
**Auswirkungen von mütterlichem Rauchen während
der Schwangerschaft auf die Lungenhistologie des
Nachwuchses am Mausmodell**

Nora Krahl



München 2022

Aus dem Comprehensive Pneumology Center,
Institut für experimentelle Pneumologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius

**Auswirkungen von mütterlichem Rauchen während der
Schwangerschaft auf die Lungenhistologie des Nachwuchses am
Mausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nora Krahl
aus München
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Susanne Krauss-Etschmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2022

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 EINFÜHRUNG IN DAS THEMA.....	1
1.2 TABAKKRAUCHEXPOSITION BEI FRAUEN UND SCHWANGEREN	2
1.2.1 Epidemiologie.....	2
1.2.2 Folgen und Risiken pränataler Tabakrauchexposition.....	3
1.2.3 Folgen von Zigarettenrauch auf die Histomorphologie der Lunge bei Menschen	5
1.2.4 Folgen mütterlichen Rauchens im Tiermodell.....	6
1.3 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	6
2 MATERIALIEN UND GERÄTE.....	7
2.1 MATERIALIEN.....	7
2.2 GERÄTE UND SOFTWARE.....	8
2.3 VERSUCHSTIERE	9
3 METHODEN	9
3.1 METHODEN IM TIEREXPERIMENT	9
3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	9
3.1.2 Der Versuchsaufbau - das Rauchmodell für Mäuse	10
3.1.2.1 Verpaarung, Tragzeit und Selektion der Versuchstiere	10
3.1.2.2 Rauchexposition	11
3.1.2.3 Kontrolle der Rauchexposition	13
3.1.2.4 Entnahme der Lungen bei den 3- bzw. 8- Wochen alten Nachkommen.....	13
3.1.2.5 Entnahme fetaler Lungen nach Kaiserschnitt	14
3.2 METHODEN IN DER HISTOLOGIE.....	14
3.2.1 Gewebeaufbereitung.....	14
3.2.1.1 Fixieren und Einbetten.....	14
3.2.1.2 Schneiden nach dem Prinzip des „Isotropic Uniform Randomised Sectioning“	15
3.2.1.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	16
3.2.1.4 Immunfluoreszenzfärbung der fetalen Lungen.....	17
3.2.2 Quantitative Strukturanalyse	19
3.2.2.1 Prinzipien der Stereologie.....	19

3.2.2.2	Strukturparameter	21
3.2.3	Statistische Auswertung	24
4	ERGEBNISSE	24
4.1	BEURTEILUNG DES RAUCHMODELLS FÜR MÄUSE	24
4.1.1	Körpergewicht und Lungengewicht fetaler Tiere	25
4.2	QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER 3 UND 8 WOCHEN ALTEN LUNGENSCHNITTE	26
4.3	QUALITATIVE AUSWERTUNG DER FETALEN LUNGEN	33
4.3.1	Antikörperfärbungen mit α smooth muscle actin und β -Tubulin IV	33
5	DISKUSSION	35
5.1	DISKUSSION DER METHODEN	35
5.1.1	Das murine Rauchmodell	35
5.1.2	Methoden der Histologie	36
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	37
5.2.1	Cotinin Ergebnisse.....	37
5.2.2	Gewichtsentwicklung der rauchexponierten und nicht exponierten Mäusegruppe	37
5.2.3	Diskussion der ausgezählten Parameter und Antikörperfärbungen der fetalen Lungen..	37
5.3	LIMITIERUNG DER AUSWERTUNGEN	39
6	ZUSAMMENFASSUNG	41
7	LITERATURVERZEICHNIS	42
8	ANHANG	45
9	DANKSAGUNG	51
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	52
11	LEBENS LAUFFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitstrahl des Rauchmodells für Mäuse.....	11
Abbildung 2: Vorrichtung zur Raucherzeugung und Rauchexpositions-kammer.....	12
Abbildung 3: Isotropic Uniform Randomised Sectioning.....	16
Abbildung 4: Schritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	17
Abbildung 5: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung	19
Abbildung 6: Screenshot aus dem CAST -System.....	21
Abbildung 7: Formel zum Berechnen des Parenchymanteils	22
Abbildung 8: Formel zum Berechnen der Mean Chord Length.....	22
Abbildung 9: Formel zum Berechnen der Oberflächendichte.....	23
Abbildung 10: Formel zu Berechnung der Gesamtalveolaroberfläche	23
Abbildung 11: Intrauterine Wachstumsretardierung nach Zigarettenrauchexposition	26
Abbildung 12: Beispiel eines HE-gefärbten Lungenschnittes einer 3 Wochen alten Maus	27
Abbildung 13: Ergebnisse der Mean Chord Length der 3 und 8 Wochen alten Mäuse.....	28
Abbildung 14: Ergebnisse der Oberflächendichte der 3 und 8 Wochen alten Mäuse.....	28
Abbildung 15: Ergebnisse der Oberfläche der 3 und 8 Wochen alte Mäuse	29
Abbildung 16: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer fetalen Lunge.....	34
Abbildung 17: immunhistochemische Färbung mit α smooth muscle actin einer fetalen Lunge	34
Abbildung 18: immunhistochemische Färbung mit β -Tubulin IV einer fetalen Lunge.....	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stationen des Gewebeeinbetters.....	15
Tabelle 2: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie	19
Tabelle 3: Konzentration des Cotinin im Urin und des Carboxyhämoglobin im Blut, sowie mütterliches Gewicht bei Sectio in der Experimental- und Kontrollgruppe.....	25
Tabelle 4: Darstellung der errechneten Mittelwerte mit Standardabweichung der analysierten Parameter der 3 Wochen alten Tiere	30
Tabelle 5: Darstellung der errechneten Mittelwerte mit Standardabweichung der analysierten Parameter der 8 Wochen alten Tiere.....	32
Tabelle A. 1: Gruppe der fetalen Mäuse.....	45
Tabelle A. 2: Gruppe der 3 Wochen alten Mäuse	45
Tabelle A. 3: Gruppe der 8 Wochen alten Mäuse	46
Tabelle A. 4: Ausgezählte Messwerte der 3 Wochen alten Tiere (Rauchexpositionsgruppe).	47
Tabelle A. 5: Ausgezählte Messwerte der 3 Wochen alten Tiere (Kontrollgruppe).....	48
Tabelle A. 6: Ausgezählte Messwerte der 8 Wochen alten Tiere (Rauchexpositionsgruppe).	49
Tabelle A. 7: Ausgezählte Messwerte der 8 Wochen alten Tiere (Kontrollgruppe).....	50

