einen weiten Bereich struktureller Umbauvorgänge von eher mildem bis zu erheblichem Schweregrad umfassten.

#### **4.4 Emphysembewertung mittels fpVCT**

Eine exakte, diagnostisch relevante Beurteilung tierexperimentell erzeugter Lungenemphyseme kann bis dato lediglich – wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben – durch ex-vivo-Verfahren erreicht werden. Langzeitstudien und therapeutisches “drug monitoring“ im Rahmen der Überwachung neuer Therapieansätze erfordern dabei den Einsatz einer hohen Zahl von Versuchstieren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet werden müssen. Dadurch werden solche Untersuchungen – zusätzlich zu den Tierschutz betreffenden ethischen Erwägungen – zu einem kosten- und zeitaufwändigen Unterfangen. Hier würde die Verfügbarkeit eines validierten, in vivo und in Längsschnittuntersuchungen auch mehrfach anwendbaren, bildgebenden Verfahrens das experimentelle Vorgehen maßgeblich erleichtern.

Um eine Aussage über die diagnostische Zuverlässigkeit der fpVCT treffen zu können, wurden in dieser Studie die radiologisch erhobenen Daten mit etablierten histologisch-biomechanischen Methoden korreliert. Um eine möglichst gute Bildqualität mit einer komplett entfalteten Lunge zu erhalten, wurden zwei Aufnahmetypen getestet. Ziel dabei war es, zu evaluieren, ob eine davon eine möglichst gute Bildqualität mit einer komplett entfalteten Lunge ermöglichte. Beide Aufnahmen erfolgten unter Intubation und mechanischer Beatmung. Dabei wurde die erste Aufnahme bei maximaler Inspiration in Apnoe erstellt. Bei der zweiten Aufnahme wurde zusätzlich eine Klemme am Tubus befestigt, um ein Entweichen von Luft zu vermeiden.

##### **4.4.1 Blickdiagnostik bei Betrachtung der fpVCT-Aufnahmen**

Bei der Präparation der Lungen für die ex-vivo-Untersuchungen fiel ein deutlicher Größenunterschied der Organe zwischen den Elastase-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe auf. Dieser zeigte sich ebenfalls in den segmentierten Lungen der 3D-rekonstruierten fpVCT-Aufnahmen (Abb. 3). Ein eindeutiger Unterschied war allerdings nur zwischen Kontroll- und Hochdosisgruppe sichtbar, während eine Diskriminierung der unterschiedlichen Elastasedosis-Gruppen per Blickdiagnose nicht möglich war. Eine ebenso

schnelle und trotzdem exaktere Methode ist die Beurteilung der Dichte. Im histologischen Präparat lässt sich leicht erkennen, ob es sich in dem vorliegenden Präparat um eine emphysematisch veränderte oder eine gesunde Lunge handelt (Abb. 6 und 7). Auch anhand der dichteabhängigen Farbkodierung der fpVCT-Aufnahmen gelingt eine schnelle Blickdiagnostik: Eine zunehmende Dichte des untersuchten Gewebes wird durch eine stärkere Gelbfärbung der Lungen in der 3D-Darstellung anschaulich gemacht. Dieses Erkenntnis könnte man sich zukünftig vor allem dann zunutze machen, wenn schnelle Aussagen über die Gewebsbeschaffenheit der Lungen getroffen werden sollen. Dies wäre beispielsweise dann hilfreich, wenn die Emphyseminduktion überwacht werden soll, um mögliche, schwerwiegende Dichte- und Größenabweichungen zeitnah als Ausreißer erkennen zu können.

#### 4.4.2 Dichtekorrelation

Die Dichtewerte können jedoch nicht nur zu einer qualitativen Blickdiagnostik benutzt werden, sondern auch zu einer exakten quantitativen Bewertung des Schweregrads. Der oben beschriebene, rein optische Dichtevergleich ist ungenau und kann lediglich einer einleitenden Orientierung dienen. Die bis dato genaueste, aber auch aufwändigste Methode zur Quantifizierung der Dichte emphysematisch veränderter Lungen ist, wie bereits erwähnt, die mikroskopische Bestimmung des mittleren Alveolarseptenabstands. Im Rahmen dieser Studie sollte geprüft werden, wie genau die Lungengewebisdichte mit der fpVCT bestimmt werden kann und ob die so ermittelten Werte mit denjenigen aus der histologischen Analyse korrelieren. Die Lungendichte, als Röntgenabschwächung ausgedrückt in Hounsfield-Einheiten, nahm mit ansteigender Elastasedosis ab. Dabei zeigte sich eine lineare inverse Korrelation mit dem mittleren Alveolarseptenabstand, die für beide Aufnahmeformen statistisch signifikant war. Die Aufnahmen ohne Klemme führten zu einer deutlich geringeren Streuung und die daraus ermittelten Dichtewerte weisen ein höheres Bestimmtheitsmaß auf als diejenigen aus Aufnahmen mit Klemme. Dies ist vermutlich auf den höheren Blähungszustand der Lungen in den Aufnahmen mit Klemme zurückzuführen. Da das Gerät nicht selektiv das Lungengewebe erkennt, sondern einen Mittelwert aus Luft und Gewebe errechnet, nähern sich die Werte der Aufnahmen mit Klemme stärker dem Wert der ursprünglichen Hounsfield-Skala für Luft (-1000) an (Abb. 4). Bei beiden Aufnahmeformen fällt außerdem eine vergleichbar geringe Dichtedifferenz zwischen 1/3 - und Hochdosisgruppe auf. In den Aufnahmen mit Klemme resultierte hier sogar eine numerische Dichteabnahme.

Eine mögliche Ursache könnten die mit der zunehmenden Dichteminderung einhergehenden vergrößerten Alveolarabstände sein. Lag der Alveolardurchmesser der mit weniger oder ohne Elastase behandelten Lungen unter dem Auflösungsvermögen der fpVCT, so näherte sich das Gewebe der Hochdosisgruppe dem Auflösungsvermögen des Gerätes an. Durch die damit verbundene, vorgetäuschte Oberflächenverkleinerung kommt es zu einer Reduktion der Partialvolumeneffekte (Peitgen et al. 2006) und somit zu einer exakteren Dichtebestimmung. Diese deutlichere Trennung von Luft und Gewebe aufgrund einer verbesserten Auflösung bewirkt in der Hochdosisgruppe bei beiden Aufnahmeformen annähernd identische Ergebnisse (- 839,3 vs -838,9 Hu).

Zusammenfassend betrachtet ermöglicht die fpVCT eine verlässliche in-vivo-Beurteilung von Dichteunterschieden zwischen einzelnen Gruppen emphysematisch veränderter Lungen.

