

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
- MEDIZINISCHE FAKULTÄT HOMBURG/SAAR -

Aus der
Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie ,
Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
Prof. Dr. rer. physiol. Carola Meier

*Ein neuer Ansatz zur Intravitalmikroskopie der Lunge –
Intrapulmonale Makrophagen / Bakterien-Interaktion in vivo*

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2012

vorgelegt von Nils T. Veith
geboren am 20.06.1984 in Zweibrücken

Tag der mündlichen Prüfung:

Betreuer: Prof. Dr. med. T. Tschernig

Dekan: Prof. Dr. med. M Menger

Berichterstatter:

Meinen Eltern für Geduld und Vertrauen

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Zusammenfassung</u>	1
2. <u>Summary</u>	3
3. <u>Einleitung</u>	5
3.1. Entzündliche Prozesse in der Lunge durch Partikel und Bakterien.....	5
3.2. Fragestellungen.....	8
4. <u>Material und Methoden</u>	9
4.1. Versuchstiere.....	9
4.2. Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie.....	10
4.2.1. Technischer Geräteaufbau.....	10
4.2.2. Lagerung der Versuchstiere.....	11
4.3. Anästhesie und Präparation.....	12
4.3.1. Anästhesie und Präparation der Lunge.....	12
4.3.2. Applikation der Farbstoffe und Fremdpartikel.....	15
4.4. Fluoreszenzfarbstoffe, Latex-Beads und Bakterien.....	15
4.4.1. Fluoreszein-Isothiozyanat.....	15
4.4.2. Rhodamin 6G.....	15
4.4.3. Latex-Beads.....	16
4.4.4. Bakterien.....	16
4.5. Analyse der Mikrozirkulation.....	17
4.5.1. Arteriöler Gefäßdurchmesser.....	17
4.5.2. Arteriöle Blutzellgeschwindigkeit.....	17
4.5.3. Arteriöler volumetrischer Blutfluss.....	17
4.5.4. Quantifizierung der mittleren Alveolardichte.....	18
4.5.5. Messung des mittleren Alveolarumfanges.....	18
4.5.6. Messung der mittleren Leukozytendichte.....	18
4.6. Blutgasanalyse.....	19
4.7. Analyse der akkumulierten Latex-Beads bzw. Phagozyten.....	19

4.7.1. Quantifizierung	19
4.7.2. Nachweis von Makrophagen / neutrophilen Granulozyten.....	20
4.7.3. Bronchoalveoläre Lavage.....	20
4.8. Quantifizierung Bakterien fressenden Phagozyten	21
4.9. Histologie.....	21
4.9.1. Histologische Präparate.....	21
4.10. Experimentelle Gruppen.....	22
4.11. Experimentelles Protokoll.....	23
4.11.1. Versuchsgruppe I	23
4.11.2. Versuchsgruppe II.....	24
4.11.3. Versuchsgruppe III.....	25
4.12. Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen.....	26
4.13. Statistische Auswertung.....	26
5. <u>Ergebnisse</u>.....	27
5.1. Ergebnisse der Versuchsgruppe I.....	27
5.1.1. Durchmesser Arteriolenbifurkation.....	27
5.1.2. Durchmesser kleine Arteriolen.....	28
5.1.3. Alveolendichte.....	29
5.1.4. Alveolumfang.....	30
5.1.5. Leukozytendichte.....	31
5.1.6. Blutflussgeschwindigkeit.....	32
5.1.7. Arteriolarer volumetrischer Blutfluss.....	33
5.2. Blutgasanalysen und Elektrolyte.....	34
5.2.1. Elektrolyte.....	34
5.2.2. Blutgasanalyse.....	36
5.3. Ergebnisse der Versuchsgruppe II.....	38
5.3.1. Makrophagen.....	38
5.3.2. Neutrophile Granulozyten.....	38
5.3.3. Latex-Beads.....	38
5.3.4. Auswertung der Histologie.....	39
5.3.5 Konglomerate.....	39
5.4. Ergebnisse der Versuchsgruppe III.....	43

5.4.1. Analyse des Zeitintervalls 0-10 Minuten Newman vs. LS1.....	43
5.4.3. Analyse des Zeitintervalls 20-30 Minuten Newman vs. LS1.....	43
5.4.4. Analyse des Zeitintervalls 30-40 Minuten Newman vs. LS1.....	44
5.4.5. Analyse des Zeitintervalls 40-50 Minuten Newman vs. LS1.....	44
5.4.6. Analyse des Zeitintervalls 50-60 Minuten Newman vs. LS1.....	44
5.4.7. Vergleich der Kinetiken zwischen Newman und LS1.....	46
6. <u>Diskussion</u>	50
6.1. Diskussion der Methodik.....	50
6.2. Diskussion der Modelle.....	53
6.3. Diskussion der Ergebnisse.....	55
6.4. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick.....	58
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	59
8. <u>Danksagung</u>	63
9. <u>Veröffentlichungen</u>	64
10. <u>Lebenslauf</u>	65
11. <u>Anhang</u>	66
11.1. Videosequenzen.....	66
11.1.1. Video-FITC-Dextran.avi.....	66
11.1.2. Video-Latex-Beads.mpg.....	66
11.1.3. Video-Newman-Bakterien.mpg.....	66

Abkürzungen

A	Arteria
Abb	Abbildung
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALT	Bronchus associated lymphoid tissue
BGA	Blutgasanalyse
°C	Grad Celsius
CAP	community acquired pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)
CCD	charged coupled device
CFSE	Carboxyl-Fluoresceyl-Succinyl-Ester
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
g	Gramm
GFP	Green-Fluorescent-Protein
h	Stunde
IVM	Intravitalmikroskopie
LS1	Bezeichnung des verwendeten <i>Staphylokokkus aureus</i> Stammes
MALP-2	Macrophage-activating lipopeptide of molecular mass 2 kDA
MCC	Mukoziliäre Clearance
mg	Milligramm
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
min	Minuten
MW	Mittelwert
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NTF	Abkürzung des verwendeten Bakterienstammes = Newman (NCTC 8178)
P	prozentuale Angabe des Signifikanzniveaus
PBS	phosphate buffered saline
PEEP	positive end-expiratory pressure, positiver endexpiratorischer Druck

pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
pl/s	Pikoliter / Sekunde
Sek.	Sekunde
SD	standard deviation (Standardabweichung)
vs.	versus (lateinisch) dt.: gegen, im Sinne von: gegenüber gestellt
W	Watt
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Zusammenfassung

Bakterielle Lungenerkrankungen zählen in den Industrieländern zu den häufigsten letalen Infektionskrankheiten. In Deutschland erkranken jährlich ca. 200.000 – 250.000 Menschen an einer Pneumonie, deren Hauptauslöser Streptokokken und Staphylokokken sind. Der Ausgang einer Lungeninfektion wird dabei maßgeblich von der Immunantwort des Betroffenen bestimmt. Zum Schutz vor eindringenden Pathogenen besitzt der Respirationstrakt zahlreiche Abwehrsysteme. Zu diesen gehören unter anderem Alveolarmakrophagen, Monozyten und Granulozyten. Diese befinden sich in unterschiedlicher Anzahl in den verschiedenen Kompartimenten des Respirationstraktes.

Die Prozesse der Lungenabwehr konnten bisher nur in *in vitro* Modellen, sogenannten Lungenpräzisionsschnitten direkt beobachtet werden. Dies liegt daran, dass die Lungenpräparation sehr schwierig ist und durch hohe Herz- und Atemfrequenzen das gewonnene Bildmaterial erschwert ausgewertet werden kann. So gibt es bisher keine Ansätze, die in einem *in vivo* Modell, Interaktionen zwischen pulmonalen Makrophagen und Pathogenen in der murinen Alveole zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie an der Lunge von C57BL/6 Mäusen *in vivo* etabliert und Unterschiede zwischen zwei Bakterienstämmen in der Lunge untersucht.

Hierzu wurden die Tiere narkotisiert, intubiert und thorakotomiert. Die erste Versuchsreihe dieser Studie diente hierbei der Etablierung einer geeigneten Operationstechnik. Hierbei konnten unter Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen pulmonale Mikrozirkulationsparameter erhoben und mit bereits publizierten Daten verglichen werden.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden C57BL/6 Mäuse über einen Zeitraum von 3 Tagen jeweils 3 Stunden pro Tag einem Tabakrauch exponiert. Am 3. Tag wurden die Tiere operiert, über den Inspirationsschlauch des Beatmungsgerätes fluoreszenzmarkierte Latex-Beads appliziert und die Ergebnisse der Auswertung mit einer Kontrollgruppe verglichen.

So zeigten die Alveolarmakrophagen der Rauchergruppe, anders als in der Literatur beschrieben, tendenziell eine stärkere Phagozytose als die Alveolarmakrophagen der Kontrollgruppe. Weiterhin zeigten die Tiere der Rauchergruppe einen deutlichen Anstieg der neutrophilen Granulozyten.

In einer dritten Versuchsreihe erhielten die Tiere CFSE markierte Bakterien über den inspiratorischen Schenkel des Beatmungsgerätes. Zum Einsatz kamen die beiden

Staphylococcus aureus Stämme Newman und LS1. Hierbei wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten, nach Applikation, die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen in den Alveolen quantifiziert und für alle Zeitintervalle signifikante Unterschiede zwischen den beiden Bakterienstämmen festgestellt.

Die vorliegende Studie beschreibt eine Technik, durch die die Beobachtung der Abwehrvorgänge der Alveole in einem *in vivo* Modell möglich ist. Dieses Verfahren der intravitalmikroskopischen Untersuchung der Lunge kann in zukünftigen Experimenten genutzt werden, um Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienstämmen und -arten zu untersuchen und langfristig den Einfluss von Pharmaka auf die Makrophagen-Bakterien Interaktionen zu beobachten. Die Optimierung der Therapie von Lungenerkrankungen ist ein langfristiges Ziel.

2. Summary

Bacterial lung disease in industrialized countries are among the most common lethal infectious diseases. In Germany every year approximately 200.000 – 250.000 people get sick because of pneumonia, caused by streptococci and staphylococci. The result of a lung infection is the decisive factor of the immune response of the infected person. To protect against invading pathogens the respiratory tract has many defenses. These include alveolar macrophages, monocytes and granulocytes. These are located in different numbers in different compartments of the respiratory tract.

The processes of lung defenses have so far been directly observed only using *in vitro* models, so-called precision cut lung slices, because the lung preparation is very difficult and can be evaluated more difficult by high heart and respiratory rates, the obtained images. Thus there are no approaches that show in an *in vivo* model interactions between pulmonary macrophages and pathogens in the murine alveolus. In the present study the intravital fluorescence microscopy of the lung of C57BL / 6 mice *in vivo* has been established and examines differences between two strains of bacteria in the lungs. To this end, the animals were anesthetized, intubated and thoracotomized. The first series of experiments of this study was used, in this case the establishment of an appropriate surgical technique. These were collected using fluorescent color pigments pulmonary microcirculation parameters and compared with previously published data.

In a second series of experiments, C57BL / 6 mice over a period of 3 days, 3 hours each per day were exposed to a tobacco smoke. On 3 days the animals were operated on through the inspiration of the ventilator tubing applied fluorescently labeled latex beads, and the results of the evaluation were compared with a control group.

The alveolar macrophages of smokers group showed in contrast to descriptions in the literature, a tendency to be greater than the alveolar macrophage phagocytosis in the control group. Furthermore, the animals of the smoking group showed a significant increase of neutrophils.

In a third series of experiments, the animals got CFSE labeled bacterials through the inspiratory limb of the ventilator. Therefore the two strains of *Staphylococcus aureus* Newman and LS1 were used. This was a period of 60 minutes after administration, the number of active cells phagocytosis quantified in the alveoli, and established for all time intervals significant differences between the two bacterial strains. The present study describes a technique for observing the processes of defense in the alveoli in an *in vivo* model. This

method of intravital microscopic examination of the lungs can be used in these models to reflect differences between different bacterial strains and species to investigate and monitor the long term macrophage-bacterial drug interactions. A long term goal is the improvement of therapy of lung infections.

3. Einleitung

3.1. Entzündliche Prozesse in der Lunge durch Partikel und Bakterien

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine interdisziplinäre wissenschaftliche Studie aus der Fachrichtung Anatomie und Zellbiologie, dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie und dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.

Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP = community acquired pneumonia) zählt in den westlichen Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen [Barten et al., 2011]. Bis zu 680.000 Menschen erkranken jedes Jahr in Deutschland an einer CAP [Barten et al., 2011]. Häufigste Erreger sind *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteria* sowie *Chlamydomphila pneumoniae* [Höffken et al., 2009]. Der Ausgang einer Pneumonie wird hierbei maßgeblich von einer optimalen Behandlungsstrategie beeinflusst. Die Art und Intensität der Therapie orientiert sich an Scores (Werkzeugen), die zur Risikostratifizierung einer CAP entwickelt wurden. In erster Linie ist hier der CRB-65 Index (CRB: confusion = Verwirrtheit, respiratory rate = Atemfrequenz, blood pressure = Blutdruck, Alter \geq 65 Jahre) zu nennen, anhand dessen eine respiratorische Insuffizienz, sowie die Symptome einer schweren Sepsis, beides Prädiktoren für eine Mortalität binnen 30 Tagen, eruiert werden [Bauer et al., 2006]. Bei älteren und zudem meist auch polymorbiden Patienten verläuft die Pneumonie in der Regel meist atypisch mit einem grippeähnlichen langsamen Verlauf, beginnend mit Kopf- und Gliederschmerzen begleitet durch leichtes Fieber und Reizhusten.

Der Verlauf endet häufig aufgrund erhöhter Risikofaktoren in Kombination mit einem durch Polymorbidität geschwächten Immunsystem tödlich.

Die Bekämpfung von Fremdkörpern und Krankheitserregern stellt somit eine besondere Herausforderung für das pulmonale Immunsystem da.

Seit der Erfindung der Intravitalmikroskopie 1839 [zitiert nach Sumen et al., 2004] durch den Anatomen Rudolf Wagner, und der Beschreibung der zellulären Mechanismen der Entzündungspathologie, durch den Pathologen Julius Friedrich Cohnheim 1889 [zitiert nach Sumen et al, 2004; zitiert nach Borte, 1985] gab es zahlreiche wissenschaftliche Veröffentlichungen, die sich der Technik der Intravitalmikroskopie (IVM) bedienten. Über 170 Jahre wurde diese Mikroskopiertechnik durch neuere und bessere Geräte optimiert und das Repertoire wissenschaftlicher Studien vergrößert.

So wurden in der Vergangenheit verschiedene methodische Ansätze publiziert, die durch Einsatz der *in vivo* Mikroskopie die Analyse der Mikrozirkulation der Lunge ermöglichen. Hierfür stehen verschiedene Tiermodelle (Ratte, Kaninchen, Maus) zur Verfügung, die entweder die quantitative Analyse der pulmonale Mikrozirkulation [Schneider et al., 2001; Tabuchi et al., 2008] oder die Messung der Leukozytenadhäsion in pulmonalen Gefäßen [Looney et al., 2011] zum Ziel hatten.

So verfolgt das intravitalmikroskopische Modell nach TABUCHI die Untersuchung mikrozirkulatorischer Prozesse in der Mauslunge. Dieses Modell basiert auf einer 7-10 mm großen rechtsseitigen Teileröffnung des Thorax, auf die ein Deckglaschen, vergleichbar mit einer Membran, mit Hilfe von Acrylkleber befestigt wird. Dieser kleine Lungenabschnitt kann dann mikrozirkulatorisch analysiert werden.

Ein weiteres intravitalmikroskopisches Modell zur Lungenmikroskopie ist das Modell nach LOONEY. Hauptaugenmerk der Arbeitsgruppe LOONEY ist die Stabilisierung der Lungenbewegungen, um die Leukozytenadhäsion in Gefäßen zu analysieren.

Realisiert wird dieses Vorhaben durch den Einsatz eines Stahlringes (Durchmesser = 12 mm) an dessen Unterrand eine Vakuumpumpe befestigt ist. Durch Anbringen des Stahlringes auf der linken Lunge wird durch kleine Bohrungen im Stahlring ein Sog auf die Lunge durch die Vakuumpumpe ausgeübt, und die Lungenoberfläche am Stahlring stabilisiert. Zur Analyse der Lunge dient eine kleine 4 mm große Öffnung im Stahlring.

Als Ideengeber für diese wissenschaftliche Studie diente das Modell nach TABUCHI, das für unsere Fragestellung modifiziert wurde.

Ergebnis dieser Modifizierungen ist das hier so genannte Homburger Modell, ein intravitalmikroskopischer Ansatz zur Beobachtung von Alveolen. Dieses Modell wurde durch die Vorarbeiten von Herrn PD. Dr. med. Rene Schramm, sowie die etablierte IVM am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Menger ermöglicht. Es handelt sich hierbei um eine schnelle Operationstechnik, die die Analyse einer großen Oberfläche der rechten bzw. teilweise auch linken Lunge ermöglicht. Auf den Einsatz eines Acrylklebers kann verzichtet werden. Um Bewegungsartefakte der Lunge während der Bildanalyse auf ein Minimum zu reduzieren erfolgt die Anlage eines PEEP (positive end-expiratory pressure). Dieses Modell ermöglicht es Alveolen größerer Lungenabschnitte nach Instillation von Partikeln oder Bakterien zu beobachten und Fragen bezüglich der Wirts-Erreger Interaktion im *in vivo* Modell zu beantworten. Wissenschaftliche Studien, die Interaktionen zwischen pulmonalen Makrophagen und Pathogenen *in vivo* zeigen, liegen zur Zeit nicht vor. Hauptverantwortlich hierfür ist der wissenschaftliche Focus. So untersuchten

die meisten Arbeitsgruppen, die die IVM betreiben, die Mikrozirkulation der Lunge. Ein weiterer Aspekt ist die schwierige Präparation der Mauslunge, bedingt durch die Größendimension. Des Weiteren die hohen Anzahlen von Bewegungsartefakten im Bildmaterial, hervorgerufen durch hohe Herz- und Atemfrequenzen bei der Maus.

Die Beobachtung von Bakterien / Viren in der Lunge, sowie die pharmakologischen Ziele von Medikamenten konnten bisher nur in sog. Lungenpräzisionschnitten in *in vitro* Modellen untersucht werden. Das Spektrum der verwendeten Pathogene ist hierbei ebenso breit gefächert, wie die unterschiedlichen Lungenproben, die hierbei zum Einsatz kamen. So gibt es verschiedene *in vitro* Modelle zu bakteriellen und viralen Erregern [Marquart et al., 2011], [Bauer et al. 2010], [Abd El Rhaman et al., 2010], [Berdnikovs et al. 2012], [Goris et al., 2008], [Ebsen et al., 2002]. Die Etablierung einer intravitalmikroskopischen Technik an der Mauslunge wäre somit ein wichtiger Beitrag in der Untersuchung der immunologischen Vorgänge in der Mauslunge.

Tabelle 1: Übersicht über die Techniken der verschiedenen Arbeitsgruppen

Arbeitsgruppe	Ziele der Arbeit	Methoden / Technik
Tabuchi	Mikrozirkulation	Membran, kleine Thorakotomie
Looney	Leukozytenadhäsion in Gefäßen	Vakuumring, kleine Thorakotomie
„Homburger-Modell“	Erreger/Wirtsinteraktion in Alveolen	Thorakotomie, große Thorakotomie

3.2. Fragestellungen

Die Abwehrmechanismen der Alveole *in vivo* des angeborenen Immunsystems gegen eindringende Pathogene (Bakterien, Viren) in der Mauslunge sind im Einzelnen noch nicht bekannt. Gründe hierfür sind die fehlende Fokussierung wissenschaftlicher Arbeitsgruppen auf die Erforschung alveolärer Abwehrmechanismen *in vivo*. Sowie die schwierige Präparation der Lunge, die eine hohe Anzahl von Bewegungsartefakten im Bildmaterial bedingt, die durch die Atemexkursionen bei schneller Atem- und Herzfrequenz hervorgerufen werden.