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
AIR	Raumluft
cm	Zentimeter
CO-Hb	Carboxyhämoglobin
CS	<i>Cigarette smoke exposure</i>
d	Tag
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
g	Gramm
GT	Gestationstag
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
IUR	<i>Isotropic Uniform Randomised Sectioning</i>
KI	Konfidenzintervall
Lm	<i>Mean Chord Length</i> = Weite der Gasaustauschräume
m	Meter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
S _a	Gesamtalveolaroberfläche
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
S _{V_a}	Oberflächendichte des Alveolarepithels

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema

Im Organismus der Säugetiere repräsentiert die Lunge eines der wichtigsten Organe. Sie reguliert den Gasaustausch über den der lebensnotwendige Sauerstoff in den Körper und zu den Zellen geleitet wird und entsorgt das anfallende Kohlenstoffdioxid. Dabei arbeitet sie äußerst präzise und passt sich auch schweren Bedingungen schnell an. Notwendig hierfür ist ein intaktes Bronchialsystem. Dieses System, auch Bronchialbaum genannt, ist symmetrisch aufgeteilt und zweigt sich in Bronchien und Bronchiolen auf und endet schließlich in den filigranen, fein verästelten Lungenbläschen (Alveolen). Ein gesunder, erwachsener Mensch besitzt etwa 300 Millionen dieser Alveolen, die gesamte alveoläre Gasaustauschfläche liegt damit zwischen 100 und 120 m² [1].

Die direkte Verbindung mit der Außenwelt macht dieses System besonders empfindlich und anfällig für schädliche Stoffe in der Luft. Die am weitesten verbreiteten Noxen sind Tabakrauch und Nikotin, wobei man neben dem aktiven auch den passiven Konsum berücksichtigen muss [2]. Die allgemeinen Folgeschäden des Zigarettenrauchens sind vielfach bekannt und erforscht [3].

Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen belegen beim Menschen die schädlichen Folgen des Tabakkonsums für die heranwachsenden Kinder. Kinder, die während der Schwangerschaft Tabakrauch exponiert sind, haben ein niedrigeres Geburtsgewicht und sind schon im frühen Kindesalter anfälliger für Lungenerkrankungen wie beispielsweise Asthma und sind häufiger verhaltensauffällig, um nur wenige der zahlreichen Folgen zu nennen [4-6].

Ziel dieser Arbeit ist es die Toxizität des Tabaks, und zwar die Folgen der intrauterinen Exposition des ungeborenen Nachwuchses der rauchenden Schwangeren direkt an der Lunge zu untersuchen.