#### **4.4.3 Volumenkorrelation**

Eines der klinischen Hauptmerkmale des Lungenemphysems ist die zunehmende Überblähung der Lungen. Die Luft kann aufgrund des fortschreitenden Elastizitätsverlustes nicht mehr hinreichend entweichen und es kommt zu einer Zunahme des Lungenvolumens. Dieses ist umso höher, je stärker die Emphysemausprägung ist. In dieser Studie zeigte sich die positive Abhängigkeit der Lungenvolumina von der applizierten Elastasemenge sowohl ex vivo als auch in der fpVCT-Untersuchung (Abb. 12 und 5). Bei den computertomographisch ermittelten Volumina ergaben sich jedoch mehr als doppelt so hohe Werte wie in den ex-vivo-Untersuchungen. Dieser Unterschied ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Lunge in vivo im geschlossenen Brustkorb durch den Unterdruck im Pleuraspalt in einem gedehnten Zustand gehalten wird. Bei Eröffnung des Brustkorbes kommt es unmittelbar zu einem Kollaps, so dass die entnommene Lunge ein deutlich geringeres Volumen aufweist. Dies gilt offenbar auch dann, wenn die Volumenbestimmung unter Blähung der Lunge durch Luftinsufflation auf einen definierten Druck (12,5 cm H<sub>2</sub>O) erfolgt. Der Kollaps der Lunge bei Eröffnung des Pleuraspaltes war in den Mäusen der Kontrollgruppe aufgrund ihrer erhaltenen Elastizität sichtbar ausgeprägter als in den Tieren der verschiedenen Elastasegruppen, deren Lungen aufgrund der Zerstörung elastischer Fasern eine weit geringere Retraktionskraft aufwiesen. Dies ist auch die wahrscheinlichste Ursache dafür, dass das ex vivo bestimmte Lungenvolumen in der mit der höchsten Elastasedosis behandelten Gruppe im Schnitt das Dreifache des Lungenvolumens in der Kontrollgruppe

betrug, während dieser Wert bei der in-vivo-Bestimmung lediglich etwa das Doppelte betrug. Ex vivo wird das Lungenvolumen in der Kontrollgruppe, verglichen mit den Elastasegruppen, systematisch unterschätzt und die Werte aus der in-vivo-Bestimmung mittels Bildgebung spiegeln die tatsächlichen Verhältnisse demnach genauer wieder.

#### **4.4.4 Bewertung der Aufnahmeformen**

Zur Erzeugung einer bestmöglichen Bildqualität wurden die Aufnahmen auf zwei Arten durchgeführt: mit und ohne Klemme. Zusammenfassend betrachtet sind die Aufnahmen ohne am Tubus angebrachter Klemme den Aufnahmen mit Klemme vorzuziehen. Vor allem bei der Beurteilung der Dichte ergab die Aufnahmeform ohne Klemme eine deutlich geringere Streuung der Werte, sowie ein höheres Bestimmtheitsmaß in der Korrelation. Bei der Ermittlung der Volumina kam es bei den Aufnahmen mit Klemme zu einer unerwarteten Volumenabnahme in der Hochdosisgruppe. Der Grund hierfür ist – wie bereits weiter oben beschrieben - am ehesten in einer blähungsbedingten Annäherung der Alveolarabstände an das Auflösungsvermögen des Gerätes zu suchen. Neben den statistischen Faktoren spricht auch die ungleich höhere Sterberate der Tiere nach den Aufnahmen mit Klemme für eine Bevorzugung der Aufnahmen ohne Klemme.

#### **4.5 Bedeutung der fpVCT für die präklinische Emphysem diagnostik**

Die im Rahmen der Emphysemforschung durchgeführten präklinischen Studien dienen sowohl der Suche nach bislang unbekanntem, an der Krankheitsentstehung beteiligten Pathomechanismen, als auch der Entwicklung neuer Therapieansätze. In umfangreichen Versuchsreihen an Kleintieren wird die Wirkung verschiedener Medikamente auf emphysematisch veränderte Lungen untersucht (Fortin et al. 2009, Kinoshita et al. 2007). Zuverlässige Aussagen über den kurativen Nutzen dieser Medikamente können jedoch nur bei Vorliegen geeigneter diagnostischer Methoden zur Verlaufskontrolle getroffen werden. Da die pathogenetischen Merkmale der Erkrankung überwiegend auf strukturellen Veränderungen basieren, können bildgebende Verfahren nützliche Instrumente zur nichtinvasiven Emphysembeurteilung lebender Tiere darstellen. Die fpVCT hat sich im Rahmen der hier vorgestellten Studie im direkten Vergleich zu etablierten, invasiven Standardverfahren als verlässliche Methode zur in-vivo-Emphysembeurteilung herausgestellt. In einer kürzlich durchgeführten Studie untersuchten in unserer Arbeitsgruppe Lühje et al.

den Einfluss einer pharmakologischen Blockade des Angiotensin II-Rezeptors Typ 1 (AT1) auf die pulmonalen und systemischen Manifestationen des Elastase-induzierten Lungenemphysems der Maus (Lüthje et al. 2009 a). Hierbei wiesen Mäuse, die nach erfolgter Emphysem-Induktion für 8 Wochen mit dem AT1-Antagonisten Irbesartan behandelt wurden, ein strukturell wie funktionell geringer ausgeprägtes Lungenemphysem auf als Vergleichstiere, die nach der Emphysem-Induktion mit Placebo behandelt wurden. Elastase-behandelte Mäuse hatten - verglichen mit Kontrollmäusen ohne Lungenemphysem - bei Laufbanduntersuchungen anfangs eine deutlich reduzierte Belastungstoleranz. Diese blieb in Placebo-behandelten Mäusen im Verlauf der folgenden 8 Wochen eingeschränkt, während sie sich in den Irbesartan-behandelten Mäusen teilweise wieder erholte. Zum Zeitpunkt dieser Studie war noch kein validiertes bildgebendes Verfahren verfügbar, das eine Untersuchung der Mauslungen in vivo im Längsverlauf zugelassen hätte. Daher blieb bislang die wesentliche Frage offen, ob das Lungenemphysem, das nach Abschluss der Elastasebehandlung in allen Mäusen vergleichbar ausgeprägt sein sollte, in den Placebo-behandelten Mäusen in den folgenden 8 Wochen an Schwere zunahm, oder ob es in den Irbesartan-Mäusen zu einer Rückbildung zuvor bereits ausgebildeter emphysematischer Veränderungen kam. Zukünftig kann mit der in der vorliegenden Arbeit validierten Methode der fpVCT eine solche Fragestellung durch im Verlauf mehrfach durchgeführte bildgebende Untersuchungen der Mäuse adressiert werden.

In der Kleintierbildgebung spielt neben dem hier vorgestellten System vor allem das Micro-CT eine große Rolle (Froese et al. 2007, Paulus et al. 2000). Dieses unterscheidet sich in vielfältiger Weise von der fpVCT. Zum einen sind die Scanzeiten der fpVCT mit 2 bis 8 Sekunden deutlich kürzer als die der Micro-CT-Systeme, welche zwischen 5 und 30 Minuten liegen. Der Einsatz einer kontrollierten Atmung mit kurzfristiger Apnoe während der Aufnahmezeit, wie in unserer Studie zur Verbesserung der Bildqualität durchgeführt, ist hier nicht möglich. Ein weiterer, wesentlicher Unterschied ist das bis auf wenige Zentimeter stark eingeschränkte "Field of View" des Micro-CTs. Ferner ist durch die im Vergleich zur fpVCT extrem hohen Strahlendosen eine Beeinflussung wichtiger biologischer Vorgänge wie zum Beispiel spezieller Immunantworten oder die Entstehung struktureller Veränderungen wie fibrotische Umbauten nicht auszuschließen, welche zu einer Verfälschung der Studiendaten führen könnten (Boone et al. 2004, Ritman 2005). Das Problem der Strahlenbelastung ist vor allem in Längsschnitt-Untersuchungen von Bedeutung, in denen wiederholte Aufnahmen erforderlich sind.