Verschiedene *in vitro* Modelle zur Ratte, dem Kaninchen sowie zur Maus, die sich mit der Mikrozirkulation sowie den Abwehrmechanismen der Lunge beschäftigen, sind bereits in der Vergangenheit publiziert worden.

Ansätze, die die Wirts-Erreger Interaktion des angeborenen Immunsystems der Lunge an einem *in vivo* Modell zeigen, sind dem Verfasser nicht bekannt. Vielleicht könnten in Zukunft Lungenerkrankungen, die durch bakterielle oder virale Infektionen hervorgerufen werden durch diese Erkenntnisse in ihrer Therapie optimiert werden.

Ziel dieser wissenschaftlichen Studie war es daher, die Intravitalmikroskopie an der Mauslunge zu etablieren, um Partikel (Latex-Beads, Bakterien) in der Alveole zu beobachten und folgende Fragen zu beantworten:

1. Erreichen instillierte Latex-Beads bzw. Bakterien die Lungenperipherie oder werden diese bereits in der Trachea oder den Bronchien abgefangen?
2. Ist es möglich die Interaktionen von Bakterien und stimulierten Phagozyten in der infizierten Lunge zu untersuchen, wenn ja, gibt es quantifizierbare Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienstämmen?

4. Material und Methoden

4.1. Versuchstiere

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach Überprüfung durch die zuständige Tierschutzkommission vom Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes auf Grund des § 9 Abs. 1 Satz 2 des TierSCHG sowie des § 1 Abs. 3 des Gesetzes über das öffentliche Veterinärwesen genehmigt (Tierversuchsnummer 42/2009).

Die Versuche wurden an C57BL/6 – Mäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt, die von der Charles River GmbH in Sulzfeld bezogen wurden.

Die Unterbringung der Tiere erfolgte bis zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen im Institut für Klinische und Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinik Homburg/Saar, Deutschland.

Die Tierhaltung erfolgte in Tierkäfigen mit freiem Zugang zu Standardfutter [Altromin, Lage, Deutschland], sowie Trinkwasser ad libitum.

Verwendung fanden dabei Tiere mit einem Gewicht von 25 – 30 g und einem Alter von 12 – 16 Wochen.

Die Infektionsversuche wurden im S2-Tierstall des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, unter der Leitung von PD. Dr. sc. nat. ETH M. Bischoff durchgeführt.

4.2. Intravitale Multifluoreszenzmikroskopie

4.2.1. Technischer Geräteaufbau

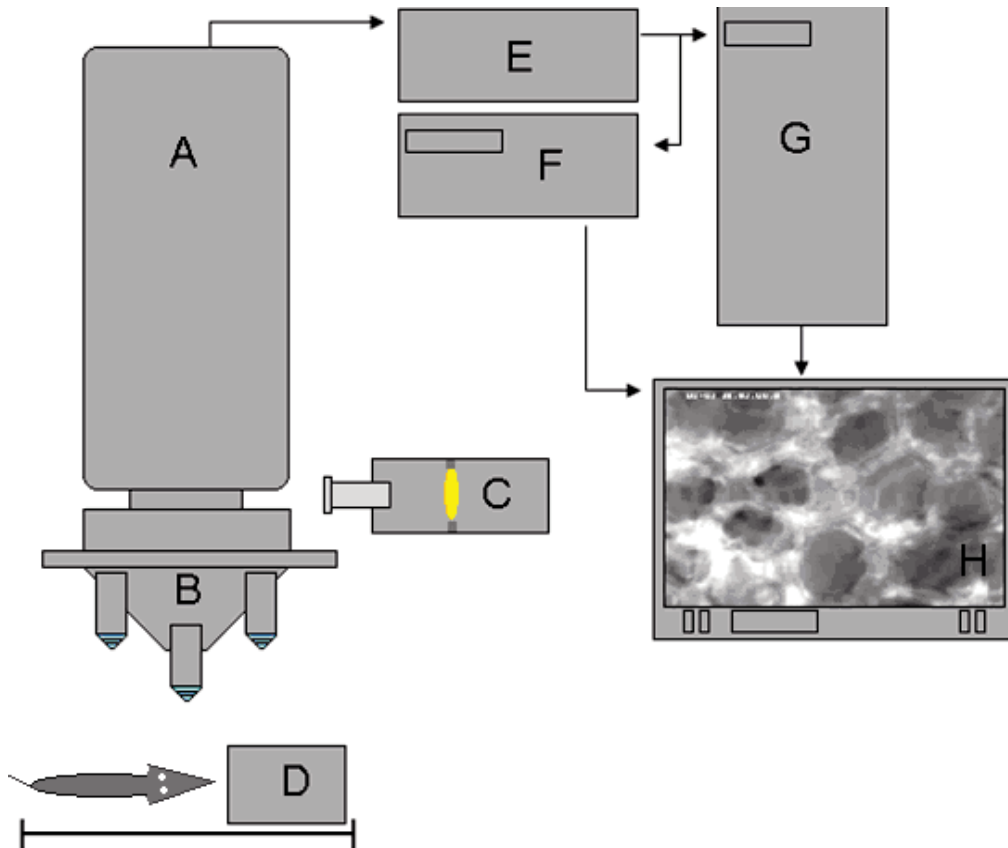


Abb. 1: A = CCD (charged coupled device)-Kamera, B = Auflichtmikroskop, C = Quecksilberlampe, D = Beatmungsgerät, E = Timer, F = Videorekorder, G = Digitales Bildanalyse-System, H = Monitor

Die Mikroskopiereinheit (Abbildung 1) bestand aus einer CCD-Kamera (FK 6990, Pieper, Schwerte, Deutschland), die die Bildinformationen des Auflichtmikroskopes (= Zeiss Axiovert, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) über ein digitales Bildanalyse-System auf den Monitor (PVM 1371-QM, Sony Corp., Tokio, Japan) lieferte. Zur Speicherung des Bildmaterials diente ein digitaler Videorekorder (Panasonic AG-7350-S-VHS, Matsushita, Tokyo, Japan). Die zeitliche Zuordnung erfolgte über einen Timer (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan). Die Beatmung der Tiere erfolgte über ein Beatmungsgerät (=Minivent, Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland), das zusammen mit den Versuchstieren auf einer Arbeitsplatte direkt unter dem Objektiv fixiert wurde.

4.3. Lagerung der Versuchstiere

Die Lagerung der Tiere erfolgte in Rückenlage auf einer Kunststoffarbeitsplatte (s.u.). Um die Trachealintubation in reklinierter Haltung zu erleichtern wurde ein Kompressenkissen unter den Kopf des Tieres gelegt.

Angepasst an die Bedürfnisse während des Mikroskopiervorganges erfolgte die Fertigung der OP-Arbeitsplatte in der Werkstatt des Institutes für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar durch Herrn Sauerbaum. So konnte das Versuchstier relativ leicht nach Sedierung mit Klebeband an den Extremitäten fixiert werden. Durch eingebrachte Aussparungen war darüber hinaus der Einsatz einer Halteklemme zur Anbringung eines Deckgläschens (Abbildung 2) auf der Lungenoberfläche während des Mikroskopiervorganges möglich.

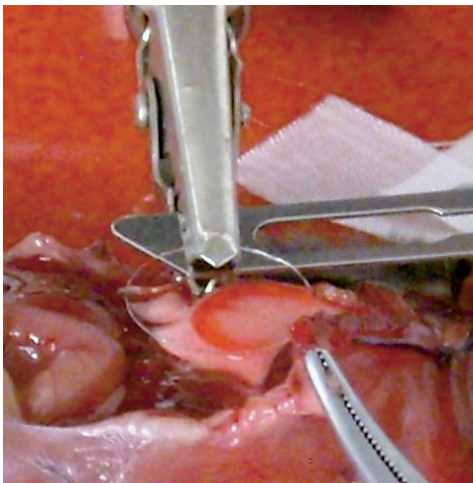


Abb. 2: Die Abbildung zeigt den Einsatz der Halteklemme, die das Positionieren des Deckgläschens auf der Lungenoberfläche ermöglichte.

4.3. Anästhesie und Präparation

4.3.1. Anästhesie und Präparation

Nachdem die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion von 7,5 mg Ketamin-Hydrochlorid (Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und 2,5 mg Xylazinhydrochlorid (Bayer, Leverkusen, Deutschland) pro 100g Körpergewicht narkotisiert waren, wurden die Tiere auf der OP-Platte zur Immobilisierung fixiert. Zur Beatmung der Tiere erfolgte eine Intubation über eine Tracheotomie (Abbildung 3) mit einem Trachealtubus D = 1mm (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland). Die Beatmung erfolgte mit einem Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) mit einer Frequenz von 150 pro Minute, einem Hubvolumen von 200 μ l und einem positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) von 4 cmH₂O bei einer FiO₂ von 100%. Um starke Blutungen während der Eröffnung des Brustkorbes zu vermeiden wurden die A. thoracica interna dextra et sinistra durch eine Umstechungsligatur ligiert. (Prolene 2-0, Ethicon, Livingston, Scotland). Die Eröffnung des Brustkorbes erfolgte über eine mediane Sternotomie vom Processus Xiphoideus ausgehend in Richtung Manubrium Sterni bis zum dritten Interkostalraum mit einer Metzenbaumschere. Im dritten Interkostalraum angelangt, erfolgte die weitere Schnittführung zur rechten Seite der Brustwand. In der mittleren Axillarlinie wurde die Thorakotomie fortgesetzt. Die Eröffnung des Brustkorbes erfolgte durch Durchschneiden der Rippen und Schonung der benachbarten Gefäße. Blutungen von Hautgefäßen, epigastrischen Gefäßen, sowie kleinere Blutungen der Interkostalgefäße wurden koaguliert. Das Diaphragma wurde auf der rechten Seite vorsichtig vom Rippenbogen abgelöst. Die Präparation erfolgte hierfür schrittweise und unter Schonung von Lunge, sowie umliegender Gefäße. Die Bauch-Organen wurden von einer temperierten (37 °C) und mit Kochsalzlösung benetzten Gaze abgedeckt und die rechtsseitig eröffnete Thoraxwand vorsichtig entnommen. Die Lungenoberfläche wurde dann im Folgenden mit einer temperierten (37 °C) Kochsalzlösung gespült und hierbei größten Wert darauf gelegt, keine Impressionen an der Lungenoberfläche zu erzeugen (Abbildung 4). Die Versuchstiere wurden während des gesamten Eingriffes mit einer Wärmelampe erwärmt, um ein Auskühlen zu vermeiden. Unter Zuhilfenahme einer Halteklemme, die an der OP-Arbeitsplatte fixiert werden konnte, wurde auf der Lungenoberfläche ein Glasdeckgläschen angebracht (Abbildung 2). Durch Gabe eines Tropfens Kochsalzlösung zwischen Lungenoberfläche und

Deckgläschen konnten die physikalischen Adhäsionskräfte des Wassers ausgenutzt werden und das Deckgläschen auf der Lungenoberfläche fixiert werden. Weiterhin konnte durch diese Maßnahme eine Verbesserung der Optik erzielt werden. Die Visualisierung erfolgte mit einem Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 W Quecksilber-Lampe. Als Filter standen ein Blaufilter (450-490nm, Emissionswellenlänge $> 520\text{nm}$), ein Grünfilter (530 - 560nm, Emissionswellenlänge $> 580\text{nm}$) und ein Rotfilter (330-390nm Emissionswellenlänge $> 430\text{nm}$) zur Verfügung. Um das Bild während der Aufnahme weiterhin zu stabilisieren wurde für einen Zeitraum von 10-20 Sekunden die Beatmung der Tiere abgeschaltet und der positive endexpiratorische Druck (PEEP) auf 5 cmH₂O eingestellt. Dies ermöglichte für einen relativ kurzen Zeitraum die Aufnahme von Bildern ohne Bewegungsartefakte. Die Versuchstiere wurden danach sofort wieder mittels Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) beatmet. Das inspiratorische Volumen wurde auf 200 μl eingestellt, die Atemfrequenz auf 150 Atemzüge pro min und der PEEP wieder auf 4 cmH₂O. Die Mikroskopischen Bilder wurden auf einen Monitor übertragen und mittels einer CCD-Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und aufgezeichnet (Panasonic AG-7350-S-VHS, Matsushita, Tokyo, Japan). Die Auswertung der Videoaufzeichnungen erfolgte off-line an einem PC-System unter Verwendung der CapImage Software (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie.

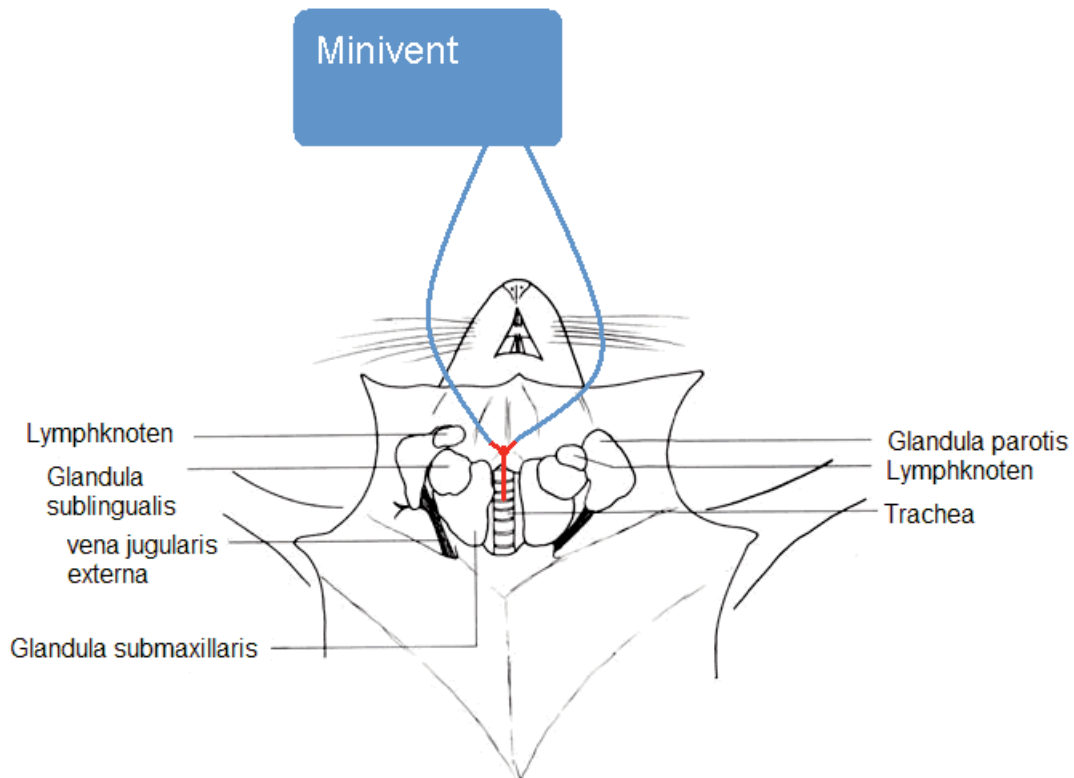


Abb. 3: Modifiziert nach [<http://www.informatics.jax.org/cookbook/>]. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der durchgeführten Tracheotomie unter Einsatz eines Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland)

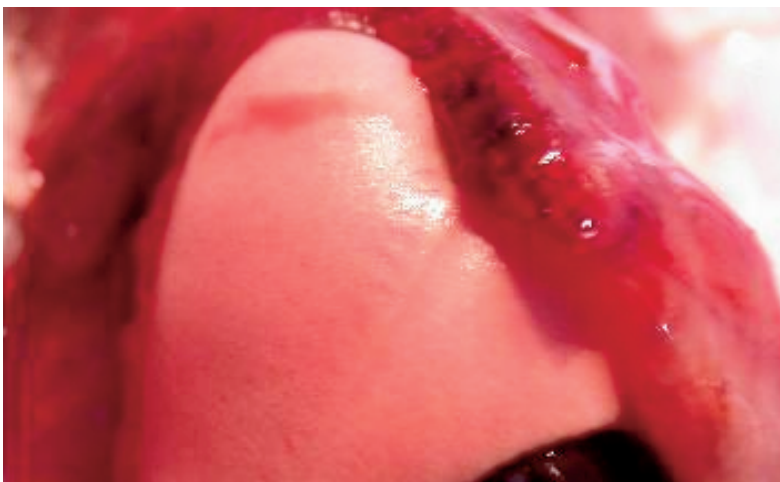


Abb. 4: Die Abbildung zeigt die rechte Lungenoberfläche nach erfolgreicher Präparation. Rechter Lungenoberlappen sowie der rechte Lungenmittellappen konnten mikroskopiert werden.

4.3.2. Applikation der Farbstoffe und Fremdpartikel

Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Farbpartikel kamen bei den Versuchen zum Einsatz. So erfolgte die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G und FITC-Dextran (Bezugsquelle s. u.) retrobulbär. Die Instillation von Latex-Beads und Bakterien erfolgte hingegen über die Trachea. Um hierbei für alle Tiere gleiche Voraussetzungen zu schaffen erfolgte die Gabe über den Luftschlauch des Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland). Die Atemfrequenz von 150 Hüben/min mit einem Atemvolumen von 200 µl war bei allen Tieren konstant.

4.4. Fluoreszenzfarbstoffe, Latex-Beads und Bakterien

4.4.1. Fluoreszein-Isothiozyanat

Zur Darstellung der Blutgefäße während der Intravitalmikroskopie wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC, Fluka Biochemika, Ulm, Deutschland) verwendet, der an Dextran gekoppelt war. Eingesetzt wurde eine 5%-ige Lösung (in NaCl) des Fluoreszenzfarbstoffes. Das Molekulargewicht betrug 150.000, das Exzitationsmaximum 490 nm. Die Applikation des Farbstoffes erfolgte retrobulbär (0,05 ml/Tier). Die Lagerung erfolgte bis zum Einsatz lichtgeschützt bei einer Temperatur von -20°C.

4.4.2. Rhodamin 6G

Zur Darstellung der leukozytären Entzündungsreaktion des Gewebes wurde Rhodamin 6G (SIGMA, St. Louis, USA) eingesetzt, das am Cytochrom C von Leukozyten bindet. Das Exzitationsmaximum liegt bei 530 nm, die Emissionswellenlänge bei 590 nm. Zum Einsatz kam eine in isotoner Kochsalzlösung (1%-ige Lösung) verdünnte Lösung. Die Lagerung und Applikation erfolgte wie unter 4.4.1 beschrieben.

4.4.3. Latex-Beads

Zur Darstellung von Alveolarmakrophagen und phagozytoseaktiven Zellen wurden Latex-Beads (Fluoresbrite Plain YG 1,0 Micron Microspheres, Eppelheim, Polysciences) eingesetzt. Das Exzitationsmaximum liegt bei 441 nm, die Emissionswellenlänge bei 486 nm. Zur Etablierung wurden sowohl verschiedene Konzentrationen als auch unterschiedliche Größen (0,01 μm ; 0,1 μm ; 1 μm) dieser Polystyrolkugeln eingesetzt. Eingesetzt wurden hierbei 0,05 ml 1 μm großer Latex-Beads. Um für alle Versuchstiere gleiche Voraussetzungen zu schaffen wurden die Latex-Beads über den inspiratorischen Schenkel des Minivent (Hugo Sachs/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) verabreicht. Das Atemzugvolumen betrug für alle Tiere 200 μl und die Atemfrequenz 150. Um zwischen Makrophagen und Monozyten differenzieren zu können, erfolgte die Auswertung der Bilddaten mit der CapImage Software (Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Zellen mit einem Durchmesser größer als $d = 10,5 \mu\text{m}$ wurden hierbei als Makrophagen definiert, Zellen kleiner als $d = 10,5 \mu\text{m}$ als neutrophile Granulozyten.