Diese direkte Form der Untersuchung ist beim Menschen nicht möglich. Es wurde daher ein Rauchmodell für Mäuse etabliert und trächtige Mäuse mit definiertem Zigarettenrauch während bestimmter Phasen der Schwangerschaft exponiert. Das Lungengewebe der rauchexponierten und nicht-exponierten Tiere wurde in dieser Arbeit morphologisch und histologisch untersucht, um den Pathomechanismus der Krankheitsentstehung besser zu verstehen.

1.2 Tabakrauchexposition bei Frauen und Schwangeren

1.2.1 Epidemiologie

Die Exposition von Zigarettenrauch ist weltweit der bedeutendste Risikofaktor für chronische Lungenerkrankungen und entscheidender Faktor zahlreicher Erkrankungen zum Beispiel des Gefäßsystems wie auch bei der Genese maligner Tumore [7]. Aktives sowie passives Rauchen schadet dem Körper in vielfacher Weise, ein Fakt, der nach dem Stand der Forschung unumstritten ist [3]. So sterben nach aktuellen Zahlen der WHO aus dem Jahr 2015 jährlich weltweit etwa 6 Millionen Menschen an den direkten Folgen des Tabakkonsums, davon eine Million allein durch eine passive Rauchexposition [8]. Die Gesamtkosten für das Gesundheitssystem, die durch das Rauchen verursacht werden sind daher enorm und werden allein in Deutschland auf 36,4 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt [9].

Trotz positiver Trends und sinkender Zahlen von Raucherinnen und Rauchern in Deutschland, liegt der Anteil rauchender Frauen in Deutschland aktuell bei circa 20% [10]. Auch wenn insgesamt ein Rückgang der Raucherzahlen zu verzeichnen ist, so gilt dies lediglich für die Altersgruppe der 30- bis 44-jährigen Frauen (Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland 2003-2011). Nach einer Studie des Robert-Koch-Institutes liegt die Prävalenz der 18- bis 29-jährigen Raucherinnen (täglich oder gelegentlich) in Deutschland bei 28,4 %, im mittleren Erwachsenenalter zwischen 30 und 44 Jahren sind es etwa 26,9 % [11]. Dieser Aspekt ist insofern von Bedeutung, da es sich dabei um die Frauen handelt, die im gebärfähigen Alter sind.

Wie reagiert eine Raucherin, wenn sie erfährt, dass sie schwanger ist? Einige Raucherinnen schaffen es zumindest temporär den Tabakkonsum während der Schwangerschaft einzustellen. Die zunehmend starke gesellschaftliche Stigmatisierung rauchender Schwangerer, lässt jedoch eine hohe Dunkelziffer vermuten. Zudem ist davon auszugehen, dass die meisten Frauen im ersten Trimester entweder durch Unwissenheit der Schwangerschaft oder durch Rückfälle während der Rauchentwöhnung, nicht vollständig auf Zigaretten verzichten können.

Zwar variiert Dauer und Höhe des Tabakkonsums stark, dennoch schafft es nur die Hälfte der Raucherinnen unter 25 Jahre während der Schwangerschaft mit dem Rauchen völlig aufzuhören. Auch, da es Frauen im Vergleich zu Männern aus verschiedenen Gründen schwerer fällt sich das Rauchen abzugewöhnen. Die psychische Abhängigkeit von Zigaretten scheint bei Frauen deutliche höher zu sein als die physische Abhängigkeit. Daher gestaltet

sich die Rauchentwöhnung durch Nikotinersatzpräparate, wie zum Beispiel Nikotinpflaster deutlich schwieriger. Rauchen befriedigt nicht vordergründig die körperlichen Entzugserscheinungen, sondern dient zur Stressbewältigung, zur „Belohnung“ beispielsweise nach einem harten Arbeitstag oder zur Überbrückung von Unsicherheiten in sozialen Interaktionen. Ein zentrales Thema besonders für Frauen ist die Gewichtszunahme bei Rauchstopp. Nikotin ist ein Appetitzügler und erhöht den Grundumsatz. Die Nikotinentwöhnung erfordert daher eine Anpassung der Ernährungsgewohnheiten und mehr körperliche Aktivität [12].

Zusätzlich hängt das Rauchverhalten auch stark von den sozialen Umständen ab. Frauen mit einem niedrigeren sozioökonomischen Status, einem niedrigeren Bildungsstatus, einer schlechten Gesundheitsaufklärung, unverheiratete Schwangere und Frauen, deren Partner raucht, rauchen deutlich häufiger.