Ein wesentlicher Vorteil des Micro-CTs gegenüber dem hier vorgestellten Gerät ist seine bis zu 20fach höhere Auflösung. Diese kann jedoch nur unter der Inkaufnahme von maximalen Scanzeiten und damit verbundenen extrem hohen Strahlendosen erreicht werden. Vergleicht man beide Geräte hinsichtlich der Belastung der Tiere durch Strahlendosis und Narkosedauer, fällt das Micro CT als invasiveres Verfahren auf. In ihrer 2005 durchgeführten Studie gelang Postnov et al. die in-vivo-Detektion von Dichteunterschieden in ebenfalls elastaseinduzierten Lungenemphysemen mittels Micro-CT. Aufgrund einer fehlenden Korrelation mit zusätzlichen anerkannten Methoden, ist eine verbindliche Aussage über die Sensitivität des Gerätes für die Emphysembewertung jedoch schwer zu treffen. Die hier vorliegende Studie lässt neben deutlichen Dichteunterschieden auch Volumenzunahmen der erkrankten Lungen erkennen. Die gute Korrelation mit validierten Vergleichsmethoden verweist auf eine zutreffende Beurteilung der Emphysemlungen durch die fpVCT. Zusammenfassend betrachtet kann die fpVCT als effizientes Mittel für die Verlaufsbeurteilung von medikamentösen Langzeitstudien in der Emphysemforschung herangezogen werden. Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass aufgrund der unzureichenden Auflösung und den daraus entstehenden Partialvolumeneffekten lediglich relative Dichte- und Volumenangaben gemacht werden können.

#### **4.6. Bedeutung der fpVCT für die klinische Forschung**

Die klinische Anwendung der fpVCT ist, bis dato, aufgrund verschiedener Faktoren nicht möglich. Zum einen sind die für die Anwendung am Menschen erforderlichen Strahlendosen zu hoch. Auch die Scanzeiten sind für eine zufriedenstellende Ortsauflösung von ausgedehnten Weichteilgeweben wie der Lunge aufgrund der umfangreichen Datenmengen zu lang (Gupta et al. 2006, Kiessling et al. 2004). Ein weiteres Ausschlusskriterium ist die bislang fehlende Variabilität der Einblendung des Röntgenstrahles (Valencia et al. 2006). Bis es zu einem klinischen Einsatz der fpVCT in der Emphysemdiagnostik kommen kann, sind entsprechende Weiterentwicklungen, beispielsweise in der Halbleitertechnik, nötig (Kiessling et al. 2004). Vielversprechender hinsichtlich einer möglichen klinischen Anwendung erscheint dagegen der Einsatz der fpVCT in der Durchleuchtung kleinster Strukturen wie dem Felsenbein (Bartling et al. 2006, Gupta et al. 2004), der Zähne (Hannig et al. 2005 und 2006) oder kleiner Malignomherde in der Lunge (Greschus et al 2007, Savai et al. 2005) und der Brustdrüse (Missbach-Guenther et al. 2008).

## **4.7 Studienlimitierungen und Ausblicke**

Die hier vorgestellte Studie lässt sich in 3 Teilaspekte gliedern: Die Emphyseinduktion, die histologische Untersuchung der Lungen und ihre Auswertung sowie die Durchführung der fpVCT-Aufnahmen und ihre Auswertung. Im Folgenden sollen die jeweils auf die einzelnen Unterpunkte bezogenen Limitierungen und Fehlerquellen der vorliegenden Studie erläutert werden. Außerdem sollen in diesem Rahmen Verbesserungsmöglichkeiten aufgezeigt und Ausblicke auf zukünftige Anwendungsmöglichkeiten der hier beschriebenen Methoden gegeben werden.

### **4.7.1 Die Emphyseinduktion**

Wie bereits erwähnt, stellt die intratracheale Applikation von Elastase die gebräuchlichste Form der Emphyseinduktion am Maus-Modell dar. Die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen Emphyseinduktionen mittels Elastase beinhalten die gleichen Arbeitsschritte wie die hier angewendeten. Dazu gehören die Induktionsanästhesie, die Intubation und Beatmung mit Aufrechterhaltung der Anästhesie, die Elastaseapplikation sowie die Nachbeatmung und Extubation. Um eine gleichmäßige Emphyseausprägung zu erhalten, wurden die Tiere in unserem Versuchsaufbau noch vor der Narkoseausleitung für jeweils 2 Minuten auf jeder Seite gelagert. Der gesamte Prozess der Elastasebehandlung beträgt in etwa 20 bis 25 Minuten pro Tier, solange sie von einem erfahrenen Behandler durchgeführt wird. Je geübter die Personen sind, die die Applikation durchführen, desto gleichmäßiger die Emphyseausprägung und desto geringer die Sterberate. Um die Letalität insgesamt so niedrig wie möglich zu halten, sollte die für die Hochdosisgruppe verwendete maximale Elastasekonzentration von 1,2 U/100g Körpergewicht Pankreaselastase vom Schwein nicht überschritten werden.

### **4.7.2 Die histologische Aufarbeitung und ihre Auswertung**

Auch die hier angewandte Form der histologischen Aufarbeitung und die nachfolgende Auswertung folgten einem anerkannten und mehrfach in der Literatur vorbeschriebenen Schema (Robbesom et al. 2003, Vlahovic et al. 1999). Das Ausmaß und die Verteilung des Emphysems sollen mit diesem Verfahren beurteilt werden. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass teilfibrotische Umbauten von Lungengewebe durch das Mitzählen der in diesen Bereichen stark vermehrten Interalveolarsepten zu statistischen Verzerrungen führen können



(Hsia et al. 2009). Zur Vermeidung dieser möglichen Fehlerquelle sollte das Platzieren der Linien unter manueller Kontrolle erfolgen, um die Zählung möglichst auf die eigentlichen Alveolarsepten zu beschränken. Unter der Annahme, dass nur durch Anwendung von Untersuchungsmethoden, die auf der Theorie der Stereologie (die räumliche Interpretation von Schnitten) beruhen, unverfälschte Ergebnisse akquiriert werden können, raten manche Autoren sogar dazu, die Methode der Bestimmung des mittleren Alveolarabstandes zu verlassen (Weibel et al. 2007). Begründet wird dieses mit Fehlerquellen, die dadurch entstehen, dass die eigentlich dreidimensional zu betrachtenden histologischen Proben in zweidimensionaler Form ausgewertet werden. Außerdem sind die Untersuchungsergebnisse stark von vorangehenden Verarbeitungsprozessen wie der Fixation und dem Schneiden der Proben abhängig. Das Gewebe kann sich während der Einbettung verziehen und atelektatische Bezirke können bereits während der Präparation zusammenfallen und irreversibel verkleben

Auch Langzeitstudien, in denen wiederholte Therapiekontrollen stattfinden können, sind mit diesem Verfahren nicht möglich. Ein weiterer Nachteil dieser und aller ex vivo durchgeführten Arbeitsschritte ist die lückenhafte Verblindung. Während der Verarbeitung und Auswertung der Proben ist eine Zuordnung zur Emphysem- oder Kontrollgruppe anhand der Lungengröße möglich. Durch subjektive Erwartungen könnten unter Umständen die Studienergebnisse in eine bestimmte Richtung gelenkt werden. Innerhalb der verschiedenen Emphysemgruppen sind die Größenunterschiede weniger ausgeprägt, so dass eine Gruppenzuordnung hier nicht gelingt.