4.4.4. Bakterien

Um optimale Bilderergebnisse mit Bakterienversuchen zu erreichen, mussten zu Beginn der Versuchsreihe verschiedene Bakterienkonzentrationen sowie Bakterienstämme getestet werden. Die hierfür benutzten Bakterienstämme wurden uns vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt. Zum Einsatz kamen CFSE (Carboxyl-Fluoresceyl-Succinyl-Ester) markierte Staphylokokken Stämme unterschiedlicher Konzentrationen. Die Konzentrationen schwankten dabei zwischen normal gefärbten Bakterien (0,2 mmol CFSE 9×10^8 Bakterien/ml) bis zur fünffachen stärkeren Färbung (10 mmol CFSE $6,5 \times 10^9$ Bakterien/ml). CFSE markierte Staphylokokken Stämme vom Typ Newman [Duthie et al., 1952] sowie LS1 [Bremell et al., 1992] wurden für die Versuche verwendet. Um bestmögliche Bilderergebnisse für die Versuchsgruppe III zu erlangen, wurde auf die fünffache Bakterienfärbung (10 mmol CFSE $6,5 \times 10^9$ Bakterien/ml) zurückgegriffen. Die Färbung der Bakterien erfolgte im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.

4.5. Analyse der Mikrozirkulation

4.5.1. Arteriöler Gefäßdurchmesser

Zur Analyse des Gefäßdurchmessers wurden 3 Gesichtsfelder pro Tier ausgewählt und mit dem 20x Objektiv über ca. 15 Sekunden im entsprechenden Grünfilter aufgenommen. Zur besseren Kontrastierung der Kapillaren wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran eingesetzt. Die Messung des Kapillardurchmessers erfolgte hierbei jeweils an der Aufteilung großer KapillargefäÙe in kleine KapillargefäÙe. So konnten sowohl die Gefäßdurchmesser auf Höhe der Gefäßgabelung, als auch hinter der Gefäßteilung bestimmt werden. Die Identifizierung der Arteriolen erfolgte durch die Blutfließrichtung hinter der Gefäßgabelung.

4.5.2. Arteriöle Blutzellgeschwindigkeit

Nach intravenöser Markierung des Blutplasmas mit FITC-Dextran wurde mit der Line-Shift-Methode [Klyscz, Junger et al. 1997] (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg) die Blutzellgeschwindigkeit quantifiziert. Hierbei wird über eine im Zentrum des zu analysierenden Gefäßes verlaufende Linie der Helligkeitswert aufgezeichnet. Bedingt durch die unterschiedlichen Konzentrationen des Fluoreszenzfarbstoffes im Gefäßbett ergeben sich Linien verschiedener Helligkeit. Aus der Steigung dieser Hilfslinien ergibt sich die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten. Die Erhebung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgte an den gleichen GefäÙen wie unter 4.5.1.

4.5.3 Arteriöler volumetrischer Blutfluss

Der arteriöle volumetrische Blutfluss [Gross und Aroesty, 1972] wurde aus Durchmesser und Blutzellgeschwindigkeit nach folgender Formel berechnet, welche auf einer zylindrischen Gefäßform basiert und in der Einheit pl/s angegeben.

$$BF = v * \pi * r^2$$

v = erythrozytäre Blutzellgeschwindigkeit, r = Radius des Gefäßes

4.5.4. Quantifizierung der mittleren Alveolendichte

Zur Analyse der Alveolendichte wurden 3 Gesichtsfelder pro Tier ausgewählt und mit dem 20x Objektiv über ca. 15 Sekunden im entsprechenden Filter aufgenommen. Im Folgenden wurde mit der Software (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg) ein 1 mm² großes Rechteck in das Gesichtsfeld gelegt und durch Auszählen die Dichte der Alveolen / 1 mm² quantifiziert. Von den hierbei erhobenen Daten wurde der Mittelwert für jedes Tier für die Anzahl der Alveolen / 1 mm² bestimmt. Ein Punkt entspricht hierbei in der statistischen Auswertung dem Mittelwert für ein Tier.

4.5.5. Messung des mittleren Alveolarumfanges

Die Berechnung des Alveolarumfanges erfolgte an 3 ausgewählten Gesichtsfeldern für jedes Tier. Mit einer computerunterstützten Software (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg) wurde ein 1 mm² großes Rechteck in das Gesichtsfeld gelegt und der Umfang der enthaltenen Alveolen bestimmt. Von den hierbei erhobenen Daten wurde der Mittelwert / 1 mm² für jedes Tier bestimmt. Ein Punkt entspricht hierbei in der statistischen Auswertung dem Mittelwert für ein Tier.

4.5.6. Messung der mittleren Leukozytendichte

Zur besseren Kontrastierung der „stationären“ Leukozyten wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G eingesetzt. Zur Analyse der Leukozytendichte wurden 3 Gesichtsfelder pro Tier ausgewählt und mit dem 20x Objektiv über ca. 15 Sekunden im Rotfilter (330-390nm

Emissionswellenlänge > 430nm) aufgenommen. Im Folgenden wurde mit der Software (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg) ein 1 mm² großes Rechteck in das Gesichtsfeld gelegt und durch Auszählen die Anzahl der Leukozyten / 1 mm² quantifiziert. Von den hierbei erhobenen Daten wurde der Mittelwert für die Anzahl der Leukozyten / 1 mm² für jedes Tier bestimmt. Ein Punkt entspricht hierbei in der statistischen Auswertung dem Mittelwert für ein Tier.

4.6. Blutgasanalyse

Die Messung der Blutparameter erfolgte an einem Blutgasanalysemessgerät (RAPID-LAB 855, Erlangen, Siemens). Hierbei konnten u.a. Parameter wie CO₂, PO₂, pH-Wert, Kalium, Natrium, und Chlorid bestimmt werden. Die Messung der Parameter erfolgte nach erfolgreicher Präparation der rechten Lunge nach 15 Min., 30 Min. und 45 Min. Hierbei wurden jeweils 60 µl arterielles Blut in eine Blutkapillare (MultiCap, Leverkusen, Bayer) aufgezogen und dem Messgerät zur Analyse zugeführt.

4.7. Analyse der akkumulierten Latex-Beads bzw. Phagozyten

4.7.1. Quantifizierung

Durch die Aufnahme von FITC-Dextran markierten Latex-Beads wurden die Phagozyten sichtbar und konnten quantifiziert werden. Hierfür wurden randomisiert 3 Gesichtsfelder pro Tier ausgewählt und mit dem 20x Objektiv über ca. 15 Sekunden im entsprechenden Grünfilter aufgenommen. Im off-line Modus wurde mit der zur Verfügung stehenden Software (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg) ein 1 mm² großes Rechteck in das Gesichtsfeld gelegt und mit der Quantifizierung der Phagozyten begonnen. Zur Differenzierung der einzelnen Gruppen wurde für jede Zelle, die mit FITC markierten Latex-Beads angefärbt war, der Durchmesser bestimmt und der jeweiligen Statistikgruppe zugeordnet. Runde, hell leuchtende Strukturen mit einem Durchmesser größer als 10,5 µm wurden als Makrophagen, Zellen kleiner als 10,5 µm als neutrophile Granulozyten definiert. Einzelne sichtbare Latex-Beads wurden definiert mit einem Durchmesser von 1 µm. Zellen größer als 14,5 µm wurden als Zellanhäufungen, so genannte Konglomerate bezeichnet. Von den hierbei erhobenen Daten wurde der Mittelwert pro 1 mm² für jedes Tier bestimmt.

4.7.2. Nachweis von Makrophagen / neutrophilen Granulozyten

Zur Bestätigung der Vermutung, dass es sich bei den IVM Aufnahmen der Mauslunge um Phagozyten handelt, wurde eine BAL (Bronchoalveoläre Lavage) durchgeführt (siehe Kapitel 4.7.3). Die hierbei gewonnenen Zellen des bronchoalveolären Raumes wurden anschließend mit 0,1 ml Latex-Beads (Fluoresbrite Plain YG 1,0 Micron Microspheres, Eppelheim, Polysciences) inokuliert und bebrütet. Anschließend gespült und zur Auswertung unter dem Auflichtmikroskop analysiert. Gleichzeitig wurden zur Charakterisierung der Phagozyten eine Gesamtzellzahlbestimmung sowie zytologische Präparate hergestellt. Diese Zellzählung lieferte in Verbindung mit den histologischen Präparaten einen Mittelwert für die Alveolarmakrophagen von 96,09 % (N = 3) sowie für neutrophile Granulozyten einen Mittelwert von 2,54 % (N = 3). Diese Informationen waren die Bestätigung für die Vermutung, dass es sich bei den beobachteten Zellen im *in vivo* Modell um Makrophagen handelt.

4.7.3. Bronchoalveoläre Lavage

Die Zellen des bronchoalveolären Raumes wurden durch eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen. Die Zellen wurden durch viermaliges Spülen mit 0,8ml NaCl 0.9 % aus der Lunge herausgespült. Nachdem die Zellsuspension zentrifugiert war (10 min, 300 x g, RT), wurde der Überstand abgenommen und mit PBS resuspendiert. Anschließend wurden den Zellen 0,05 ml Latex-Beads (Fluoresbrite Plain YG 1,0 Micron Microspheres, Eppelheim, Polysciences) zur Phagozytose angeboten und die Zellsuspension bei 37 °C und einem CO₂ - Gehalt von 5 % für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgten eine dreifache Spülung mit PBS und die Auswertung der in der Zellsuspension enthaltenen Zellen (Abbildung 18) mit dem Auflichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Zur Charakterisierung der Zellen wurden eine Gesamtzellzahlbestimmung durchgeführt und zytologische Präparate hergestellt.

4.8. Quantifizierung Bakterien fressender Phagozyten

Zur Analyse Bakterien enthaltender Makrophagen/Monozyten, wurden für eine bessere Kontrastierung der Phagozyten CFSE markierte Bakterien eingesetzt (siehe Kapitel 4.4.4.). Zur Quantifizierung wurden randomisiert 3 Gesichtsfelder pro Zeitintervall für jedes Tier ausgewählt und mit dem 20x Objektiv über ca. 15 Sekunden im entsprechenden Grünfilter aufgenommen. Im off-line Modus wurde mit der zur Verfügung stehenden Software (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg) ein 0,2 mm² großes Rechteck in das Gesichtsfeld gelegt und mit der Quantifizierung der Phagozyten begonnen.

4.9. Histologie

4.9.1. Histologische Präparate

Als Grundlage für die histologischen Präparate diente der rechte Lungenoberlappen, der nach dem Experiment dem Tier entnommen wurde und für 24 h in 4%iger Formaldehydlösung fixiert wurde. Im Anschluss erfolgten die Paraffineinbettung und die Herstellung von H&E (Hämatoxylin und Eosin) gefärbten histologischen Präparaten.

4.10. Experimentelle Gruppen

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wurde in 3 experimentelle Versuchsgruppen untergliedert (I, II, III). Die erste Versuchsgruppe (I) diente der Etablierung einer geeigneten OP-Technik, die die Intravitalmikroskopie der Lunge ermöglicht. Hierbei sollten einige Parameter mit publizierten Ergebnissen verglichen werden. Parameter die bestimmt werden konnten waren:

1. Fließgeschwindigkeit in den Arteriolen in mm/sec.
2. Alveolendurchmesser / mm^2
3. Dichte der Alveolen / mm^2
4. Arteriolendurchmesser in μm
5. Dichte der Leukozyten / mm^2
6. Arteriolarer volumetrischer Blutfluss pl/s
7. Blutparameter

Die zweite Versuchsgruppe (II) diente der Darstellung und Identifizierung von Alveolarmakrophagen, denen zur Phagozytose $1\mu\text{m}$ große Latex-Beads intratracheal appliziert angeboten wurden. Hierbei wurden 2 Studiengruppen verglichen. Der Kontrollgruppe stand eine Rauchergruppe gegenüber. Die hierfür verwendeten Tiere wurden in Zusammenarbeit mit der Experimentellen Pneumologie Homburg vor der Versuchsdurchführung für 3 Tage jeweils 3 Stunden täglich mit Zigarettenrauch beraucht. Im Intervall von 15-20 Minuten wurden die Tiere jeweils beraucht, dem Rauchintervall folgte eine 10 minütige Pause. Durch die Intervallberauchung konnte eine zu hohe CO_2 -Konzentration vermieden werden. Diese Versuchsgruppe diente darüber hinaus als Vorversuchsgruppe für die dritte Gruppe.

Der dritten Versuchsgruppe (III) wurden intratracheal Bakterien (*Staphylococcus aureus* vom Stamm *LSI* bzw. vom Stamm *Newman*) [Duthie et al., 1952; Bremell et al., 1992] zur Phagozytose angeboten. Beide Stämme wurden unter S2-Bedingungen im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene den Tieren verabreicht und die Ergebnisse der beiden Gruppen miteinander verglichen.

4.11. Experimentelles Protokoll

4.11.1. Versuchsgruppe I:

Zu Beginn der Versuchsdurchführung (Abbildung 5) erfolgte die Einleitung der Narkose durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Ketaminhydrochlorid (Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Es erfolgte eine Wartezeit von ca. 8 Minuten. Nachdem die Tiere auf keinen Zehenreflex mehr reagierten, wurden selbige auf der Arbeitsplatte immobilisiert und die Tracheotomie begonnen (0 Minuten). Auf die erfolgreich durchgeführte Tracheotomie folgte die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G sowie FITC-Dextran (nach 10 Minuten), anschließend die Thorakotomie (nach 12 Minuten). Danach erfolgten die Positionierung unter dem Auflichtmikroskop, sowie der Beginn der Videoaufnahme (nach 20 Minuten). Die Tötung der Versuchstiere erfolgte nach ca. 90 Minuten. Die Tiere wurden während der gesamten Zeit der Versuchsdurchführung erwärmt, sowie der Operations situs angefeuchtet, um ein Auskühlen und Austrocknen zu verhindern.



Abb. 5: Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf zur Versuchsdurchführung der I. Versuchsgruppe.

4.11.2. Versuchsgruppe II:

Versuchsgruppe II (Abbildung 6) unterscheidet sich zu Versuchsgruppe I ab der 10 Minute. Die Tiere der II. Versuchsgruppe wurden nach 10 Minuten mit Latex-Beads intratracheal instilliert. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten konnte mit der Präparation, der Thorakotomie (nach 30 Minuten) begonnen werden. Danach erfolgten die Positionierung unter dem Auflichtmikroskop, und der Beginn der Videoaufnahme (nach 40 Minuten). Die Tötung der Versuchstiere erfolgte nach ca. 110 Minuten.

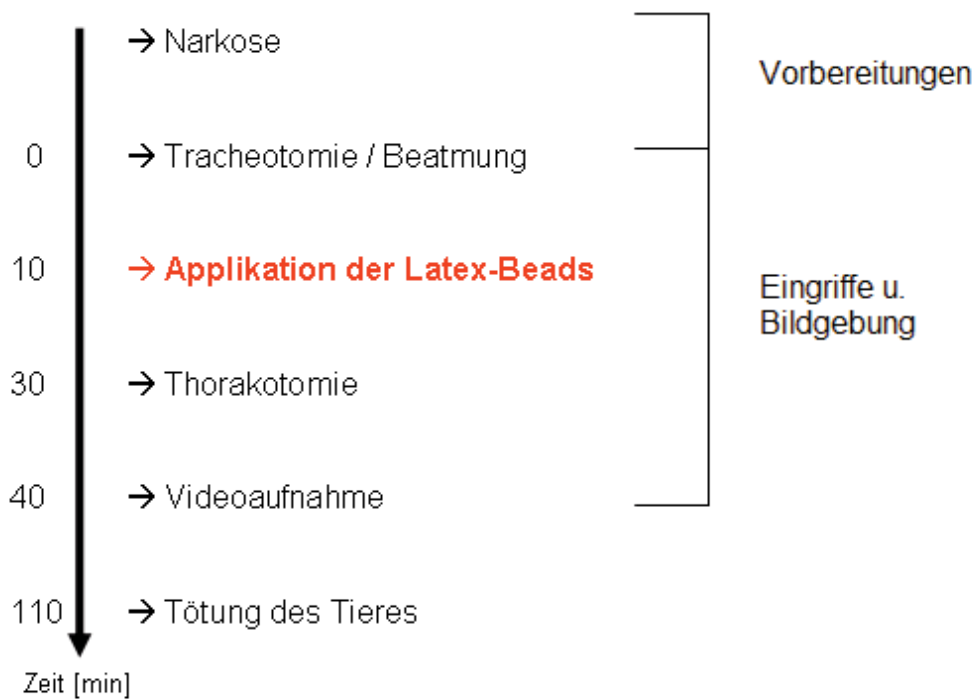


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der Versuchsgruppe II

4.11.3. Versuchsgruppe III:

Versuchsgruppe III (Abbildung 7) unterscheidet sich zu Versuchsgruppe I und II ab der 10 Minute. Die Tiere der III Versuchsgruppe wurden nach 10 Minuten mit Bakterien intratracheal infiziert. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten wurde mit der Präparation begonnen, so dass nach ca. 50 Minuten die Tiere unter dem Auflichtmikroskop positioniert werden konnten. Danach erfolgte die Videoaufnahme (nach 40 Minuten). Die Tötung der Versuchstiere erfolgte nach ca. 110 Minuten.

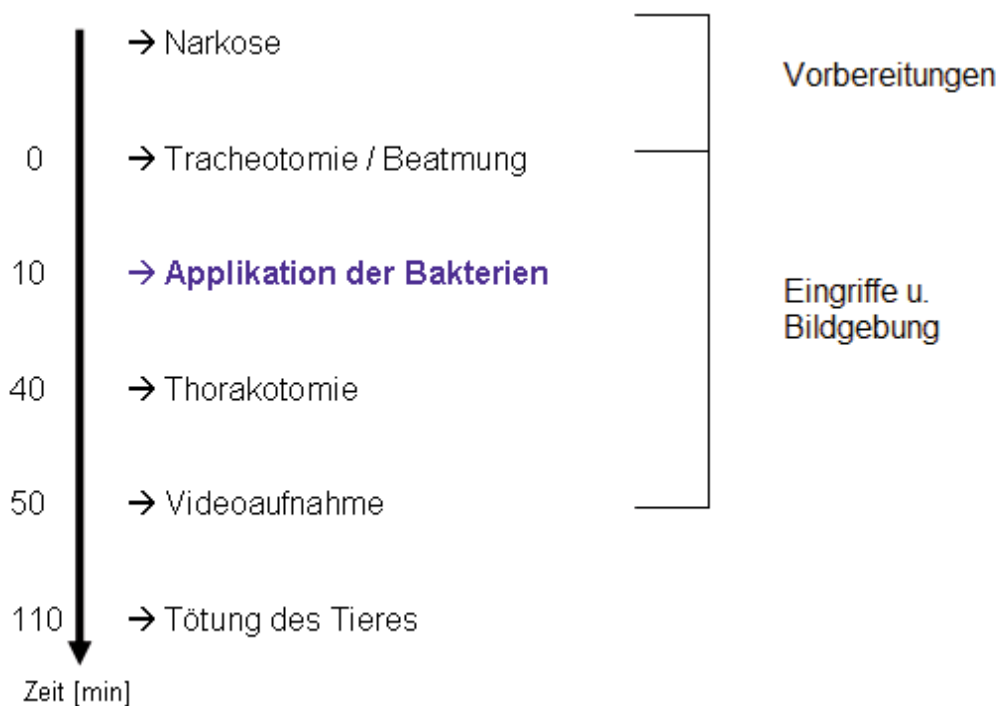


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Versuchsgruppe III

4.12. Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen

Die quantitative Auswertung der Videoaufnahmen erfolgte nach Versuchsende an einer Computer-unterstützten Einheit im Institut für klinische und experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Die Computer gestützte Einheit bestand aus einem S-VHS-Videorekorder (AG-7350, Panasonic, Ratingen) sowie einem nachgeschalteten Monitor (36 cm Bildschirmdiagonale, PVM 2130 QM, Sony, München). Die Quantifizierung der Parameter erfolgte mit einem für die Mikrozirkulationsforschung speziell entwickelten Computer-Programm (CapImage Version 5.03, Zeintl Software Engineering, Heidelberg)

4.13. Statistische Auswertung

Nach Auswertung der Videoaufzeichnungen wurden die erhobenen Daten in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Corporation Deutschland, Unterschleißheim) zur weiteren Datenverarbeitung eingegeben. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism (GraphPad Prism, La Jolla, USA). Bei normal verteilten Daten kam zum Vergleich zwischen zwei Gruppen der Mann-Whitney U Test zur Anwendung. Von den zu erhebenden Parametern wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) berechnet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der Versuchsgruppe I:

5.1.1. Durchmesser Arteriolenbifurkation

Zur Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter im Rahmen der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Kontrastierung der Blutgefäße der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran verwendet. Der mittlere Durchmesser für die Arteriolenbifurkation (Abbildung 8) betrug hierbei $24,9 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 9,4 \mu\text{m}$; $N = 12$).