In Europa schwankt die Prävalenz von Rauchen während der Schwangerschaft von 3,6% in Norwegen bis zu 18,3% in Teilen Spaniens [13]. Einer Studie des Robert-Koch-Institutes von 2017 zufolge, beträgt die Prävalenz von rauchenden Frauen in der Schwangerschaft in Deutschland 10,9% [14]. Frauen, die schon vor der Schwangerschaft stark geraucht haben (≥ 10 Zigaretten pro Tag), tendieren dazu auch während der Schwangerschaft weiter zu rauchen. In Europa ist die Prävalenz rauchender Schwangerer in den osteuropäischen Ländern besonders hoch, da dort auch die Prävalenz der rauchenden Frauen insgesamt deutlich höher ist als in west – und mitteleuropäischen Ländern [15].

Erfreulicherweise zeigen die aktuellen Zahlen aber, verglichen mit den 1990er Jahren, eine deutliche Abnahme der Anzahl rauchender Schwangerer in Europa [13].

1.2.2 Folgen und Risiken pränataler Tabakrauchexposition

Die pränatale Exposition mit Zigarettenrauch ist ein anerkannter Risikofaktor für ein vermindertes fetales Wachstum und eine beeinträchtigte Entwicklung der Lungenfunktion [16, 17]. Die intrauterine Phase ist eine der sensibelsten im Verlauf der Entwicklung und schädliche Bedingungen können nicht nur direkt die Entwicklung und das Wachstums des Kindes in utero beeinflussen, sondern auch Auswirkungen auf die Gesundheit im höheren Alter und das Verhalten haben.

In jedem Trimester der Schwangerschaft können Auswirkungen des Nikotins gesehen werden. Pränatal erhöht sich das Risiko eines Abortes, einer Plazenta prävia, einer vorzeitigen Plazentaablösung und einer Frühgeburt signifikant durch das Rauchen [18]. Das kumulierte

Risiko der perinatalen (intrauteriner Fruchttod oder Totgeburt ab der 20. Schwangerschaftswoche) und neonatalen Mortalität (Tod während der ersten 28 Lebenstage) steigt um 33%. Dieser Anstieg ist vor allem auf das niedrigere Geburtsgewicht und die erhöhte Frühgeburtenrate zurück zu führen [19].

Wie bereits erwähnt weisen Kinder mit intrauteriner Zigarettenrauchexposition ein niedrigeres Geburtsgewicht auf [4]. Das Geburtsgewicht hängt von zwei Faktoren ab: vom Gestationsalter bei Geburt sowie der intrauterinen Wachstumsrate, beide werden durch Nikotin und Kohlenstoffmonoxid im Zigarettenrauch negativ beeinflusst. Durch die 250-fach höhere Affinität von Kohlenstoffmonoxid an Hämoglobin gegenüber Sauerstoff kommt es zu einer vermehrten Bildung von Carboxyhämoglobin und dadurch zu einer verminderten Sauerstoffzufuhr zum Kind. Zudem konnte gezeigt werden, dass die fetale Nikotinkonzentration im Blutkreislauf im Vergleich zur mütterlichen bis zu 15% höher liegt [19].

Kinder rauchender Mütter haben bereits früh eine eingeschränkte Lungenfunktion, wie Gilliland et al. [20] in einer 2000 veröffentlichten Studie zeigen konnten. Bei den Kindern mit intrauteriner Tabakrauchexposition war der Peak Flow um -3,0% (95% KI -4,4 bis -1,4), der mittlere expiratorische Fluss (MMEF, mean mid expiratory flow) um -4,6% (95% KI -7,0 bis -2,3) und der forcierte expiratorische Fluss (FEF, forced expiratory flow) um -6,2% (95% KI -9,1 bis -3,1) erniedrigt. Die Einsekundenkapazität (FEV₁, forced expiratory volume in one second) war hingegen normal.

Das Risiko an Asthma zu erkranken ist ebenfalls wesentlich höher. In einer 2004 veröffentlichten Studie von Jaakkola et al. [5] wurde gezeigt, dass das Risiko während der ersten sieben Lebensjahre Asthma zu entwickeln um 25% erhöht war, wenn die Mutter während der Schwangerschaft weniger als 10 Zigaretten geraucht hatte. Waren es mehr als 10 Zigaretten pro Tag erhöhte sich das Risiko sogar um 36%.