#### **4.7.3 Die fpVCT-Aufnahmen**

Die fpVCT ermöglicht eine effiziente in-vivo-Beurteilung emphysematisch veränderter Mäuselungen. Die Durchführung medikamentöser Langzeitstudien könnte gelingen, ohne dass große Gruppen von Tieren zur Gewinnung von histologischen Proben getötet werden müssten. Dabei müssen jedoch verschiedene Fehlerquellen und Probleme in Betracht gezogen werden: Aufgrund der ungenügenden Geräteauflösung können lediglich relative Dichte- und Volumenangaben gemacht werden. Die alleinige Bestimmung von Röntgenabschwächung und Volumen reicht außerdem für eine dem heterogenen Krankheitsbild gerecht werdende Studie nicht aus. Aus in klinischen Studien erhobenen CT-Daten kann das Emphysem in eine vor allem die Luftwege betreffende, eine emphysemdominante und eine gemischte Form eingeteilt werden (Boschetto et al. 2003). Auch den 1966 von Burrows et al. beschriebenen

BMI-abhängigen Phänotypen lässt sich ein pathomorphologisches Korrelat zuordnen, welches computertomographisch detektiert werden kann. Während ein niedriger BMI eher mit emphysematischen Gewebsveränderungen assoziiert ist, findet man bei Patienten mit einem hohen BMI eher entzündliche Wandverdickungen (Ogawa et al. 2009, Pistolesi 2009). In klinischen Studien können computertomographische Messungen von Verdickungen der Atemwegswände Auskunft über den vorherrschenden Phenotyp geben (Orlandi et al. 2005, Yasutaka et al. 2004). Die Limitierung der hier beschriebenen Studie liegt in der fehlenden Berücksichtigung der verschiedenen Emphyseausprägungen. Es wurden lediglich Aussagen über den Schweregrad von elastase-induzierten Lungenemphysemen anhand von Dichte- und Volumenmessungen gemacht. Die inflammatorische Komponente wurde dagegen außer Betracht gelassen. Für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien ist die Quantifizierung der Entzündungsreaktion von großem Wert (Coxson 2008). So könnten in etwaigen Folgestudien fpVCT-gestützte Messungen der Dicke der Atemwegswände vorgenommen werden und diese im Verlauf von Langzeitstudien zur Verlaufsbeurteilung und Therapieüberprüfung herangezogen werden. Hinsichtlich der Praktikabilität solcher Folgestudien müssen allerdings die hohen Kosten für die Anschaffung eines solchen Gerätes von etwa 2,5 Millionen US \$ bedacht werden. Eine Arbeitsgruppe, die tierexperimentelle Lungenforschung betreibt, wird in der Regel keinen Zugang zu einem Gerät, wie dem hier beschriebenen haben. Ersatzweise könnten konventionelle klinische CT-Geräte der neuesten Generation eingesetzt werden, welche jedoch eine zwei bis dreifach geringere Auflösung als das fpVCT aufweisen.

Ebenso wie bei den ex-vivo-Verfahren kommt es auch bei den Auswertungen der fpVCT-Aufnahmen zu Verblindungslücken. Diese sind jedoch, solange auf die dichteabhängige Farbkodierung verzichtet wird, bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei Ersteren. So kann der geübte Untersucher an der Workstation anhand der Größe der Lunge und der Stellung der Rippen (je horizontaler, desto überblähter die Lunge) eine Gruppenzuordnung vornehmen. Diese ist jedoch lediglich bei sehr stark emphysematisch veränderten Lungen eindeutig. Innerhalb der verschiedenen Emphysemgruppen und auch bei den Kontrollgruppen ist eine Zuordnung schwierig.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Studie war die Erzeugung von Emphysemen unterschiedlichen Schweregrades im Mausmodell und deren anschließende Beurteilung mittels Flächendetektor-basierter Volumen-Computertomographie (fpVCT). Als Vergleichswerte dienten histologisch und biomechanisch erhobene Daten zu Dichte, Volumen und statischer Compliance der einzelnen Lungen. Die Emphyseminduktion gelang durch intratracheale Instillation von unterschiedlich hoch dosierter Pankreaselastase vom Schwein (Hochdosisgruppe: 1,2 U/100g Körpergewicht). Zu Beginn der Studie wurden 32 weibliche NMRI-Mäuse zufällig einer von vier Gruppen (Kontrollgruppe, 1/3-Dosis-Gruppe, 2/3-Dosis-Gruppe, Hochdosisgruppe) zugeteilt. Der Behandlungszeitraum erstreckte sich über 4 Wochen, in denen den Elastase-Mäusen fünfmal die jeweilige Dosis Pankreaselastase verabreicht wurde, während die Mäuse der Kontrollgruppe fünfmal mit reiner, Phosphat-gepufferter Salzlösung behandelt wurden. Für jede Behandlungseinheit mussten die Tiere zunächst mittels Isofluran anästhesiert und dann intubiert und beatmet werden, bevor die Elastase-Instillation über den Tubus erfolgen konnte. Nach einem behandlungsfreien Zeitraum von einer Woche wurden von allen Mäusen Flächendetektor-basierte Volumen-computertomographische Aufnahmen des Thorax angefertigt. Dies geschah ebenfalls unter Intubation und Beatmung, wobei eine Aufnahme mit einer am Tubus angebrachten Klemme und eine Aufnahme ohne Klemme (in Expiration) erfolgte. Die rekonstruierten Datensätze wurden anschließend mit Hilfe eines digitalen Bildbearbeitungsprogrammes so segmentiert, dass lediglich das Lungenparenchym ohne knöchernen Thorax oder mediastinale Organe übrig blieb. Anhand dieser Daten wurde die Röntgenabschwächung des Gewebes, welche als Dichteäquivalent gelten soll, und das Volumen der Lungen berechnet. Wenige Tage nach den CT-Aufnahmen wurden die Tiere getötet. Die heraus-präparierten, noch vollständig entfalteten Lungen wurden zur ex-vivo-Volumenbestimmung in ein auf einer Waage stehendes Becherglas getaucht. Anschließend wurde durch Messung der entweichenden Luft die statische Compliance berechnet. Als letzter Schritt erfolgte die histologische Aufarbeitung des Gewebes mit nachfolgender Bestimmung des *mean linear intercept (Lm)* als histopathologisches Dichtekorrelat.