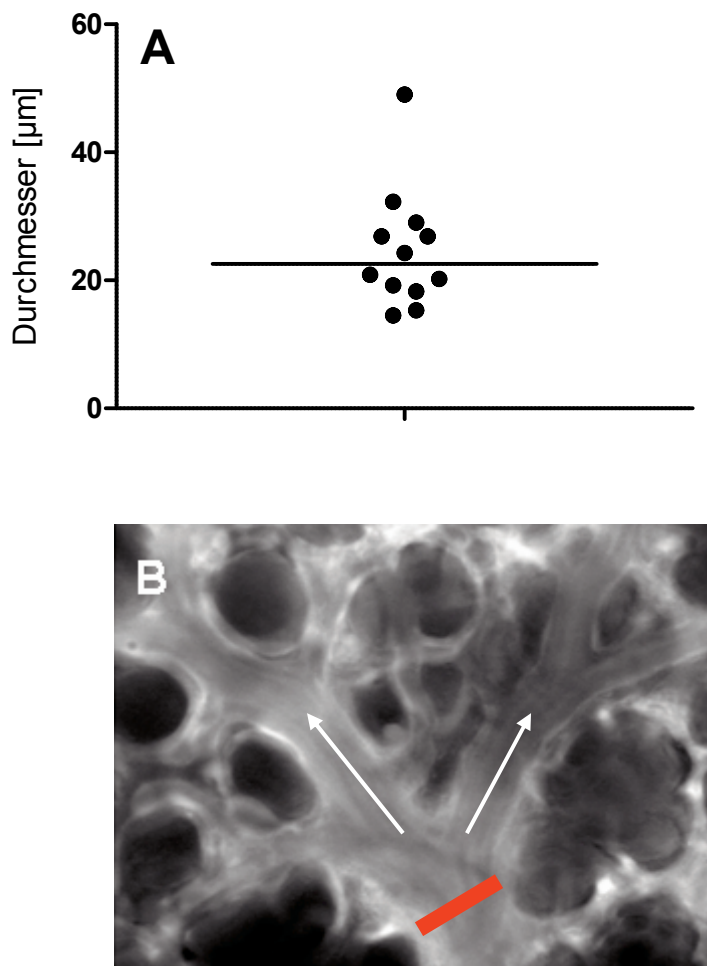


Abb. 8 A, B: A zeigt die Verteilung der Parameter um den Mittelwert. Ein Punkt stellt einen Wert pro Tier dar, der aus 3 Einzelmessungen gemittelt wurde; B zeigt einen Bildausschnitt eines rechten Lungenmittellappens in vivo. Die rote Linie zeigt den gemessenen Bereich des Durchmessers ($26,9 \mu\text{m}$). Die weißen Pfeile zeigen die Fließrichtung in der Arteriole an.

5.1.2. Durchmesser kleine Arteriolen

Der mittlere Durchmesser für kleine Arteriolen betrug $14,8 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 4,9\mu\text{m}$; $N = 23$). Die Messung erfolgte hinter der Bifurkation (Abbildung 9). Der kleinste Wert betrug $6,3 \mu\text{m}$, der größte Wert $27,5 \mu\text{m}$.

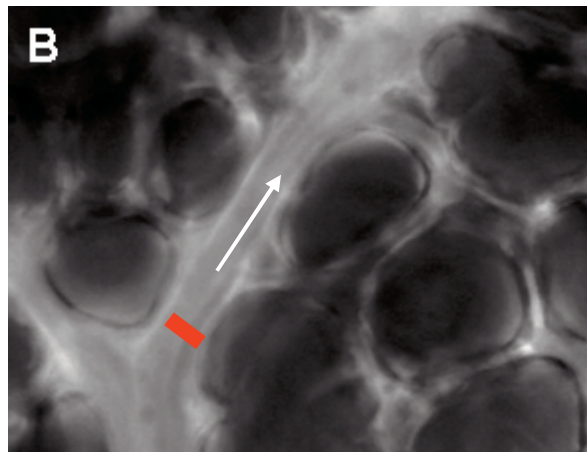
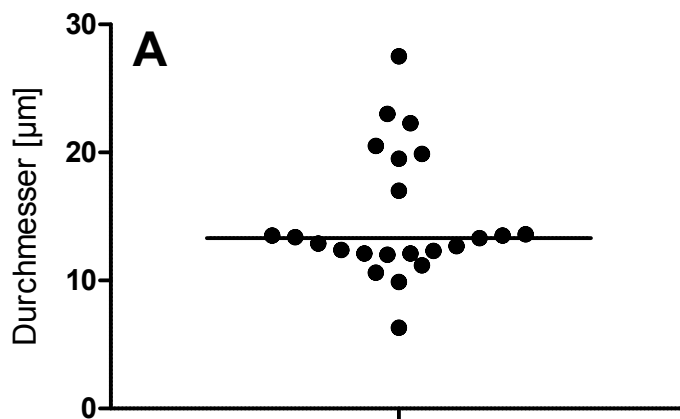


Abb. 9 A, B: A zeigt die graphische Verteilung der Parameter um den Mittelwert (waagrechte Linie). B zeigt einen Bildausschnitt eines rechten Lungenmittellappens *in vivo*. Die rote Linie zeigt den gemessenen Bereich des Durchmessers ($20,5 \mu\text{m}$). Der weiße Pfeil gibt die Fließrichtung an.

5.1.3. Alveolendichte

Die mittlere Alveolendichte (Abbildung 10) betrug 321,6 pro mm^2 (SD = 56,3 Stück; N = 6). Der kleinste Wert betrug 230 pro mm^2 , der größte Wert 390 pro mm^2 .

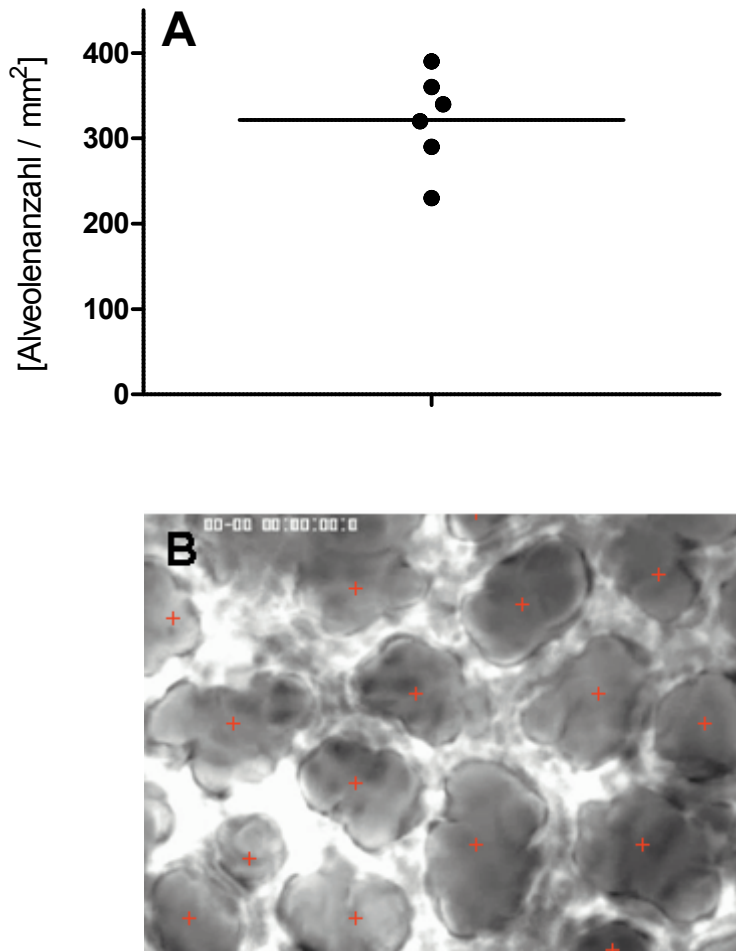


Abb. 10 A, B: Abbildung A zeigt die graphische Verteilung der Anzahl der gemessenen Lungenalveolen pro mm^2 . Ein Punkt stellt einen Wert pro Tier dar, der aus 3 Einzelmessungen gemittelt wurde. Abbildung B zeigt die offline Auswertung der Lungenalveolenanzahl mit CapeImage (Zeintl Software Engineering, Heidelberg)

5.1.4. Alveolenumfang

Der mittlere Index des Alveolarumfangs betrug im Mittel $276,1 \mu\text{m}$ pro $0,1 \text{ mm}^2$ (SD = $37,2 \mu\text{m}$; N = 6). Der kleinste Wert betrug 211 pro $0,1 \text{ mm}^2$, der größte Wert 320 pro $0,1 \text{ mm}^2$.

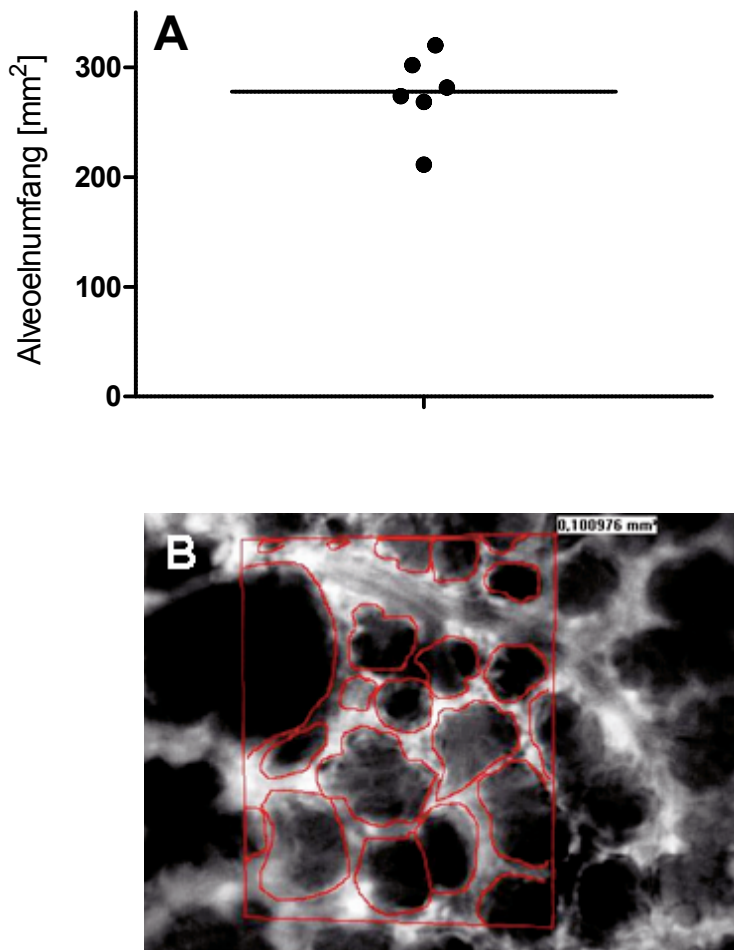


Abb. 11 A, B: A zeigt die graphische Verteilung der erhobenen Alveolarumfänge, sowie den Mittelwert (waagrechte Linie). Ein Punkt stellt einen Wert pro Tier dar, der aus 3 Einzelmessungen gemittelt wurde. B zeigt einen rechten Lungenmittellappen in vivo. Die Messung des Alveolarumfangs (rote Markierungen im Bild) erfolgte im off-line Modus mit CapImage (Zeintl Software Engineering, Heidelberg).

5.1.5. Leukozyten

Zur Analyse der Leukozyten im Rahmen der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie wurde zur besseren Kontrastierung der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G verwendet. Die Anzahl der Leukozyten betrug im Mittel 473,3 pro mm^2 (SD = 235,4; N = 6). Der kleinste Wert betrug 180 pro mm^2 , der größte Wert 790 pro mm^2 .

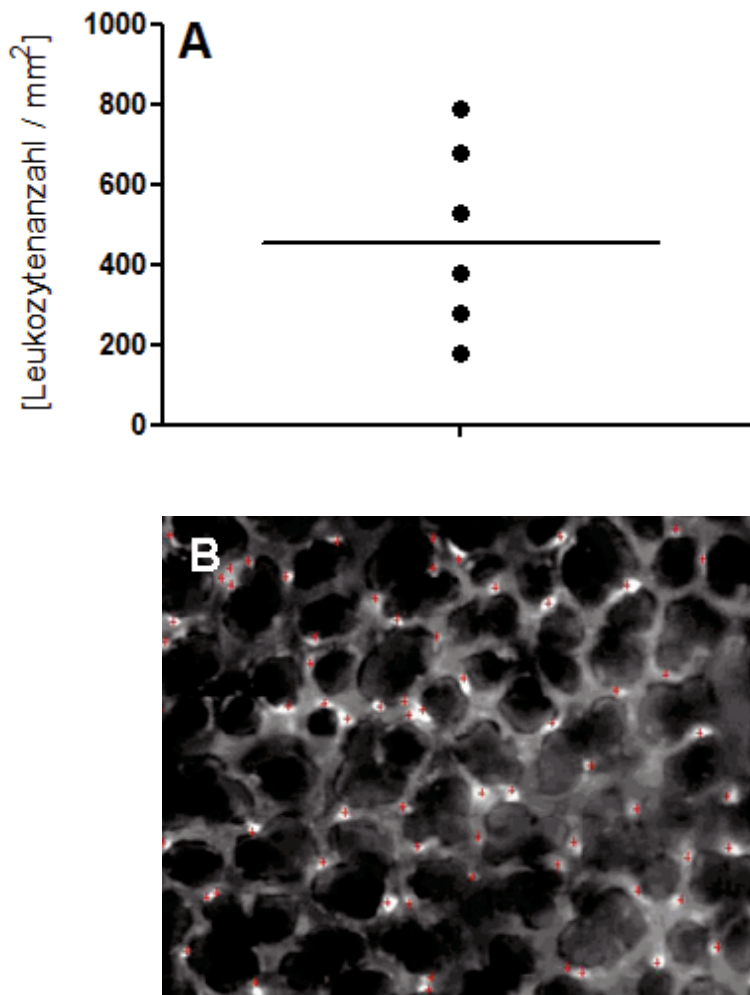


Abb. 12 A, B: A zeigt die graphische Verteilung um den Mittelwert (waagrechte Linie). Ein Punkt stellt einen Wert pro Tier dar, der aus 3 Einzelmessungen gemittelt wurde. B zeigt die leukozytäre Entzündungsreaktion. Zur besseren Kontrastierung der Leukozyten wurde der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G verwendet.

5.1.6. Blutflussgeschwindigkeit

Die Analyse der arteriölen Blutzellgeschwindigkeit erfolgte an den gleichen Gefäßabschnitten wie die Analyse der Durchmesser. Die Blutflussgeschwindigkeit betrug im Mittel 1,5 mm/sec (SD = 0,3 mm/sec; N = 9). Der kleinste Wert betrug 1,1 mm/sec, der größte Wert 1,9 mm/sec.

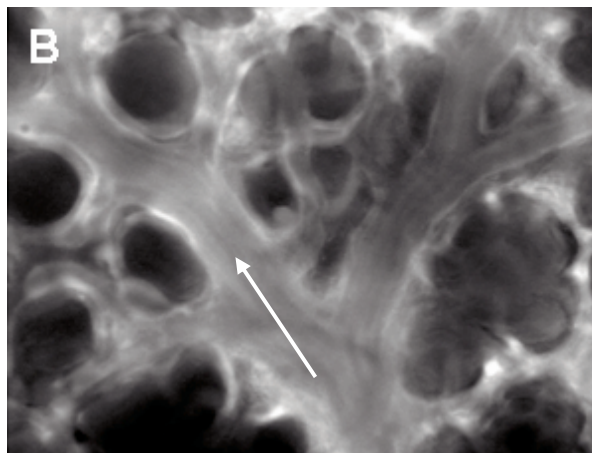
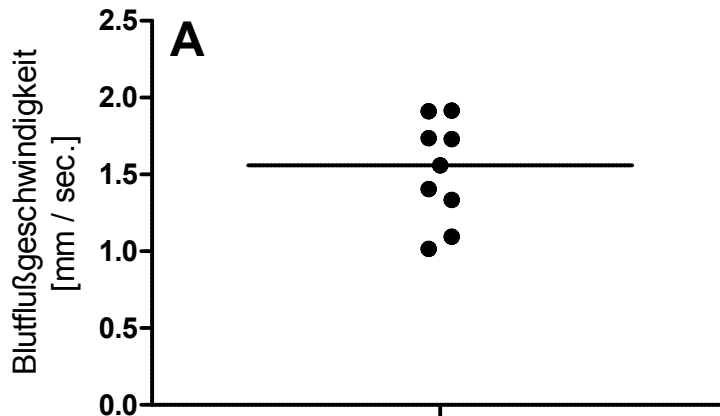


Abb. 13 A, B: A zeigt die graphische Verteilung um den Mittelwert (waagrechte Linie). B zeigt einen Bildausschnitt eines rechten Lungenmittellapens in vivo. Der weiße Pfeil zeigt die Fließrichtung an, die Messung der Fließgeschwindigkeit erfolgte off-line mit CapelImage (Zeintl Software Engineering, Heidelberg).

5.1.7. Arteriöler volumetrischer Blutfluss

Aus dem arteriölen Durchmesser sowie der Blutzellgeschwindigkeit wurde der arteriöle Blutfluss errechnet. Der statistisch ermittelte mittlere arteriöle volumetrische Blutfluss betrug 4000 pl/s (SD = 1720 pl/s; N = 9). Der kleinste Wert betrug 1300 pl/s, der größte Wert 6800 pl/s.

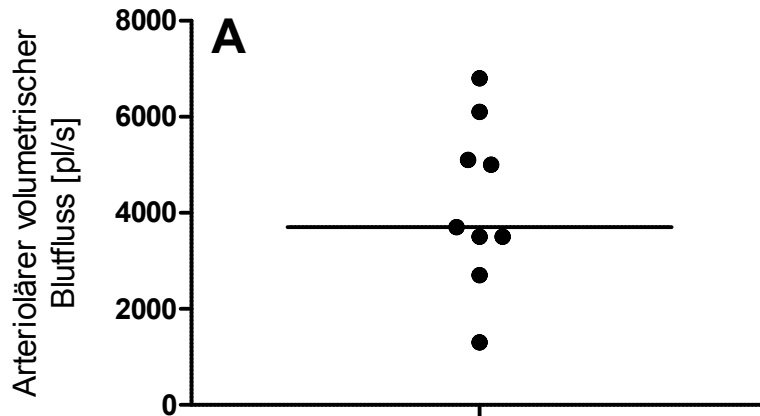


Abb. 14 A: A zeigt die graphische Verteilung der rechnerisch ermittelten Daten des arteriölen volumetrischen Blutflusses um den Mittelwert (waagrechte Linie).