Bei gemeinsamer Betrachtung aller für die Studie ermittelten Parameter zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Ergebnisse von der applizierten Elastasedosis. Während sich für die Lungenvolumina eine positive Abhängigkeit zum Schweregrad des Emphysems ergab,

wies die Dichte ein reziprokes Verhalten auf. Die zu erwartenden Dichteabnahmen konnten in der histologischen Bestimmung der mittleren Alveolarseptenabstände und durch die Messung der elastischen Rückstellkräfte bestätigt werden. Das Studienziel, Emphyseme unterschiedlicher Schweregrade zu erzeugen, wurde somit erreicht.

Hinsichtlich Aussagekraft und Effizienz der Beurteilung von emphysematisch veränderten Mäuselungen durch Flächendetektor-basierte Volumen-Computertomographie soll zunächst die klare Bevorzugung der Aufnahmeform ohne am Tubus angebrachte Klemme (in Expiration) herausgestellt werden. Diese wiesen eine insgesamt geringere Streuung der Messwerte auf und korrelierten hoch signifikant mit den histopathologisch ermittelten Daten. Zusammenfassend betrachtet, hat sich die fpVCT im Rahmen der hier vorgestellten Studie im direkten Vergleich zu etablierten, invasiven Standardverfahren als verlässliche Methode zur in-vivo-Emphysebeurteilung herausgestellt. Dringend benötigte, präklinische Langzeitstudien könnten mit Hilfe des hier vorgestellten Verfahrens ermöglicht werden. Die Limitierungen der Studie sind vor allem in der ungenügenden Geräteauflösung zu sehen, wodurch lediglich relative Dichte- und Volumenangaben gemacht werden können. Ferner wurden lediglich Volumen und Dichte der Lungen bestimmt, was dem heterogenen Krankheitsbild nur teilweise gerecht wird. Zur Mitbeurteilung der inflammatorischen Komponente könnte daher in Folgestudien eine zusätzliche Messung der Dicke der Atemwegswände erfolgen.

## 6. ANHANG

### 6.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A/D	Analog-Digital-Wandler
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AG	Arbeitsgemeinschaft
BMI	Body-Mass-Index
C	Compliance
Cm	Zentimeter
Cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CO	Kohlenmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Computertomographie
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
FEV <sub>1</sub>	Einsekunden-Kapazität
FOV	Bildausschnitt, field of view
fpVCT	Flächendetektor-basierte Volumen-Computertomographie
FVC	Forcierte Vitalkapazität
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hounsfield-Einheiten
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRCT	Hochauflösende Computertomographie

---

HU .....	Hounsfield-Einheiten
kg .....	Kilogramm
KV .....	Kilovolt
KW .....	Kilowatt
l .....	Liter .
Lm .....	Mittlerer Alveolarabstand
$\mu\text{m}$ .....	Mikrometer
$\mu\text{l}$ .....	Mikroliter
mA .....	Milliampere
mAS.....	Milli-Amperesekunde
mg .....	Milligramm
mGy.....	Milli-Gray
ml .....	Milliliter
mm .....	Millimeter
MRT .....	Kernspintomographie
MSCT .....	Mehrschicht-Computertomographie
MTF .....	Modulationsübertragungsfunktion
NMRI.....	Naval Medical Research Institute
O <sub>2</sub> .....	Sauerstoff
P .....	Druck
PBS .....	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCO <sub>2</sub> .....	Kohlendioxidpartialdruck
PET .....	Positronen-Emissions-Tomographie
PO <sub>2</sub> .....	Sauerstoffpartialdruck
p-Wert .....	Wahrscheinlichkeitswert
r <sup>2</sup> .....	Bestimmtheitsmaß
s.....	Sekunde

---

SEM .....	Standardfehler der Mittelwerte
T .....	Spannung
$\tau$ .....	Konstante Tau in der Recoil-Messung
U.....	Unit
V .....	Volumen
VCT .....	Volumen-Computertomographie
VEGF .....	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO.....	Weltgesundheitsorganisation

## 6.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	fpVCT Prototyp.....	12
Abbildung 2:	Histogramm zur Ermittlung der mittleren Röntgenabschwächung am Beispiel einer Hochdosis-Maus .....	16
Abbildung 3:	Größenvergleich Emphysem und Kontrolllunge.....	25
Abbildung 4:	Abhängigkeit der Röntgenabschwächung von der applizierten Elastasedosis.....	26
Abbildung 5:	Mittlere Lungenvolumina in Abhängigkeit von der applizierten Elastasedosis.....	28
Abbildung 6:	Histologie Lunge Kontrollmaus .....	31
Abbildung 7:	Histologie Lunge Emphysemmaus.....	31
Abbildung 8:	Mittlerer Alveolarseptenabstand in Abhängigkeit von der applizierten Elastasedosis.....	32
Abbildung 9:	Statische Compliance .....	33
Abbildung 10:	Statische Compliance in Abhängigkeit von der Elastasedosis .....	34
Abbildung 11:	Abhängigkeit der elastischen Retraktionszeit von der Elastasedosis .....	35
Abbildung 12:	Abhängigkeit der Lungenvolumina von der Elastasedosis.....	36
Abbildung 13:	Korrelation der mittleren Alveolarseptenabstände mit den im fpVCT ermittelten Hounsfield-Einheiten für die Aufnahmen ohne Klemme .....	37
Abbildung 14:	Korrelation der mittleren Alveolarseptenabstände mit den im fpVCT ermittelten Hounsfield-Einheiten für die Aufnahmen mit Klemme .....	38



---

Abbildung 15:	Korrelation Lungenvolumen ohne Klemme .....	39
Abbildung 16:	Korrelation Lungenvolumen mit Klemme .....	40

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- ANDREAS S, HERMANN-LINGEN C, RAUPACH T, LÜTHJE L, FABRICIUS JA, HRUSKA N, KOERBER W, BUECHNER B, CRIÈÈ CP, HASENFUSS G, CALVERLEY P (2006): Angiotensin II blockers in obstructive pulmonary disease: a randomized controlled trial  
*Eur Respir J* 27, 972-979
- ANDREAS S, BATRA A, BEHR J, BERCK H, CHENOT JF, GILISSEN A, HERING T, HERTH F, MEIERJUERGEN R, MUEHLIG S (2008): Guidelines for smoking cessation in Patients with COPD issued by the Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin.  
*Pneumologie* 62, 255-272
- ANTHONISEN NR, CONNETT JE, MURRAY RP (2002): Smoking and Lung Function of Lung Health Study Participants after 11 years  
*Am J Respir Crit Care Med* 166, 675-679
- BARTLING SH, GUPTA R, TORKOS A, DULLIN C, GRABBE E, LERNARY T, BECKER H, STOEVER T (2006): Flat-Panel Volume Computed Tomography for Cochlear Implant Electrode Array Examination in Isolated Temporal Bone Specimen  
*Otol Neurotol* 27, 491-498
- BOONE JM, VELASQUES O, CHERRY SR (2004): Small-animal X-ray dose from micro-CT  
*Mol Imaging* 3, 149-58
- BOSCHETTO P, MINIATI M, MIOTTO D, BRACCIONI F, DE ROSA E; BONONI I, PAPI A, SAETTAZ M, FABBRI LM, MAPP CE (2003): Predominant emphysema phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients  
*Eur Respir J* 21, 450-453
- BUIST AS, MCBURNIE MA, VOLLMER WM, GILLESPIE S, BURNEY P, MANNINO DM, MENEZES AM, SULLIVAN SD, LEE TA, WEISS KB (2007): International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study  
*Lancet* 370, 741-750
- BURROWS B, FLETCHER CM, HERAD BE, JONES NL, WOOTLIFF JS (1966): The emphysematous and bronchial types of chronic airway obstruction. A clinicopathological study of patients in London and Chicago  
*Lancet* 287, 830-835
- CALVERLEY PMA, WALKER P (2003): Chronic obstructive pulmonary disease  
*Lancet* 362, 1053-1061
- CAMPBELL EJ (2000): Animal models of emphysema: the next generations  
*J Clin Invest* 106 1445-14

- CARP H, MILLER F, HOIDAL JR, JANOFF A (1982): Potential mechanism of emphysema:  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity  
Proc Natl Acad Sci USA 79, 2041-2045
- COXSON HO (2008): Quantitative Computed Tomography Assessment of Airway Wall Dimensions  
Proc Am Thorac Soc 5, 940-945
- CROXTON TL, WEINMANN GG SENIOR RM, HOIDAL JR (2002): Future Research in Chronic Obstructive Pulmonary Disease  
Am J Respir Crit Care Med 165, 838-844
- D'ARMIENTO J, DALAL SS, OKADA Y, BERG RA, CHADA K (1992): Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema  
Cell 71, 955-961
- DE BOER WI, YAO H, RAHMAN I (2007): Future therapeutic treatment of COPD: Struggle between oxidants and cytokines  
Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2, 205-228
- DEMEO DL, HERSH CP, HOFFMANN EA, LITONJUA AA, LAZARUS R, SPARROW D, BENDITT JO, CRINER G, MAKE B, MARTINEZ FJ (2007): Genetic Determinants of Emphysema Distribution in the National Emphysema Treatment Trial  
Am J Respir Crit Care Med 176, 42-48
- DIRKSEN A, DIJKMAN JH, MADSEN F, STOEL B, HUTCHINSON DCS, ULRIK CS, SKOVGAARD LT, KOK-JENSEN A, RUDOLPHUS A, SEERSHOLM N (1999): A Randomized Clinical Trial of  $\alpha_1$ -Antitrypsin Augmentation Therapy  
Am J Respir Crit Care Med 160, 1468-1472
- DUNHILL MS (1962): Quantitative methods in the study of pulmonary pathology  
Thorax 17, 320-328
- FABEL H, KONIETZKO N : Chronische Bronchitis und Lungenemphysem; in: Weißbuch Lunge 2005; Deutsche Lungenstiftung; Deutsche Gesellschaft für Pneumologie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 29-32
- FEHRENBACH H (2006): Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective  
Eur Respir Rev 15, 136-147
- FORTIN M, DÁNJOU A, HIGGINS ME, GOUGEON J, AUBÈ P, MOKTEFI K, MOUISSI S, SÈGUIN S, RENZI P (2009): A multi-target antisense approach against PDE4 and PDE7 reduces smoke-induced lung inflammation in mice  
Respir Res 10, 39
- FROESE AR, ASK K, LABIRIS R, FANCOMBE T, WARBURTON D, INMAN MD, GAULDIE J, KOLB M (2007): Three-dimensional computed tomography imaging in an animal model of emphysema  
Eur Respir J 30, 1082-1089

- GRESCHUS S, KIESSLING F, LICHY MP, MOLL J, MUELLER MM, SAVAI R, ROSE F, RUPPERT C, GUENTHER A, LUECKE M (2005): Potential Applications of Flat-Panel Volumetric CT in Morphologic and Functional Small Animal Imaging. *Neoplasia* 7, 730-740
- GRESCHUS S, SAVAI R, WOLF JC, ROSE F, SEEGER W, FITZGERALD P, TRAUPE H (2007): Non-invasive screening of lung nodules in mice comparing a novel volumetric computed tomography with a clinical multislice CT  
*Oncol Rep* 17, 707-712
- GROSS P, PFITZER EA, TOLKER E, BABYAK MA, KASCHAK M (1965): Experimental emphysema: Its production with papain in normal and silicotic rats  
*Arch Environ Health* 11, 50-58
- GUPTA R, BARTLING SH, BASU SK, ROSS WR, BECKER H, PFOH A, BRADY T, CURTIN HD (2004): Experimental Flat-Panel High-Spatial-Resolution Volume CT of the Temporal Bone  
*Am J Neuroradiol* 25, 1417-1424
- GUPTA R, GRASRUCK M, SUESS C, BARTLING SH, SCHMIDT B, STIERSTORFER K, POPESCU S, BRADY T, FLOHR T (2006): Ultra-high resolution flat-panel volume CT: fundamental principles, design architecture, and system characterization  
*Jur Radiol* 16, 1191-1205
- HANNIG C, DULLIN C, HUELSMANN M, HEIDRICH G (2005): Three-dimensional, non destructive visualization of vertical root fractures using flat panel volume detector computer tomography: an ex vivo in vitro case report  
*Int Endod J* 38, 904-13
- HANNIG C, KRIEGER E, DULLIN C, MERTEN HA, ATTIN T, GRABBE E, HEIDRICH G (2006): Volumetry of human molars with flat panel-based volume CT in vitro  
*Clin Oral Invest* 10, 253-257
- HAUTAMAKI RD, KOBAYASHI DK, SENIO RM, SHAPIRO SD (1997): Macrophage elastase is required for cigarette smoke-induced emphysema in mice.  
*Science* 212, 2002-2004
- HERSH CP, DEMEO DL, SILVERMAN EK (2008): National Emphysema Treatment Trial State of the Art, Genetics of Emphysema  
*Proc Am Thorac Soc* 5, 486-493
- HERSH CP, HANSEL NN, BARNES KC, LOMAS DA, PILLAI SG, COXSON HO, MATHIAS RA, RAFAELS NM, WISE RA, CONNETT JE (2009): Transforming Growth Factor Beta Receptor-3 is associated with Pulmonary Emphysema  
*Am J Respir Cell Mol Biol.* 3, 324-331
- HOGG JC, SENIOR RM (2002): Chronic obstructive pulmonary disease—part 2: pathology and biochemistry of emphysema  
*Thorax* 57, 830–834