5.2. Blutgasanalyse und Elektrolyte

5.2.1. Elektrolyte

Die mittlere Natriumkonzentration (Abbildung 15 A) betrug nach 15 Minuten post Präparation 141,97 mmol/l. Nach einer Beobachtungszeit von 45 Minuten betrug der Mittelwert für die Natriumkonzentration 144,3 mmol/l. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die mittlere Chloridkonzentration (Abbildung 15 B) betrug nach 15 Minuten post Präparation 114 mmol/l. Nach einer Beobachtungszeit von 45 Minuten betrug der Mittelwert für die Chloridkonzentration 114,7 mmol/l. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die mittlere Calciumkonzentration (Abbildung 15 C) betrug nach 15 Minuten post Präparation 1,2 mmol/l. Nach einer Beobachtungszeit von 45 Minuten betrug der Mittelwert für die Calciumkonzentration 1,3 mmol/l. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

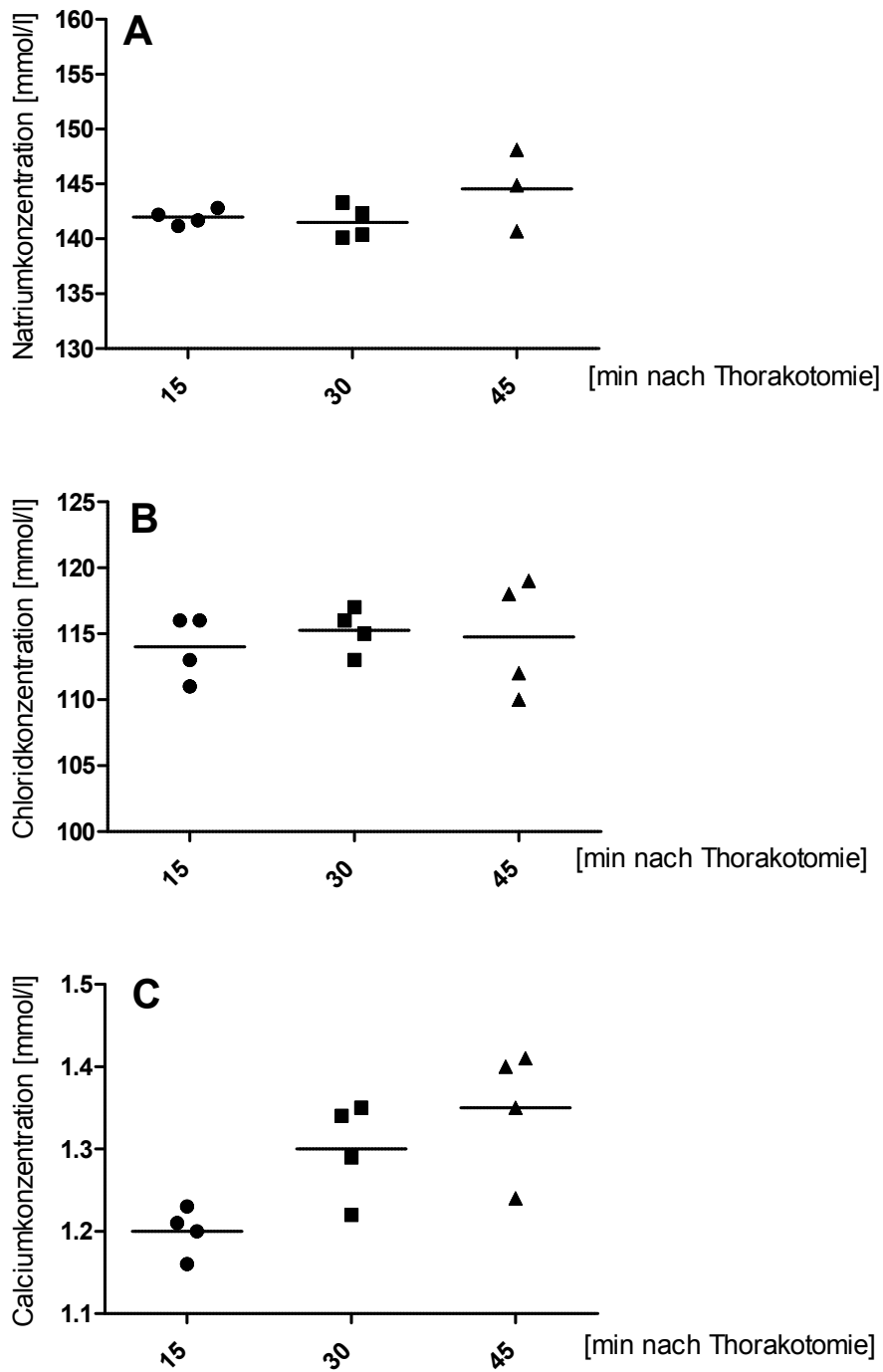


Abb. 15 A, B, C: A zeigt die graphische Verteilung der Natriumkonzentration; B zeigt die graphische Verteilung der Chloridkonzentration; C zeigt die graphische Verteilung der Calciumkonzentration. Die schwarze Linie entspricht jeweils dem Mittelwert.

5.2.2. Blutgasanalyse

Mit zunehmender Beobachtungsdauer veränderte sich der Blut-pH-Wert (Abbildung 16 A). Betrag der pH-Wert nach 15 Minuten noch 7,4 so lag er nach 45 Minuten bei 7,2 im Mittel. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die mittlere PO₂-Wert (Abbildung 16 B) betrug nach 15 Minuten post Präparation 82,7 mmHg. Nach einer Beobachtungszeit von 45 Minuten betrug der Mittelwert für den PO₂-Wert 76,4 mmHg. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die mittlere PCO₂-Wert (Abbildung 16 C) betrug nach 15 Minuten post Präparation 25,9 mmHg. Nach einer Beobachtungszeit von 45 Minuten betrug der Mittelwert für den PCO₂-Wert 26,3 mmHg. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

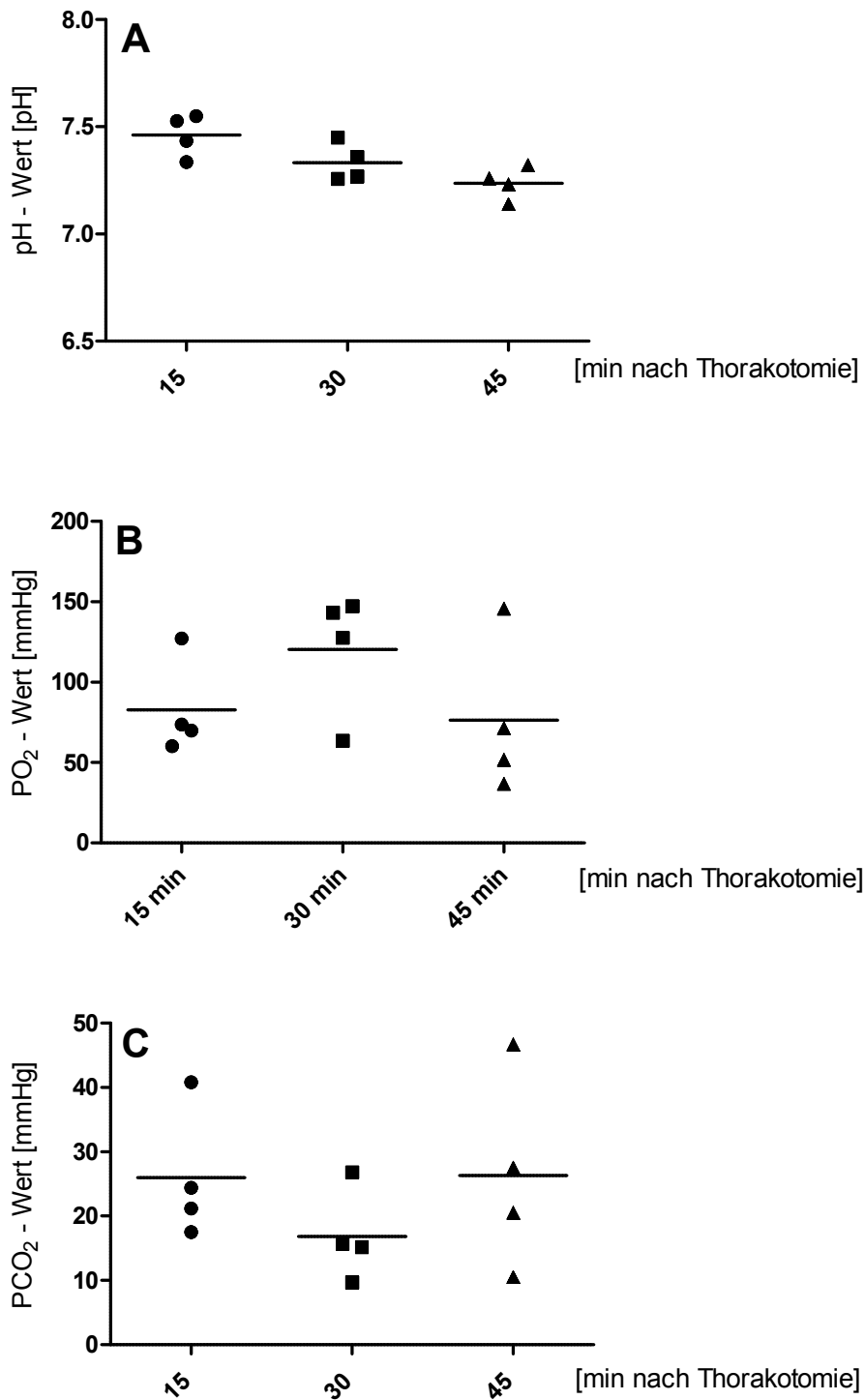


Abb. 16 A, B, C: A zeigt die graphische Verteilung des pH-Wertes; B zeigt die graphische Verteilung der PO₂-Werte; C zeigt die graphische Verteilung der PCO₂-Werte. Die schwarze Linie entspricht jeweils dem Mittelwert.

5.3. Ergebnisse der Versuchsgruppe II:

5.3.1. Makrophagen

Die Anzahl der phagozytoseaktiven Makrophagen (Abbildung 17 und 22 A) der Kontrollgruppe wurde mit einem Mittelwert von $9,7 / \text{mm}^2$ ($\text{SD} = 4,1 / \text{mm}^2$; $N = 5$) bestimmt. Im Vergleich zur Rauchergruppe mit einem Mittelwert von $7,6 / \text{mm}^2$ ($\text{SD} = 1,51 / \text{mm}^2$; $N = 6$) stellte sich dabei im Mann-Whitney U Test kein signifikanter Unterschied heraus. Aus den gesammelten Daten konnte jedoch eine Tendenz bezüglich einer höheren Phagozytoseaktivität in der berauchten Gruppe festgestellt werden.

5.3.2. Neutrophile Granulozyten

Der Mittelwert der neutrophilen Granulozyten der Kontrollgruppe (Abbildung 22 B) betrug $9,3 / \text{mm}^2$ ($\text{SD} = 2,4 / \text{mm}^2$; $N = 5$). Der Mittelwert der neutrophilen Granulozyten aus der Rauchergruppe betrug $13 / \text{mm}^2$ ($\text{SD} = 1,5 / \text{mm}^2$; $N = 6$). Vergleichend stellte sich dabei im Mann-Whitney U Test ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen heraus.

5.3.3. Latex-Beads

Der Mittelwert der Latex-Beads (Abbildung 22 C) der Kontrollgruppe wurde mit $5,8 / \text{mm}^2$ ($\text{SD} = 3,9 / \text{mm}^2$; $N = 5$) quantifiziert. Der Mittelwert der Latex Beads aus der Rauchergruppe betrug $1,2 / \text{mm}^2$ ($\text{SD} = 1,12 / \text{mm}^2$; $N = 6$). Es konnte kein signifikanter Unterschied bestimmt werden.

5.3.4. Auswertung der Histologie

Zur Illustration der Lunge wurden histologische Präparate angefertigt, um sie mit der IVM und der Zytologie vergleichen zu können. Dabei zeigten die histologischen Schnittpräparate, dass durch den Versuch die Lunge nicht beeinträchtigt wird (Abbildung 19 und 20). Ähnlich wie die Zytologie bestätigten die histologischen Präparate die Vermutung, dass es sich bei den hell leuchtenden Zellen der IVM um Alveolarmakrophagen handelt, die prall gefüllt mit Latex-Beads sind. (Abbildung 17, 18, 20). Diese Vermutung wurde auch durch eine elektronenmikroskopische Aufnahme bestätigt (Abbildung 21).

5.3.5. Konglomerate

Der Mittelwert der Konglomerate (Abbildung 22 D) der Kontrollgruppe wurde mit 0,72 Stück / mm² (SD = 0,81 Stück / mm²; N = 5) quantifiziert. Der Mittelwert der Konglomerate aus der Rauchergruppe betrug 1,25 Stück / mm² (SD = 0,88 Stück / mm²; N = 6).

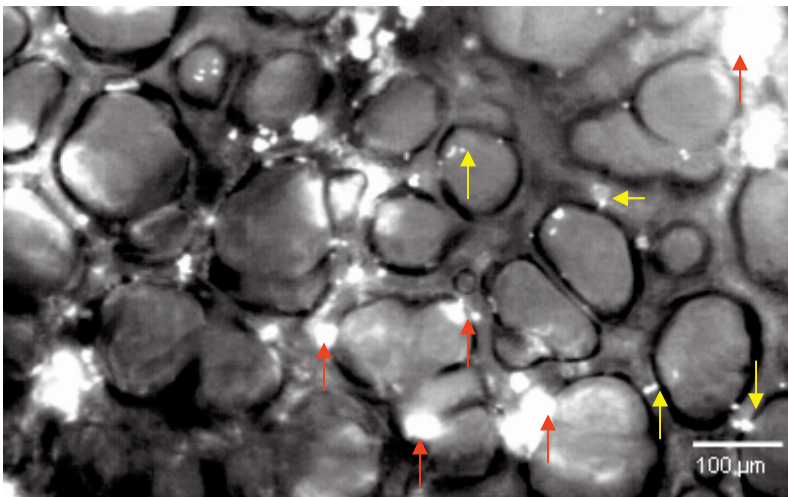


Abb. 17: Die Abbildung zeigt ein intravitalmikroskopisches Bild. Die roten Pfeile zeigen mit Latex-Beads gefüllte Zellen, die als Alveolarmakrophagen identifiziert werden konnten (s.u.). Die gelben Pfeile zeigen einzelne Latex-Beads, die noch nicht phagozytiert wurden.

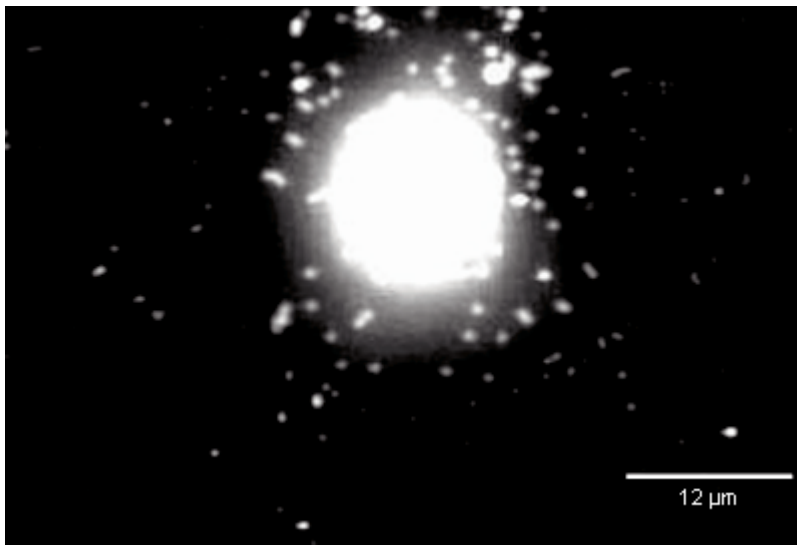


Abb. 18: Die Abbildung zeigt die Aufnahme eines Alveolarmakrophagen, der mit Hilfe einer BAL (siehe 4.7.3.) gewonnen wurde und durch Phagozytose von FITC-Dextran markierten Latex-Beads im Fluoreszenzmikroskop hell leuchtet.

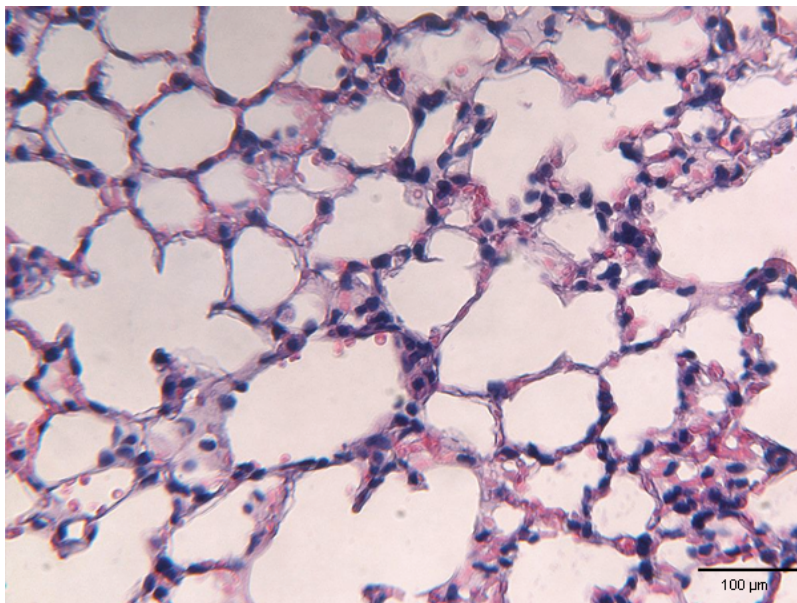


Abb. 19: Die Abbildung zeigt eine histologische Aufnahme eines rechten Lungenmittellappens in 40-facher Vergrößerung. Über den Trachealtubus wurden 100 µl Latex-Beads appliziert. Nach der Versuchsdurchführung wurde die rechte Lunge entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung konserviert. Die Abbildung zeigt, dass die Lungenstruktur durch den Eingriff keinen Veränderungen unterliegt. Latex-Beads sind als doppelbrechende Kügelchen in der nachfolgenden, stark vergrößerten Abbildung 20 zu sehen. Die Färbung der Präparate (Hämatoxylin und Eosin) und die Anfertigung der Schnitte wurden durch Herrn Dr. Martin Rosenbruch, Wuppertal durchgeführt.

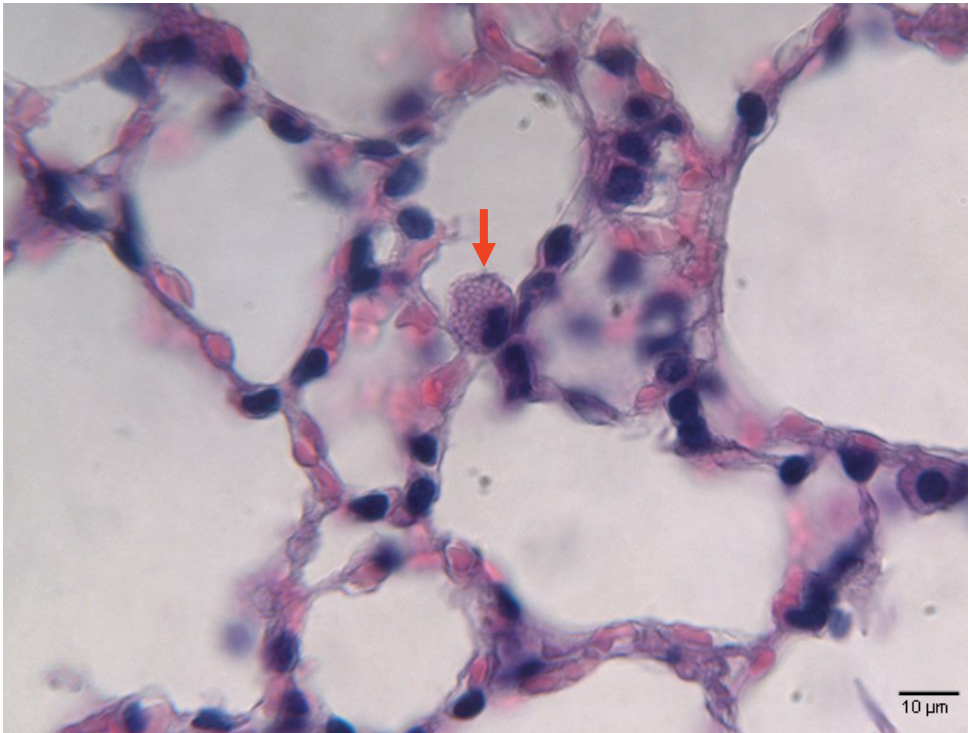


Abb. 20: Die Abbildung zeigt die histologische Aufnahme eines rechten Lungenmittellappens in 100-facher Vergrößerung. Über den Trachealtubus wurden 100 µl Latex-Beads appliziert. Nach der Versuchsdurchführung wurde die rechte Lunge entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung konserviert. Der rote Pfeil markiert einen Alveolarmakrophagen, der Latex-Beads phagozytiert hat. Die Färbung der Präparate (Hämatoxylin und Eosin) und die Anfertigung der Schnitte wurden durch Herrn Dr. Martin Rosenbruch, Wuppertal durchgeführt.