- HSIA CC, HYDE D, OCHS M, WEIBEL ER (2009): An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for quantitative assessment of lung structure  
*Am J Respir Crit Care Med* 181, 394-418
- KASAHARA Y, TUDER RM, TARASEVICIENE-STEWART L, LE CRAS TD, ABMAN S, HIRTH PK, WALTENBERGER J, VOELKEL NF (2000): Inhibition of VEGF receptors cause lung cell apoptosis and emphysema  
*J Clin Invest* 106, 1311-1319
- KIESSLING F, GRESCHUS S, LICHY MP, BOCK M, FINK C, VOSSELER S, MOLL J, MUELLER MM, FUSENING NE, TRAUPE H (2004): Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for non-invasive, high resolution monitoring of tumor angiogenesis  
*Nat Med* 10, 1133-1138
- KINOSHITA T, HOSHINO T, IMAOKA H, ICHIKI H, OKAMOTO M, KAWAYAMA T, YODOI J, KATO S, AIZAWA H (2007): Thioredoxin prevents the development and progression of elastase-induced emphysema  
*Biochem Biophys Res Commun* 354, 712-719
- LOPEZ AD, SHIBUYA K, RAO C, MATHERS CD, HANSELL AL, HELD LS (2006): Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections  
*Eur Respir J* 27, 397-412
- LÜTHJE L, KOEGLER H, DUVE HC, RAUPACH T, HASENFUSS G, ANDREAS S (2009 a): Effects of AT1 receptor blockade on pulmonary and systemic manifestations in a COPD/emphysema mouse model  
*Eur Respir J*, 34, 558 (Abstract)
- LÜTHJE L, RAUPACH T, MICHELS H, UNSÖLD B, HASENFUSS G, KOEGLER H, ANDREAS S (2009 b): Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model  
*Respir Res* 10, 7
- LUNDBAECK B, LINDBERG A, LINDSTROEM M, ROENMARK E, JONSSON AC, JOENSSON E, LARSSON LG, ANDERSSON S, SANDSTROEM T, LARSSON K (2003): Not 15 but 50 % of smokers develop COPD? – Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies  
*Respir Med* 97, 115-122
- MACNEE W (2000): Oxidants/Antioxidants and COPD  
*Chest* 117, 303-317
- MANNINO DM, WATT G, HOLE C, GILLIS C, HART C, MC CONNACHIE A, SMITH GD, UPTON M, HAWTHORNE V, SIN DD (2006): The natural history of chronic obstructive pulmonary disease  
*Eur Respir J* 27, 627-643

- MEAD J, TURNER JM, MACKLEM PT, LITTLE JB (1967): Significance of the relationship between lung recoil and maximum expiratory flow  
J Appl Physiol 22, 95-108
- MISSBACH-GUNETHER J, DULLIN C, KIMMINA S, ZIENTKOWSKA M, DOMEYER-MISSBACH M, MALZ C, GRABBE E, STUEHMER W, ALVES F (2008): Morphologic Changes of Mammary Carcinomas in Mice over Time as Monitored by Flat-Panel Detector Volume Computed Tomography  
Neoplasia 10, 663-673
- MURRAY JCL, LOPEZ AD (1997): Alternative projections of mortality and disability by cause 1190-2020: Global Burden of Disease Study  
Lancet 349, 1498-1504
- NIKULA KJ, MARCH TH, SEAGRAVE J, FINCH G, BARR E, MÈNACHE M, HAHAN F, HOBBS C (2000): A Mouse Model of Cigarette Smoke-Induced Emphysema  
Chest 117, 246-247
- OGAWA E, NAKANO Y, OHARA T, MURO S, HIRAI S, SATO S, SAKAI H, TSUKINO M, KINOSE D, NISHIOKA M (2009): Body mass index in male patients with COPD: correlation with low attenuation areas on CT  
Thorax 64, 20-25
- ORLANDI I, MORONI C, CAMICIOTTOLLI G, BARTOLUCCI M, PISTOLOESI M, VILLARI N, MASCALCHI M (2005): Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Thin-Section CT Measurement of Airway Wall Thickness and Lung Attenuation  
Radiology 234, 604-610
- PAULUS MJ, GLEASON SS, KENNEL J, HUNSICKER PR, JOHNSON DK (2000): High Resolution X-ray Computed Tomography: An Emerging Tool for small Animal Cancer Research  
Neoplasia 2, 62-70
- PAUWELS RA, RABE KF (2004): Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)  
Lancet 364, 613-620
- PAUWELS RA, BUIST AS, CALVERLEY PMA, JENKINS CR, HURD SS (2001): Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease; NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD); Workshop Summary  
Am J Respir Crit Care Med 163, 1256-1276
- PEITGEN HO, BORNEMANN L, DICKEN V, KUEMMERLEN B (2006): Messen schafft Wissen, Digitale Technik revolutioniert Diagnostik  
DZKF 7/8, 16-25
- PISTOLESI M (2009): Beyond airflow limitation: another look at COPD  
Thorax 64, 2-4

- POSTNOV AA, MEURRENS K, WEILERS H, VAN DYCK D, XU H, TERPRSTRA P, DE CLERCK NM (2005): In vivo assessment of emphysema in mice by high resolution x-ray microtomography  
*J Microsc* 220, 70-75
- REILLY J (2006): Using Computed Tomographic Scanning to Advance Understanding of Chronic Obstructive Pulmonary Disease  
*Proc Am Thorac Soc* 3, 450-455
- RITMAN EL (2005): Micro-Computed Tomography of the Lungs and Pulmonary-Vascular System  
*Proc Am Thorac Soc* 2, 477-480
- ROBBESOM A, VERSTEEG EMM, VEERKAMP JH, VAN KRIEKEN JM, BULTEN HJ, SMITS HTJ, WILLEMS LNA, VAN HEERWARDEN LA, DEKHUIJZEN R, VAN KUPPEVELT TH (2003): Morphological Quantification of Emphysema in Small Human Lung Specimens: Comparison of Methods and Relation with Clinical Data  
*Mod Pathol* 16, 1-7
- SAETTA M, TURATO G, MAESTRELLI G, MAPP CE, FABBRI LM (2001): Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease  
*Am J Respir Crit Care Med* 163, 1304-1309
- SANDERS C, NATH PH, BAILEY WC (1988): Detection of emphysema with computed tomography. Correlation with pulmonary function tests and chest radiography  
*Invest Radiol* 4, 262-266
- SANDFORD AJ, WEIR TD, PARÈ PD (1997): Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease  
*Eur Respir J* 10, 1380-1391
- SAVAI R, WOLF JC, GRESCHUS S, EUL BG, SCHERMULY RT, HAENZE J, VOSWINCKEL R, LANGHEINRICH AC, GRIMMINGER F, TRAUPE H (2005): Analysis of Tumor Vessel Supply in Lewis Lung Carcinoma in Mice by Fluorescent Microsphere Distribution and Imaging with Micro and Flat-Panel Computed Tomography  
*Am J Pathol* 167, 937-946
- SCANLON PD, CENNETT JE, WALLER LA, ALTOSE MD, BAILEY MC, BUIST AS, TASHKIN DP (2000): Smoking Cessation and lung function in Mild-to-Moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease The Lung Health study  
*Am J Respir Crit Care Med* 161, 381-390
- SHAPIRO SD (2000 a): Animal models for Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Age of Klotho and Marlboro Mice  
*Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 4-7
- SHAPIRO SD (2000 b): Animal models for COPD  
*Chest* 117, 223-227