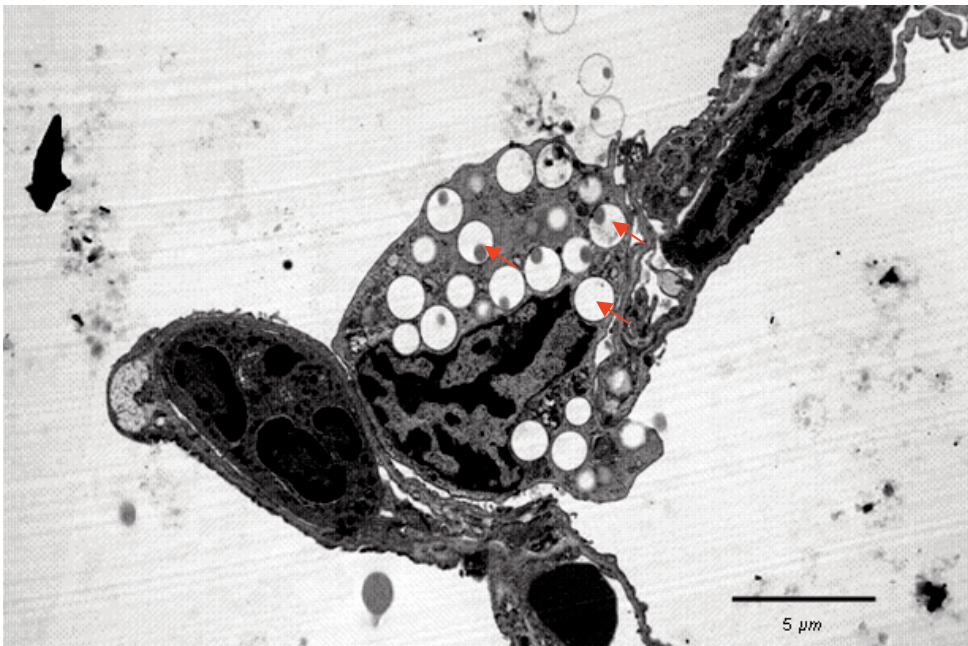


Abb. 21: Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Alveolarmakrophagen, der zahlreiche Latex-Beads phagozytiert hat (rote Pfeile). Über den Trachealtubus wurden 100 µl Latex-Beads appliziert. Nach der Versuchsdurchführung wurde die rechte Lunge entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung konserviert. Das Bild wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD. Dr. med. Dirk Theegarten, Essen erstellt.

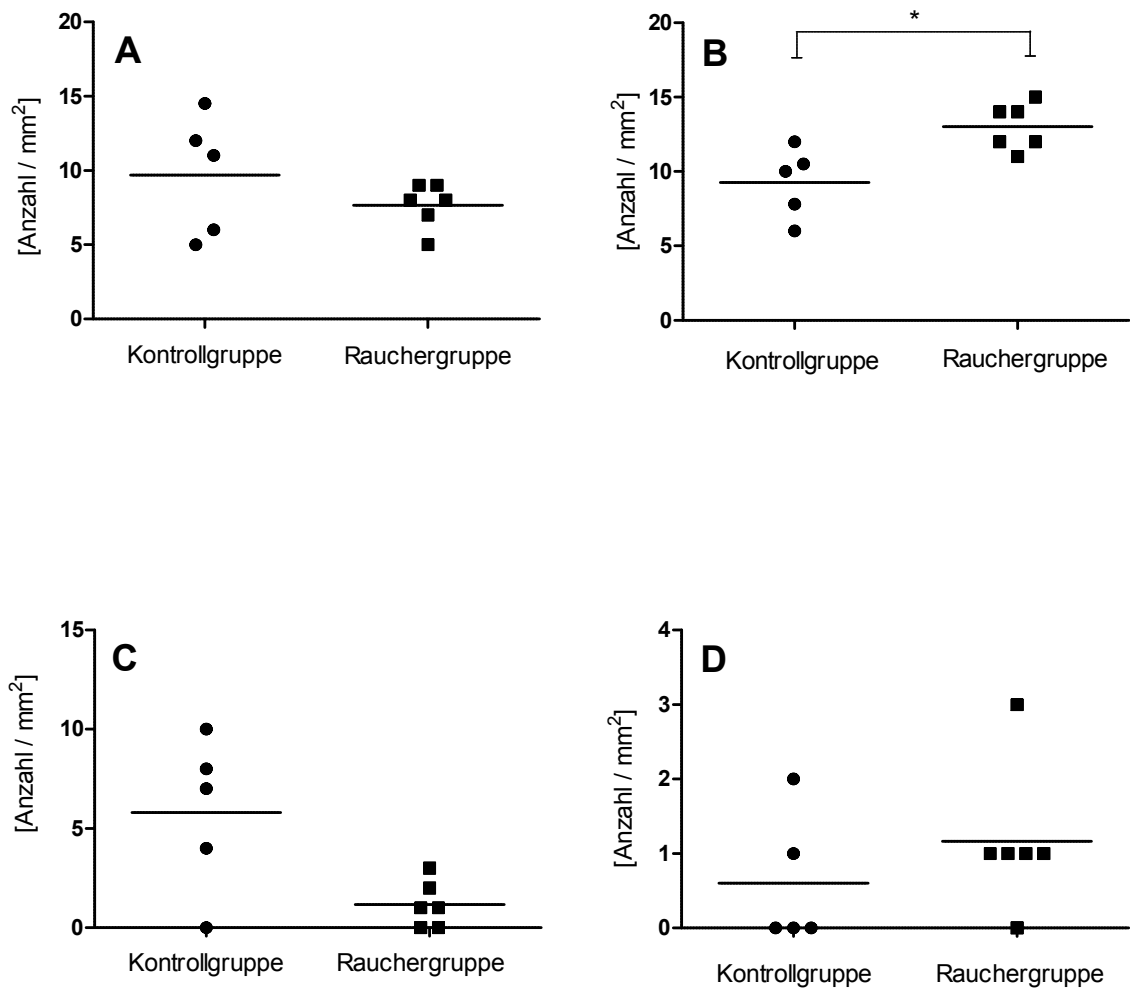


Abb. 22 A, B, C, D: A zeigt die graphische Verteilung der Makrophagen; B zeigt die graphische Verteilung der neutrophilen Granulozyten, C zeigt die graphische Verteilung der freien Latex-Beads, D zeigt die graphische Verteilung der Konglomerate. Die schwarze Linie entspricht jeweils dem Mittelwert. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind gekennzeichnet mit *.

5.4. Ergebnisse der Versuchsgruppe III:

5.4.1. Analyse des Zeitintervalls 0-10 Minuten Newman vs. LS1

Die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen der Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium Newman (NTF) infiziert wurden ergab einen Mittelwert von 9,7 Stück / 0,2 mm² (SD = 2,4 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium LS1 infiziert wurde lieferte den Mittelwert von 2,4 Stück / 0,2 mm² (SD = 1,2 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Vergleicht man beide Versuchsgruppen, so stellt sich ein signifikanter Unterschied heraus. (Abbildung 23 A)

5.4.2. Analyse des Zeitintervalls 10-20 Minuten Newman vs. LS1

Die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen der Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium Newman infiziert wurden ergab einen Mittelwert von 13,4 Stück / 0,2 mm² (SD = 1,7 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium LS1 infiziert wurde lieferte den Mittelwert von 3,8 Stück / 0,2 mm² (SD = 1,2 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Vergleicht man beide Versuchsgruppen, so stellt sich ein signifikanter Unterschied heraus. (Abbildung 23 B)

5.4.3. Analyse des Zeitintervalls 20-30 Minuten Newman vs. LS1

Die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen der Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium Newman infiziert wurden ergab einen Mittelwert von 14,4 Stück / 0,2 mm² (SD = 2,4 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium LS1 infiziert wurde lieferte den Mittelwert von 4,8 Stück / 0,2 mm² (SD = 1,2 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Vergleicht man beide Versuchsgruppen, so stellt sich ein signifikanter Unterschied heraus. (Abbildung 23 C)

5.4.4. Analyse des Zeitintervalls 30-40 Minuten Newman vs. LS1

Die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen der Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium Newman infiziert wurden ergab einen Mittelwert von 15,5 Stück / 0,2 mm² (SD = 4,2 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium LS1 infiziert wurde lieferte den Mittelwert von 5,2 Stück / 0,2 mm² (SD = 1,9 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Vergleicht man beide Versuchsgruppen, so stellt sich ein signifikanter Unterschied heraus. (Abbildung 23 D)

5.4.5. Analyse des Zeitintervalls 40-50 Minuten Newman vs. LS1

Die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen der Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium Newman infiziert wurden ergab einen Mittelwert von 15,1 Stück / 0,2 mm² (SD = 6,3 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium LS1 infiziert wurde lieferte den Mittelwert von 7 Stück / 0,2 mm² (SD = 3,3 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Vergleicht man beide Versuchsgruppen, so stellt sich ein signifikanter Unterschied heraus. (Abbildung 23 E)

5.4.6. Analyse des Zeitintervalls 50-60 Minuten Newman vs. LS1

Die Anzahl der phagozytoseaktiven Zellen der Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium Newman infiziert wurden ergab einen Mittelwert von 17 Stück / 0,2 mm² (SD = 8,1 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterium LS1 infiziert wurde lieferte den Mittelwert von 8,6 Stück / 0,2 mm² (SD = 2,9 Stück / 0,2 mm²; N = 3). Vergleicht man beide Versuchsgruppen, so stellt sich ein signifikanter Unterschied heraus. (Abbildung 23 F)

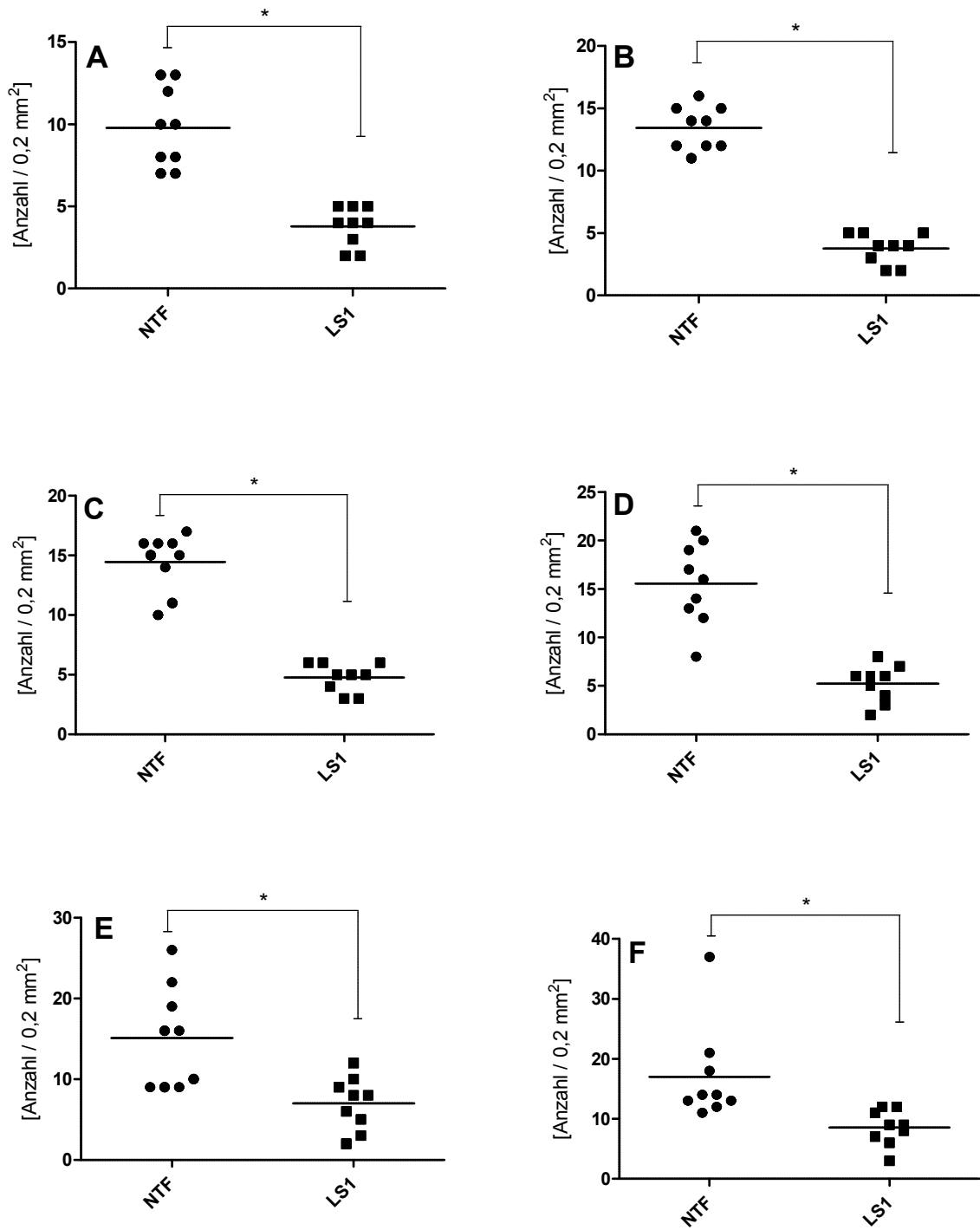


Abb. 23 A, B, C, D: A zeigt das Zeitintervall 0-10 min, B zeigt das Zeitintervall 10-20 min, C zeigt das Zeitintervall 20-30 min, D zeigt das Zeitintervall 30-40 min, E zeigt das Zeitintervall 40-50 min, F zeigt das Zeitintervall 50-60 min. Die schwarze Linie entspricht jeweils dem Mittelwert. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind gekennzeichnet mit *.

5.4.7. Vergleich der Kinetiken zwischen Newman und LS1

Um eine qualitative Aussage bezüglich der Kinetik treffen zu können, wurden die Mittelwerte beider Versuchsgruppen für das jeweilige Zeitintervall in einen zeitlichen Verlauf zu einander gesetzt (Abbildung 24). Hierbei konnte folgendes festgestellt werden:

Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterienstamm Newman infiziert wurde, zeigte zu Beginn der Bildaufnahme einen schnellen Anstieg der sichtbaren phagozytoseaktiven Zellen (Abbildungen 25 und 27). Nach ca. 20 Minuten wurde ein Plateauwert erreicht, der bis zum Ende der Beobachtungszeit konstant blieb.

Gegensätzlich hierzu verhielt sich die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterienstamm LS1 (Abbildungen 26 und 28) infiziert wurde. Hier konnte von Anfang bis Ende ein sehr langsamer, tendenzieller Anstieg der sichtbaren phagozytoseaktiven Zellen festgestellt werden, vergleichbar mit einem gleichmäßigen Anstieg (Abbildung 24). Abbildung 29 zeigt exemplarisch einen mit Bakterien prall gefüllten Alveolarmakrophagen.

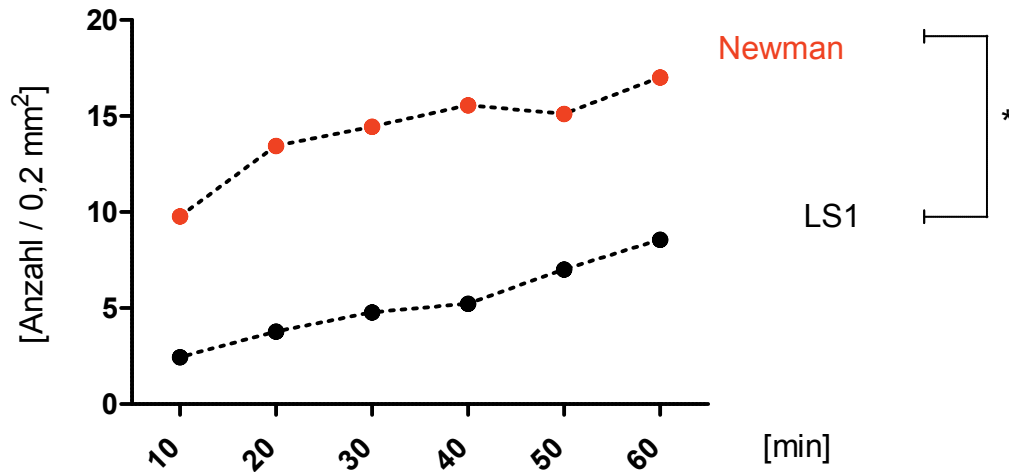


Abb. 24: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte für die Bakterienstämme Newman (rot) sowie LS1 (schwarz) für das jeweilige Zeitintervall.

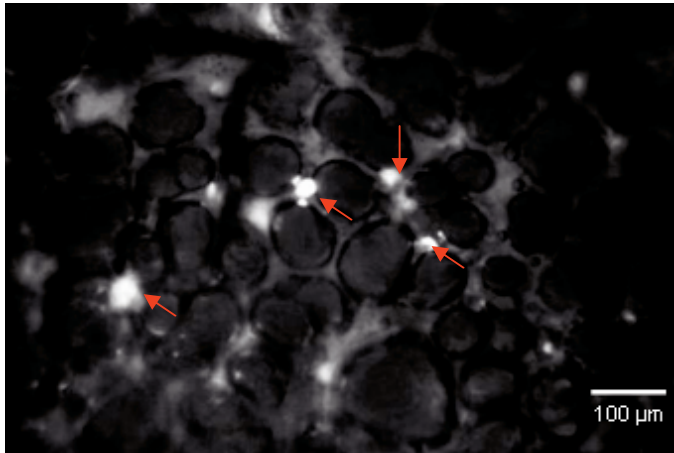


Abb. 25: Die Abbildung zeigt eine *in vivo* Aufnahme einer rechten Lunge 10 Minuten nach Infektion mit dem Bakterienstamm Newman. Die roten Pfeile zeigen phagozytoseaktive Zellen, die durch die Aufnahme CFSE markierter Bakterien hell leuchten.

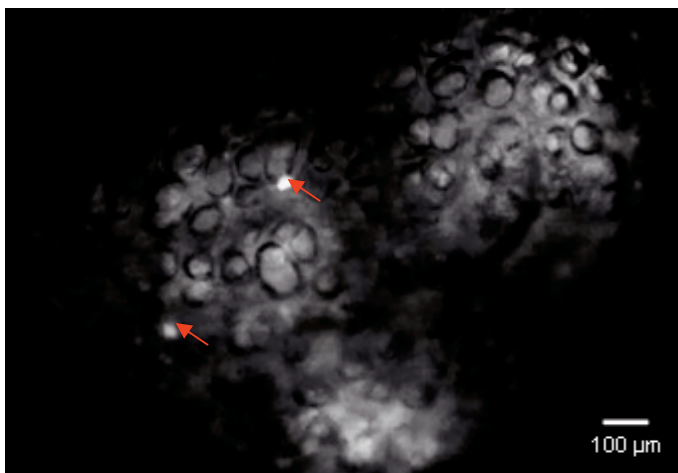


Abb. 26: Die Abbildung zeigt eine *in vivo* Aufnahme einer rechten Lunge 10 Minuten nach Infektion mit dem Bakterienstamm LSI. Die roten Pfeile zeigen phagozytoseaktive Zellen, die durch die Aufnahme CFSE markierter Bakterien hell leuchten.

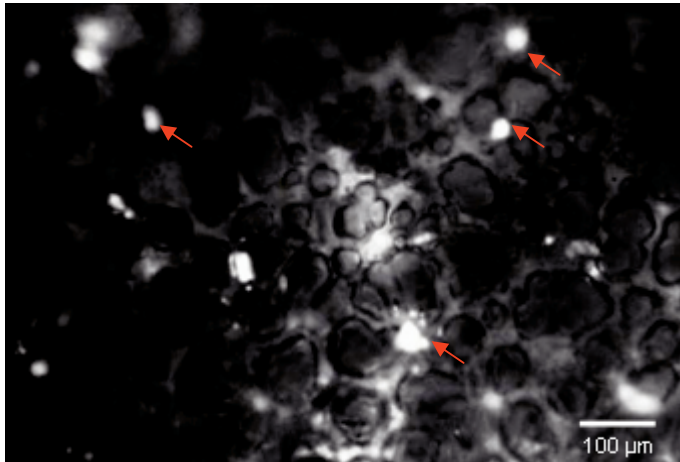


Abb. 27: Die Abbildung zeigt eine *in vivo* Aufnahme einer rechten Lunge 40 Minuten nach Infektion mit dem Bakterienstamm Newman. Die roten Pfeile zeigen phagozytoseaktive Zellen, die durch die Aufnahme CFSE markierter Bakterien hell leuchten.

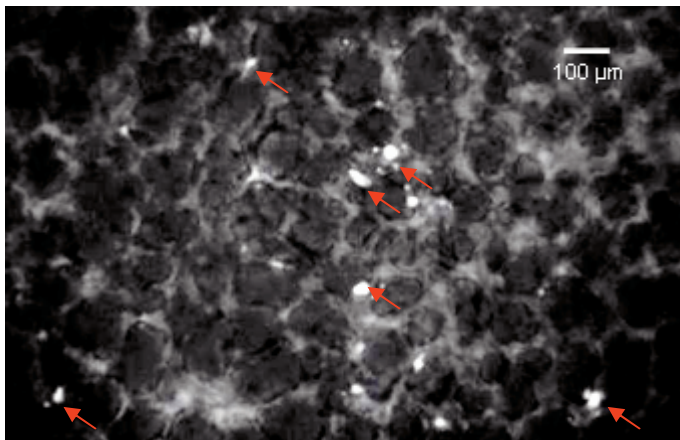


Abb. 28: Die Abbildung zeigt eine *in vivo* Aufnahme einer rechten Lunge 40 Minuten nach Infektion mit dem Bakterienstamm LSI. Die roten Pfeile zeigen phagozytoseaktive Zellen, die durch die Aufnahme CFSE markierter Bakterien hell leuchten. Eine Zunahme der phagozytoseaktiven Zellen vergleichend zu Abbildung 26 ist zu erkennen.

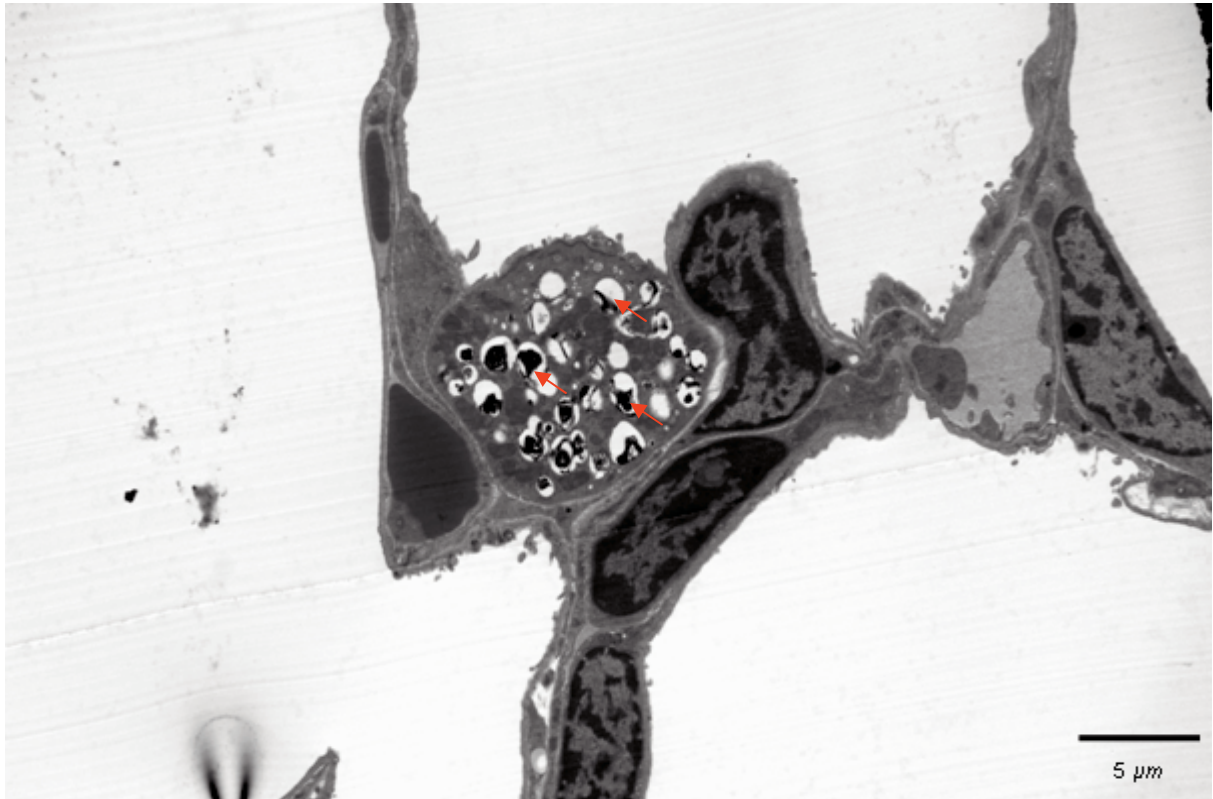


Abb. 29: Die Abbildung zeigt eine Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Alveolarmakrophagen, der mit Bakterien gefüllt ist (rote Pfeile). Während des Versuches wurden dem Tier 100 μ l fluoreszenzmarkierte Bakterien (10^9 mmol CFSE $6,5 \times 10^9$ Bakterien/ml) vom Typ Newman appliziert. Nach Beendigung des Versuches wurde die rechte Lunge entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung konserviert. In dem Bild sind bereits die Abbauvorgänge im Alveolarmakrophagen sehen. Das Bild wurde von Herrn PD. Dr. med. Dirk Theegarten, Essen erstellt.

6. Diskussion

6.1. Diskussion der Methodik

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit teilt sich in drei Abschnitte (I, II, III), deren Ziel die Etablierung der Intravitalmikroskopie der Alveole an der Mauslunge war. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, durch den Einsatz fluoreszenzmarkierte Latex-Beads Alveolarmakrophagen und andere phagozytoseaktive Zellen sichtbar zu machen. Weiterhin stellte sich die Frage, ob über die Trachea instillierte Latex-Beads bzw. Bakterien die Lungenperipherie überhaupt erreichen oder bereits in der Trachea oder den Bronchien abgefangen werden. Ferner sollte geklärt werden, ab welcher Größe Partikel sich in der Alveole mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie darstellen lassen, und ob es quantitative Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienstämmen gibt.

Das Verfahren zur Beobachtung fluoreszenzmarkierter Partikel oder Bakterien in der Mauslunge, im Folgenden als Homburger-Modell bezeichnet, orientierte sich an dem von TABUCHI etablierten Modell der pulmonalen Mikrozirkulation. Dieses Modell wurde für unsere Bedürfnisse so modifiziert, dass ein schnelles und einfaches Verfahren entwickelt und etabliert werden konnte. Anstelle eines Deckgläschens, das mit Acrylkleber auf der Thoraxwand befestigt wird, nutzt das Homburger-Modell eine Halteklemme, durch die das Deckgläschen auf der Lungenoberfläche positioniert werden kann und durch die Adhäsionskräfte eines Tropfens NaCl auf der Lungenoberfläche fixiert wird. Diese Maßnahme dient der Verbesserung der Optik. Weiterhin ermöglicht die im Homburger-Modell durchgeführte Thorakotomie die Betrachtung der gesamten rechten Lunge, wahlweise auch der linken Lunge. Nach mehrfacher erfolgreicher Präparation in einigen Vorversuchen erfolgte die Datenerhebung zum I. Teil dieser wissenschaftlichen Studie. Hierbei konnten vergleichbare Daten zu TABUCHI's publizierten Ergebnissen erhoben werden. (vgl. Diskussion der Modelle und Ergebnisse). Während der Datenerhebungen für diese wissenschaftliche Studie, wurde ein weiteres Modell zur Intravitalmikroskopie der Lunge vorgestellt. Dieses Modell (Looney et al., 2011) verfolgt die Untersuchung der Leukozytenadhäsion in Lungengefäßen. Die Vor- und Nachteile der intravitalmikroskopischen Modelle werden in Kapitel 6.2. diskutiert. Zur Beobachtung von Alveolarmakrophagen und anderen phagozytoseaktiven Zellen wurden fluoreszenzmarkierte Latex-Beads verwendet. Diese wurden in definierten Mengen den Versuchstieren über den Trachealtubus verabreicht.

Um für alle Tiere die gleichen Voraussetzungen zu schaffen, erfolgte die Instillation über den Inspirationsschlauch des Beatmungsgerätes. Während der IVM konnten hell leuchtende, runde Strukturen beobachtet werden. Zur weiteren Abklärung und Identifizierung dieser hell leuchtenden Strukturen führten wir eine BAL durch und inkubierten die Zellen mit Latex-Beads. Die hell leuchtenden Zellen der BAL waren identisch mit den Zellen der intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Weiterhin wurden histologische Schnitte der Lungen angefertigt, in denen sehr deutlich Alveolarmakrophagen identifizierbar sind, die Latex-Beads phagozytiert haben. Zur weiteren Abklärung wurden elektronenmikroskopische Bilder erstellt, die die vorher beschriebenen Vermutungen bestätigten. Nach der Identifizierung von Alveolarmakrophagen konnten hierbei zum ersten Mal phagozytoseaktive Zellen *in vivo* in der Mauslunge beobachtet werden. Somit konnte auch die Fragestellung bezüglich der Erreichbarkeit der fluoreszenzmarkierten Partikel/Bakterien in der Lungenperipherie beantwortet werden. Zur Etablierung und der Vergleichbarkeit mit bereits publizierten Daten (Tabuchi et al., 2008) applizierten wir den Tieren die Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 6G sowie FITC-Dextran. Die hierbei gemachten Befunde sind vergleichbar mit den bereits publizierten Daten des pulmonalen Mikrozirkulations-Modells nach TABUCHI. Weiterhin interessierte uns die Fragestellung, bis zu welcher Größe sich applizierte Partikel/Pathogene in der Mauslunge mit Hilfe der Intravitalmikroskopie darstellen lassen. Es wurden hierbei Experimente mit Latex-Beads unterschiedlicher Größe, sowie mit Nanopartikeln gemacht. Hier konnten wir feststellen, dass mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie einzelne Partikel bis zu einer Größe von 100 nm wahrnehmbar waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits publiziert (Roller et al., 2011). Nachdem wir das „Homburger – Modell“ etabliert hatten, führten wir Versuche mit Bakterienstämmen durch. Wir wählten hierfür nach einigen Vorversuchen CFSE markierte *Staphylococcus aureus* Stämme. Die Applikation dieser Bakterien erfolgte bei allen Tieren über den Inspirationsschlauch des Beatmungsgerätes, so dass für alle Tiere gleiche Voraussetzungen geschaffen wurden. Zum Einsatz kamen hierbei die Stämme Newman und LS1 [Duthie et al., 1952; Bremell et al., 1992], die uns von der Mikrobiologie Homburg zur Verfügung gestellt wurden. Hierbei konnten wir für die beiden Stämme folgendes feststellen: Die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterienstamm NTF infiziert wurde, zeigte zu Beginn der Bildaufnahme einen schnellen Anstieg der sichtbaren phagozytoseaktiven Zellen. Nach ca. 30 Minuten wurde ein Plateauwert erreicht, der bis zum Ende der Beobachtungszeit konstant blieb. Auffällig waren hierbei die hohen Zahlen an phagozytoseaktiven Zellen, die sichtbar waren. Gegensätzlich hierzu verhielt sich die Versuchsgruppe, die mit dem Bakterienstamm LS1 infiziert wurde. Hier konnte von Anfang

bis Ende ein sehr langsamer, jedoch kontinuierlicher Anstieg der sichtbaren phagozytoseaktiven Zellen festgestellt werden, vergleichbar mit einem tendenziellen Anstieg. In einer weiteren Statistik ermittelten wir für alle Zeitintervalle die Mittelwerte für beide Bakterienstämme und konnten vergleichend für die beiden Bakterienstämme für alle Zeitintervalle signifikante Unterschiede feststellen.

6.2. Diskussion der Modelle

Als Untersuchungstechnik wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt, da sie die direkte Visualisierung der pulmonalen Phagozyten ermöglicht. Während andere Verfahren die pulmonale Mikrozirkulation (Tabuchi et al., 2008) bzw. Leukozytenadhäsion in Gefäßen (Looney et al., 2011) zulassen, ermöglicht das Homburger Modell zusätzlich die Beobachtung der Abwehrmechanismen der murinen Alveole. Dies wurde bisher nicht gezeigt. Bei allen drei Techniken (siehe Tabelle), deren Vor- und Nachteile im Folgenden erörtert werden, handelt es sich um finale Versuche.

Das intravitalmikroskopische Modell nach TABUCHI ist mit einem sehr hohen Zeitaufwand verbunden. Verantwortlich hierfür ist die aufwendige Präparation des Brustkorbes, an deren Ende die Befestigung eines Deckgläschens mit Acrylkleber erfolgt. Bedingt durch die Anlage eines ZVK's kann das Tier über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden, sowie Blutparameter erhoben werden. Weiterhin ermöglicht der Einsatz des Deckgläschens die Untersuchung einer Lunge im physiologischen Zustand, dem negativen Interpleuraldruck. Dies ist sicherlich ein Pluspunkt gegenüber den beiden folgenden Modellen.

Von Nachteil sind allerdings die geringe Oberfläche, 7-10 mm, die zur Analyse zur Verfügung steht, sowie der Einsatz eines Acrylklebers, der eventuell toxisch auf das Mausgewebe wirkt.

Das zweite Modell, das erst während der Erhebung dieser wissenschaftlichen Studie veröffentlicht wurde, ist das Modell nach LOONEY. Hierbei handelt es sich um ein Mausmodell, dessen Ziel die Analyse der Leukozytenadhäsion in Gefäßen verfolgt. Realisiert wird dieses Vorhaben durch den Einsatz eines Stahlringes (Durchmesser 12 mm) an dessen Unterrand eine Vakuumpumpe befestigt ist. Durch Anbringen des Stahlringes auf der linken Lunge wird durch Unterdruck eine Sogwirkung auf die Lunge ausgeübt und die Lungenoberfläche am Stahlring fixiert und stabilisiert. Diese Sogwirkung könnte allerdings zu einer Veränderung der pulmonalen Mikrozirkulation führen, weil es durch die Sogwirkung zu einer Verkleinerung der Oberfläche der Alveolen kommen kann. Dieser Sog könnte zu einer Verschlechterung der Oxygenierung der Lunge führen. Bewegungsartefakte, die die Auswertung des Bildmaterials erschweren, werden bei diesem Modell auf ein Minimum reduziert. Der Hauptnachteil dieser Technik ist allerdings die geringe Lungenoberfläche von 4 mm, die zur Analyse herangezogen werden kann.

Beim Homburger Modell handelt es sich um einen intravitalmikroskopischen Ansatz mit dem Ziel die Abwehrzellen der Alveole zu beobachten. Diese Technik erlaubt sowohl die Analyse

der pulmonalen Mikrozirkulation als auch die Beobachtung der pulmonalen Abwehrzellen. Hierbei wird durch eine Thorakotomie der Brustkorb eröffnet, so dass dem Untersucher wahlweise die rechte oder linke Lunge zur Untersuchung zur Verfügung steht. Im Gegensatz zu den beiden oben genannten Verfahren besticht das Homburger Modell durch Einfachheit und Schnelligkeit. Es kann auf den Einsatz eines Acrylklebers verzichtet werden. Der Einsatz eines PEEP reduziert die Bewegungsartefakte die durch Herz- und Atemfrequenz hervorgerufen werden und stabilisiert die Lunge während der Untersuchung. Der Einsatz eines PEEP kann auch von Nachteil sein, so kann es durch einen zu hohen Druck zu einer Verringerung des venösen Rückflusses zum Herzen kommen, wodurch das Herzzeitvolumen sinken kann.

Bedingt durch den großen Eingriff, der zu Stress, Katecholaminfreisetzungen und Flüssigkeitsverlusten führt, ist das Homburger Modell eine zeitlich limitierte Untersuchungstechnik, die eine Stabilisierung der Tiere von 90 Minuten post OP-Beginn zulässt.

Tabelle 2: Übersicht über die Vor- und Nachteile der verschiedenen Techniken

Arbeitsgruppe	Vorteile	Nachteile
Kübler	<ul style="list-style-type: none"> - langfristige Stabilisierung - geschlossener Thorax = „physiologische Bedingungen“ 	<ul style="list-style-type: none"> - zeitintensive OP-Technik - kleine Auswertefläche - chemische Vorgänge am Gewebe durch Acrylkleber - finaler Versuch
Looney	<ul style="list-style-type: none"> - Reduzierung d. Bewegungsartefakte 	<ul style="list-style-type: none"> - kleine Beobachtungsfläche -Veränderung d. pulmonalen Mikrozirkulation - finaler Versuch
Homburger-Modell	<ul style="list-style-type: none"> - zeitsparende OP-Technik - große Auswertefläche zur Beobachtung der Abwehrzellen in der Alveole - Analyse d. pulmonalen Mikrozirkulation 	<ul style="list-style-type: none"> - finaler Versuch - limitierte Beobachtungszeit - PEEP

6.3. Diskussion der Ergebnisse

Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit am Mausmodell gezeigt werden, dass phagozytoseaktive Alveolarmakrophagen durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Partikeln bzw. Bakterien beobachtet werden können. Da diese Fragestellung an einem *in vivo* Modell bisher nicht berichtet werden konnte liegen hierfür in der Literatur auch keine vergleichbaren Ergebnisse vor.

Wir verwendeten für unsere Fragestellungen einen modifizierten Operationsansatz, der uns sowohl die Analyse der pulmonalen Mikrozirkulation, als auch die Beobachtung der Abwehrmechanismen der murinen Lunge ermöglichte.

Das hierbei etablierte Homburger Modell basiert auf einer Thorakotomie, die die Untersuchung wesentlich größerer Bereiche der Lunge ermöglicht.

Durch die offene Operationstechnik musste zuerst geklärt werden, ob es durch den fehlenden negativen intrathorakalen Druck zu einer Veränderung der pulmonalen Mikrozirkulation kommt. Hierfür wurden im I. Teil dieser wissenschaftlichen Studie pulmonale Mikrozirkulationsparameter bestimmt.