- SHAPIRO SD (2007): Transgenic and gene-targeted mice as models for chronic obstructive pulmonary disease  
*Eur Respir J* 29, 375-378
- STANESCU D, SANNA A, VERITER C, ROBERT A (1998): Identification of smokers susceptible to development of chronic airflow limitation. A 13-year follow up  
*Chest* 114, 416-425
- SZILASI M, DOLINAY T, NEMES Z, STRAUSZ J (2006): Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease  
*Pathol Oncol Res* 12, 52-60
- TINKELMAN DG, PRICE DB, NORDYKE RJ, HALBERT RJ (2006): COPD screening efforts in primary care: what is the yield?  
*Prim Care Respir J* 16, 41-48
- VALENCIA R, STUERMER EK, DULLIN C, HERMANN KP, KLUEVER I, ZAROBAN A, SEHMISCH S, FUNKE M, KNOLLMANN F (2006): Erste Erfahrungen mit einem Flächendetektor-Volumen-CT (fpVCT) in der experimentellen Osteoporosediagnostik am Kleintiermodell  
*Radiologe* 46, 893-900
- VLAHOVIC G, RUSSEL ML, MERCER RR, CRAPO JD (1999): Cellular and Connective Tissue Changes in Alveolar Septal Walls in Emphysema  
*Am J Respir Crit Care Med* 160, 2086-2092
- WAN ES, SILVERMAN EK (2009): Genetics of COPD an Emphysema  
*Chest* 136, 859-866
- WEIBEL ER, HSIA CC, OCHS M (2007): How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry  
*J Appl Physiol* 102, 459-467
- WHO (2010): COPD: Definition  
<http://www.who.int/respiratory/copd/definition/en/index.html>
- WRIGHT JL, CHURG A (2007): Current Concepts in Mechanisms of Emphysema  
*Toxicol Pathol* 35, 111-115
- YASUTAKA, WONG JC, DE JONG PA, BUZATU L, NAGAO T, COXSON HO, ELLIOTT MW, HOGG JC, PARÈ PD (2004): The Prediction of Small Airway Dimensions Using Computed Tomography  
*Am J Respir Crit Care Med* 171, 142-146
- YUAN R, HOGG JC, PARÈ PD, SIN DD, WONG JC, NAKANO Y, MCWILLIAMS AM, LAM S, COXSON HO (2009): Prediction of the rate of decline in FEV1 in smokers using quantitative computed tomography  
*Thorax* 64, 944-949



## DANKSAGUNG

Ich danke Herrn PD Dr. med. Harald Kögler – seinerzeit *Abteilung Kardiologie und Pneumologie* (Leiter: Prof. Dr. med. Hasenfuß) am *Zentrum Innere Medizin* der *Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen*, jetzt wissenschaftlicher Mitarbeiter in der klinischen Forschung der *Boehringer Ingelheim AG*, Mannheim – für sein stets offenes Ohr und die hilfreichen Anregungen bei der Gestaltung und Korrektur dieser Arbeit. Außerdem danke ich Herrn PD Dr. med. Harald Kögler für die stetige Motivation und seine immer freundliche Art, die er mir während der gesamten Zeit entgegenbrachte.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Stefan Andreas, Chefarzt der *Lungenfachklinik Immenhausen*, für die Bereitschaft, meine Dissertation als habilitierter Betreuer an der *Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen* anzunehmen.

Großer Dank gilt ferner Dipl.-Phys. Christian Dullin aus der *Abteilung diagnostische Radiologie* und Dr. med. Bernhard Unsöld aus der *Abteilung Kardiologie und Pneumologie* des *Universitätsklinikums Göttingen*, die mir -sowohl beim experimentellen Teil, als auch beim Schreiben der Arbeit- eine große Hilfe waren und mir bei Problemen stets zur Seite standen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Lebensgefährten Benjamin Engelke für ihren tatkräftigen Beistand bei Formatierung und Prüfung der Arbeit auf Fehler jeglicher Art danken.

## LEBENS LAUF

Ich wurde am 27. Juli 1979 in Zeven geboren, bin deutsche Staatsangehörige und ledig. Mein Vater, Werner Schmonsees, ist Finanzbeamter und arbeitet im Finanzamt in Zeven. Meine Mutter, Bärbel Schmonsees, ist Hausfrau. Mein Bruder Jörn ist Informatiker und arbeitet in Hamburg. Von 1986 bis 1990 besuchte ich die Grundschule in Heeslingen. Von 1990 bis 1992 ging ich auf die Orientierungsstufe in Zeven. Danach wechselte ich zum St.-Viti-Gymnasium in Zeven, welches ich von 1992 bis 2000 besuchte. Von 1996 bis 1997 nahm ich an einem interkulturellen Austauschjahr in Panama teil, wo ich die spanische Sprache erlernte und viele Eindrücke, die mein Leben noch heute prägen, sammeln konnte. Im Jahr 2000 beendete ich das Gymnasium mit dem Abitur. Anschließend bereiste ich für ein halbes Jahr Mittelamerika, wo ich verschiedene Praktika in Krankenhäusern und Gesundheitszentren mit der Intention, Medizin zu studieren, absolvierte.

2001 begann ich das Studium der Humanmedizin an der *Georg-August-Universität Göttingen*. Während des Studiums engagierte ich mich als Tutorin für ausländische Erasmus-Studenten sowie in der Betreuung von Studenten in Kursen zum Erwerb von Basisfähigkeiten. Um meinen Horizont zu erweitern, entschloss ich mich, einen Teil meines Studiums im Ausland zu absolvieren. So studierte ich nach bestandener Aufnahmeprüfung ein Jahr an der *Universidad de Granada*, um danach mein Studium in Göttingen fortzusetzen. Im Anschluss an die zehn theoretischen Semester widmete ich mich ein Semester lang dem Verfassen meiner Dissertation. Daraufhin begann ich im August 2007 das Praktische Jahr. Das erste Tertial arbeitete ich in der Chirurgie in Duderstadt, nachfolgend in der Neurologie des Diakoniekrankenhauses in Rotenburg an der Wümme, wo ich auch mein letztes Tertial in der Lungenklinik absolvierte. Nach dem praktischen Jahr nahm ich mir ein Semester zur Vorbereitung auf das Examen frei. Im Dezember 2008 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen an der *Georg-August-Universität Göttingen*.

In meiner Freizeit, soweit es die Arbeit zulässt, gehe ich gerne joggen, wandere und lese. Mein besonderes Interesse gilt dem Reisen und kulturellen Veranstaltungen. Für meine berufliche Zukunft interessiert mich neben dem Fach der Neurologie, in dem ich derzeit tätig bin, das Fach der Inneren Medizin, insbesondere die Lungenheilkunde, in welches ich während der Erstellung meiner Dissertation interessante Einblicke bekommen konnte.