Die erhobenen Daten zeigten in Bezug zu Arterioldurchmesser, Blut-pH-Wert, sowie Fließgeschwindigkeit vergleichbare Ergebnisse zu bereits publizierten Daten (Tabuchi et al., 2008). So ermittelten wir arterioläre Durchmesser für mittlere Arteriolen von 14 μm - 49 μm , TABUCHI ermittelte Werte für den mittleren arteriolären Durchmesser von 30 μm - 50 μm . Der Blut-ph-Wert ergab für unsere Versuche Werte von ca. 7,4 nach 30 Minuten Operationseingriff, bei TABUCHI im Mittel von 7,4.

Bedingt durch den großen Eingriff und den damit verbunden Stress für das Tier, kommt es zu einer Veränderung der Blutparameter. Jedoch haben die erzielten Ergebnisse gezeigt, dass es sich beim Homburger – Modell um eine alternative, schnelle Operationstechnik handelt.

Im II. Teil versuchten wir in einem Kurzzeitmodell die Aktivität von Alveolarmakrophagen sowie neutrophilen Granulozyten, die Zigarettenrauch ausgesetzt wurden zu untersuchen. Bisherige Studien haben eine Anzahl von 4800 Stoffen im Tabakrauch ermittelt, von denen eine Vielzahl toxische und kanzerogene Wirkungen auf die Zelle haben [Hoffmann et al., 2001; Smith et al., 2004]. So ist mittlerweile bekannt, dass Tabakrauch zu einer gesteigerten Produktion von proinflammatorischen Mediatoren führt, weiterhin vermehrt reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt werden und der Reifungsprozess der Alveolarmakrophagen

durch Tabakrauch reduziert ist. Durch die vermehrte Produktion proinflammatorischer Mediatoren kommt es zu einem Anstieg der Makrophagenanzahl in der Lunge, deren Aktivität durch die gehemmte Reifung jedoch reduziert ist. [Mehta et al., 2008; Stämpfli und Anderson, 2009; Doyle et al., 2010].

Im Gegensatz zu der wissenschaftlichen Literatur [Stämpfli und Anderson, 2009] zeigen die Ergebnisse, dass die Tiere, die Tabakrauch ausgesetzt werden, eine tendenziell höhere Phagozytoseaktivität aufweisen. Bezüglich der Anzahl der Alveolarmakrophagen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die neutrophilen Granulozyten zeigten hingegen einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Rauchergruppe. Bedingt durch die Anzahl der freien Latex-Beads, der jeweiligen Tiergruppe, lässt sich für die Phagozyten der Rauchergruppe eine tendenziell höhere Aktivität ableiten. Es stellt sich die Frage, wieso es zu einer Diskrepanz zwischen den bereits publizierten Daten und unseren Datenerhebungen kommt. Eine Begründung könnte in der kurzzeitigen Berauchung der Tiere gesehen werden. Die kurzzeitige Exposition der Tiere mit Tabakrauch führt zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivität der Alveolarmakrophagen. Im Kurzzeitmodell kommt es lediglich zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten und durch die im Tabakrauch enthaltenen Stoffe zu einer verstärkten Phagozytose von Fremdkörpern, den Latex-Beads. Verantwortlich für diese Stimulierung der Phagozyten könnte das im Tabakrauch enthaltene LPS (Lipopolysaccharid) sein, über dessen Einfluss auf Makrophagen in bereits vorausgegangen Studien berichtet wurde [Doyle et. al, 2010; Szymanski et. al, 2012].

Im III. Teil sollten Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Bakterienstämmen in der Lunge beobachtet werden. Eingesetzt wurden die beiden *Staphylococcus aureus* Stämme Newman und LS1. Die Applikation der Bakterien erfolgte bei allen Tieren über den Inspirationsschlauch des Beatmungsgerätes, so dass für alle Tiere die gleichen Voraussetzungen geschaffen wurden. Hierbei konnten für alle Zeitintervalle signifikante Unterschiede für die Anzahl der phagozytoseaktiven Alveolarmakrophagen beobachtet werden. Es stellt sich die Frage, wie es zu diesen Unterschieden kommt. Als Möglichkeit kommt eine unterschiedliche Adhärenz der Bakterien in den oberen Luftwegen in Frage. [Proud und Leigh, 2011; Lukens et al., 2009]. Durch Schnittpräparate der oberen Luftwege und deren histologische Auswertung könnte man dies herausfinden. Sehr wahrscheinlich sind unterschiedliche Virulenzfaktoren für beide Bakterien. Dadurch bedingt könnte es zu unterschiedlichen Opsonierungen kommen, deren Resultat eine unterschiedliche

Makrophagenaktivierung wäre. Ursächlich hierfür könnten die Unterschiede beider Bakterienstämme in ihrem Eisenstoffwechsel sein. [Duthie et al., 1952; Bremell et al., 1992] Ob diese Thesen zutreffen müssen in nachfolgenden intravitalmikroskopischen Untersuchungen mit weiteren Bakterienstämmen untersucht werden.

Vergleicht man abschließend die bereits häufig eingesetzte Technik der Precision Lung Cut Slices (PLCS = Lungenpräzisionsschnitte) mit der IVM so lassen sich folgende Vor- bzw. Nachteile feststellen. Ein Vorteil der PCLS ist der Einsatz von humanem Lungengewebe zur Untersuchung von u.a. Streptokokken [Szymanski et al, 2012]. Ein Nachteil ist die fehlende Perfusion, da es sich um ein *in vitro* Modelle handelt. Betrachtet man die Technik der IVM, so ist die vorhandene Perfusion der Lunge sicherlich ein Vorteil gegenüber der PCLS. Das fehlende humane Gewebe aber wieder ein Nachteil. Insgesamt lässt sich sagen, dass eine Technik, die sowohl die Vorteile der *in vivo* Mikroskopie, als auch die Vorteile der *in vitro* Mikroskopie in sich vereint die bestmögliche Lösung wäre. Solange diese Technik nicht gefunden wird, müssen die Vorteile und Nachteile sowohl der IVM als auch der PLCS in Kauf genommen werden.

Insgesamt stellt die IVM einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der immunologischen Vorgänge in der Mauslunge dar.

Tabelle 3: Übersicht über die Vor- und Nachteile von PCLS vs. IVM

Technik	Vorteile	Nachteile
IVM	- Perfusion bleibt erhalten	- keine humane Lunge
Precision Lung Cut Slices (PCLS) = Lungenpräzisionsschnitte	- humane Lunge zur Untersuchung	- keine Perfusion

6.4. Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

Bisher wurde nicht über die Abwehrmechanismen in der Alveole in einem *in vivo* Modell berichtet. Es gibt verschiedene Tiermodelle, deren Ziel die Analyse der pulmonalen Mikrozirkulation ist, Makrophagen sowie Bakterien wurden allerdings noch nicht in der Lunge beobachtet. Dies liegt zum einen an den schwierigen Bedingungen bei der *in vivo* Mikroskopie der Mauslunge und zum anderen an dem bisher fehlenden Fokus zur Beobachtung von Erreger-Wirts-Interaktionen in der Alveole. Mit der Etablierung des Homburger Modells zur Intravitalmikroskopie der Mauslunge konnte eine beginnende Infektion in der Mauslunge *in vivo* untersucht werden. Diese Möglichkeit kann in folgenden Versuchen genutzt werden, um Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienarten, -stämmen, sowie Mutanten zu untersuchen. Im Vordergrund stehen hierbei Versuche mit Pneumokokken. Hierzu könnten mit Bakterien infizierte Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden und der Therapieverlauf dokumentiert werden. Durch Einsatz von MALP-2 (macrophage-activating lipopeptide-2), welches Infektionen milder verlaufen lässt [Repe et al., 2009], dessen Wirkweise aber noch nicht aufgeklärt wurde, könnte in einem *in vivo* Modell der Heilungsprozess unterstützt und die Wirkungsmechanismen von MALP-2 *in vivo* untersucht werden. Weiterhin könnten Tiere mit chronischen Infektionen über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Von besonderem Interesse ist langfristig die Analyse von Bakterien-Makrophagen-Interaktionen die unter Antibiose zu einer Optimierung der Pneumonietherapie führen könnte.

7. Literaturverzeichnis

1. Abd El Rahman S, Winter C, El-Kenawy A, Neumann U, Herrler G (2010) *Differential sensitivity of well-differentiated avian respiratory epithelial cells to infection by different strains of infectious bronchitis virus*. J Virol. 84:8949-52.
2. Barten G, Schütte H, Bals R, Pletz M, Rohde G (2011) *Symposium: Pneumonia 2010 - state of the art*. Pneumologie. 65:223-8.
3. Bauer CM, Zavitz CC, Botelho FM, Lambert KN, Brown EG, Mossman KL, Taylor JD, Stämpfli MR (2010) *Treating viral exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: insights from a mouse model of cigarette smoke and H1N1 influenza infection*. PLoS One. 5:e13251.
4. Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T; CAPNETZ Study Group (2006) *CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia*. J Intern Med. 260:93-101.
5. Berdnikovs S, Pavlov VI, Abdala-Valencia H, McCary CA, Klumpp DJ, Tremblay ML, Cook-Mills JM (2012) *PTPIB deficiency exacerbates inflammation and accelerates leukocyte trafficking in vivo*. J Immunol. 188:874-84.
6. Borte G (1985) *Life and places of activity of Julius Cohnheim*. Zentralbl Allg Pathol. 130:291-7.
7. Bremell T, Abdelnour A, Tarkowski A (1992) *Histopathological and serological progression of experimental Staphylococcus aureus arthritis*. Infect Immun. 60:2976-85.
8. Duthie ES, Lorenz LL (1952) *Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity*. J Gen Microbiol. 6:95-107.
9. Doyle I, Ratcliffe M, Walding A, Vanden Bon E, Dymond M, Tomlinson W, Tilley D, Shelton P, Dougall I (2010) *Differential gene expression analysis in human monocyte-derived macrophages: impact of cigarette smoke on host defence*. Mol Immunol. 47:1058-65.

10. Edwards K, Braun KM, Evans G, Sureka AO, Fan S (1999) *Mainstream and sidestream cigarette smoke condensates suppress macrophage responsiveness to interferon gamma*. Hum Exp Toxicol. 18:233-40.
11. Ebsen M, Mogilevski G, Anhenn O, Maiworm V, Theegarten D, Schwarze J, Morgenroth K (2002) *Infection of murine precision cut lung slices (PCLS) with respiratory syncytial virus (RSV) and chlamydomphila pneumoniae using the Krumdieck technique*. Pathol Res Pract. 198:747-53.
12. Goris K, Uhlenbruck S, Schwegmann-Wessels C, Köhl W, Niedorf F, Stern M, Hewicker-Trautwein M, Bals R, Taylor G, Braun A, Bicker G, Kietzmann M, Herrler G (2009) *Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection*. J Virol. 83:1962-8.
13. Gross JF, Aroesty J (1972) *Mathematical models of capillary flow: a critical review*. Biorheology. 9:225-64.
14. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K (2001) *The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder*. Chem Res Toxicol. 14:767-90.
15. Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. (1997) *[Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]*. Biomed Tech (Berl). 42:168-75
16. Höffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R, Sitter H; Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie; Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin; Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk CAPNETZ (2009) *Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany*. Pneumologie. 63:e1-68.
17. Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM (2008) *Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation*. J Appl Physiol. 104:338-46.

18. Looney MR, Thornton EE, Sen D, Lamm WJ, Glenn RW, Krummel MF (2011) *Stabilized imaging of immune surveillance in the mouse lung*. Nat Methods. 8:91-6.
19. Lukens MV, Kruijssen D, Coenjaerts FE, Kimpen JL, van Bleek GM (2009) *Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node*. J Virol. 83:7235-43.
20. Mehta H, Nazzal K, Sadikot RT (2008) *Cigarette smoking and innate immunity*. Inflamm Res. 57:497-503.
21. Marquardt A, Halle S, Seckert CK, Lemmermann NA, Veres TZ, Braun A, Maus UA, Förster R, Reddehase MJ, Messerle M, Busche A (2011) *Single cell detection of latent cytomegalovirus reactivation in host tissue*. J Gen Virol. 92:1279-91.
22. Proud D, Leigh R (2011) *Epithelial cells and airway diseases*. Immunol Rev. 242:186-204.
23. Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Müller HC, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M. (2009) *Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia*. Am J Respir Cell Mol Biol. 40:474-81
24. Roller J, Laschke MW, Tschernig T, Schramm R, Veith NT, Thorlacius H, Menger MD (2011) *How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung*. Nanomedicine 7:753-62.
25. Schneider P, Foitzik T, Kahrau S, Podufal A, Buhr HJ (2001) *An experimental rat model for studying pulmonary microcirculation by in vivo videomicroscopy*. Microvasc Res. 2001 62:421-34.
26. Smith CJ, Perfetti TA, Garg R, Martin P, Hansch C (2004) *Percutaneous penetration enhancers in cigarette mainstream smoke*. Food Chem Toxicol. 42:9-15.
27. Stämpfli MR, Anderson GP (2009) *How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer*. Nat Rev Immunol. 9:377-84.
28. Sumen C, Mempel TR, Mazo IB, von Andrian UH (2004) *Intravital microscopy: visualizing immunity in context*. Immunity. 21:315-29.

29. Szymanski KV, Toennies M, Becher A, Fatykhova D, N'guessan PD, Gutbier B, Klauschen F, Neuschaefer-Rube F, Schneider P, Rueckert J, Neudecker J, Bauer TT, Dalhoff K, Drömann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC (2012) *Streptococcus pneumoniae* induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. Eur Respir J. [Epub ahead of print]

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Thomas Tschernig bedanken. Er gab mir nicht nur die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit, sondern unterstützte mich stets durch Ratschläge und gute Betreuung. Er steht mir mit Rat und Tat zur Seite.

Für interessante Diskussionen, konstruktive Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben möchte ich mich bedanken bei Herrn Professor Dr. M. Menger, Herrn PD. Dr. M. Laschke, Herrn Dr. J. Roller, sowie Herrn PD. Dr. med. Rene Schramm, der durch Hilfestellungen bei der Etablierung der Operationstechnik unterstützend mitgewirkt hat. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. M. Bischoff, Herrn PD. Dr. L. von Müller, Herrn Professor Dr. M. Herrmann für die Bereitstellung der Bakterien bedanken, sowie deren Vorschläge zur Optimierung der Bakterienversuche.

Weiterhin möchte ich mich für die große Hilfe in technischen Fragen, sowie die hervorragende Ausarbeitung der histologischen Schnittpräparate bei Frau Janine Becker bedanken. Mein Dank gilt Frau Karin Hilgert für die immer termingerechte Anfärbung der Bakterien, und die angenehme Atmosphäre im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Mein Dank gilt Herrn Dr. Martin Rosenbruch und Herrn PD. Dr. med. Dirk Theegarten.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiter und Tierpflegern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie Homburg. Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für Geduld und Vertrauen, tatkräftige Unterstützung, aufmunternde Worte, sowie die Ermöglichung meines Studiums.

9. Veröffentlichungen

Reviews

Roller J, Laschke MW, Tschernig T, Schramm R, **Veith NT**, Thorlacius H, Menger MD (2011) *How to detect a dwarf: in vivo imaging of nanoparticles in the lung*. *Nanomedicine* 7:753-62.

Abstracts

Veith NT, von Müller L, Bischoff M, Laschke MW, Schramm R, Roller J, Herrmann M, Menger MD, Tschernig T (2011) *Better targeting of inhaled drugs in lung infections – better treatment?* Posterpräsentation beim 1st International HIPS Symposium 16.06.2011, [Program and Book of Abstracts]

Veith NT, Bischoff M, von Müller L, Laschke MW, Schramm R, Roller J, Herrmann M, Menger MD, Tschernig T (2011) *Intrapulmonale Makrophagen / Bakterien-Interaktion in vivo - ein intravitalmikroskopischer Ansatz*. *Pneumologie* 65: A 62 Vortrag beim Herbsttreffen der Sektionen Zellbiologie, Infektiologie und Tuberkulose der DGP

Veith NT, Bischoff M, von Müller L, Laschke MW, Schramm R, Roller J, Herrmann M, Menger MD, Tschernig T (2012) *Mikroskopische Beobachtung von Alveolen der Mauslunge in vivo*, Vortrag beim 53. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Abstract in Druck

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nils Thomas Veith

Geburtsdatum: 20.06.1984

Geburtsort: Zweibrücken

Eltern: Thomas Veith und
Marion Veith, geb. Ballmann

Schulische Ausbildung

1990 – 1994 Grundsschule, Nüschweiler

1994 – 2003 Immanuel-Kant-Gymnasium, Pirmasens

03/2003 Abschluß der Schullaufbahn mit dem Abitur

Wehrdienst / Zivildienst

05/2003 – 02/2004 Zivildienst UKS Homburg

Wartezeit auf Studienplatz

2004 - 2007 Überbrückung mit Gelegenheitsjobs

Hochschulstudium

10/2007 Beginn des Medizinstudiums an der UKS Homburg

03/2010 1. Ärztliche Prüfung

Zur Zeit Student an der Universität des Saarlandes, Homburg

11. Anhang

11.1. Videosequenzen

11.1.1. Video-FITC-Dextran.avi

Das vorliegende Video zeigt eine *in vivo* Aufnahme der rechten Lunge. Nach erfolgreicher Präparation wurden dem Tier 0,05 ml Fluoreszein-Isothiozyanat (siehe 4.4.1.) retrobulbär verabreicht. Das Video zeigt durch Fluoreszein-Isothiozyanat hell leuchtend angefärbtes Kapillarendothel. Arteriolen, durch die Erythrozyten fließen sind sichtbar. Die umliegenden Alveolen sind nicht belüftet, da die Beatmung für kurze Zeit ausgeschaltet wurde. Die Aufnahme erfolgte in 20-facher Vergrößerung. Das Video wurde mit Hilfe von Windows Movie Maker (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) erstellt.

11.1.2. Video-Latex-Beads.mpg

Das vorliegende Video zeigt eine *in vivo* Aufnahme der rechten Lunge. Nachdem die Präparation durchgeführt wurde, wurden dem Tier 100 µl Latex-Beads (siehe 4.4.3.) intratracheal verabreicht. Das Video zeigt vereinzelte hell leuchtende Latex-Beads, sowie Makrophagen, die durch Phagozytose von Latex-Beads ebenfalls hell leuchten. Umliegend sind Alveolen zu sehen. Das Video besteht aus mehreren kurzen Filmaufnahmen, die zu einem kleinen Film zusammengefügt wurden. Während der Filmaufnahme wurde die Beatmung für einen kurzen Zeitraum ausgeschaltet, um die Anzahl der Bewegungsartefakte zu verringern. Die Aufnahme erfolgte in 20-facher Vergrößerung. Das Video wurde mit Hilfe von Windows Movie Maker (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) erstellt.

11.1.3. Video-Newman-Bakterien.mpg

Das vorliegende Video zeigt eine *in vivo* Aufnahme der rechten Lunge. Nachdem die Präparation durchgeführt wurde, wurden dem Tier 100 µl fluoreszenzmarkierte Bakterien (10 mmol CFSE $6,5 \times 10^9$ Bakterien/ml) vom Typ Newman (siehe 4.4.4.) intratracheal verabreicht. Das Video zeigt vereinzelte kleine hell leuchtende runde Bakterien, sowie große

Makrophagen, die durch Phagozytose von Bakterien ebenfalls hell leuchten. Die umliegenden Alveolen sind nicht belüftet, da die Beatmung für kurze Zeit ausgeschaltet wurde. Das Video besteht aus mehreren kurzen Filmaufnahmen, die zu einem kleinen Film zusammengefügt wurden. Die Aufnahme erfolgte in 5-facher und 20-facher Vergrößerung. Das Video wurde mit Hilfe von Windows Movie Maker (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) erstellt.