Auch die Auswirkungen auf die Gesundheit Betroffener im höheren Alter sind zahlreich. So besteht ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer COPD (chronic obstructive pulmonary disease) [21], sowie einer Adipositas [22]. Kinder, die in einem Raucherhaushalt aufwachsen, haben zudem ein höheres Risiko später selbst zu aktiven Rauchern zu werden [23]. Jene Kinder, deren Mütter während der Schwangerschaft geraucht haben und die später selbst zu Rauchern werden, haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko an Asthma zu erkranken [24]. Mitunter gravierende Folgen zeigen sich auf neurologischer und verhaltenspsychologischer Ebene. Zunächst ist die motorische und geistige Entwicklung des Kindes verlangsamt [6]. Später zeigt sich eine Beeinträchtigung kognitiver Fähigkeiten, die messbar durch einen

geminderten Intelligenzquotienten nachweisbar sind. So zeigen Kinder von Frauen, die während der Schwangerschaft stark geraucht haben (mehr als 10 Zigaretten pro Tag) einen Intelligenzquotienten, der beinahe 9 Punkte niedriger liegt als bei Kindern von Nichtraucherinnen [25].

1.2.3 Folgen von Zigarettenrauch auf die Histomorphologie der Lunge bei Menschen

Kurz soll auch die Auswirkung des direkten Tabakrauches, aktiv oder passiv, auf die Lunge diskutiert werden. Es ist nicht anzunehmen, dass die in-utero Rauchexposition den gleichen Effekt auf die Lunge des Kindes hat, wie eine direkte Tabakrauchexposition.

Dennoch scheint es sinnvoll zu sein sich einen Überblick über die potenziellen, histopathologischen Folgen von Tabakrauch zu machen.

Durch aktives Rauchen kommt es langfristig zu einem Umbau der Lungenarchitektur, der sich im Endstadium häufig als COPD (chronic obstructive pulmonary disease) mit Lungenemphysem manifestiert, im Volksmund auch Raucherlunge genannt. Zwar wird nicht jeder Raucher eine COPD bekommen (nur etwa 15-20% aller Raucher), aber nahezu jede COPD hat Rauchen als Ursache (etwa 90% der an COPD erkrankten Patienten rauchen oder haben geraucht). Dies schließt neben den aktiven auch passive und ehemalige Raucher ein [26, 27].

Pathophysiologisch spielen bei der COPD vor allem die Entzündung der kleinen Atemwege (Bronchiolitis), ein Parenchymverlust durch Destruktion und eine vermehrte Schleimproduktion eine wesentliche pathogenetische Rolle. Die Entzündung entsteht durch die permanente Aktivierung der Immunabwehr. Die Entstehung des Emphysems wird vor allem durch zwei Faktoren begünstigt: Ein Faktor ist die chronische Obstruktion, die verhindert, dass die eingeatmete Luft vollständig ausgeatmet werden kann und somit zu einer Überblähung der Lunge führt. Ein weiterer Faktor ist das Ungleichgewicht von Proteasen und Proteaseinhibitoren, die die Destruktion des Parenchyms vorantreiben [26].

1.2.4 Folgen mütterlichen Rauchens im Tiermodell

Da nicht alle Auswirkungen des Tabakrauches auf Kinder direkt untersucht werden können, werden zunehmend Tiermodelle herangezogen um den Effekt von mütterlichem Rauchen auf die fetale, sich entwickelnde Lunge zu untersuchen.

Rauchexposition reduziert das Lungenvolumen und die Anzahl an Elastinfasern [28].

Des Weiteren zeigten Maritz et al. [29], dass bereits die alleinige Nikotinexposition, welche subkutan zugeführt worden war, die Lungen neugeborener Ratten verändert. In Studien mit Rhesusaffen wurden nach subkutaner Nikotiningabe Änderungen in der Genexpression sowie vermehrte Ablagerungen von Kollagen in den Lungen nachgewiesen [30]. Histopathologisch verdickten sich durch Nikotiningabe die Alveolarwände, es kam zu einer Zunahme der glatten Muskulatur und einer Hyperreagibilität der Atemwege [31-33].

Diese Untersuchungen gewinnen zunehmend an Bedeutung, da der Markt mit E-Zigaretten boomt und nicht nur in den USA, sondern inzwischen auch in Europa jährlich exponentiell anwächst. In Deutschland sind die Umsätze innerhalb von 6 Jahren zwischen 2010 und 2016 von 5 Millionen Euro auf 400 Millionen Euro gestiegen. Experten gehen davon aus, dass die E-Zigarette die Tabakzigarette hinsichtlich der Umsatzzahlen bis 2023 überholt haben wird [34].

1.3 Fragestellung der Arbeit

Trotz vieler Warnhinweise rauchen immer noch viele Schwangere.

Vermutlich werden die Folgeschäden auf das Kind unterschätzt, obwohl schon lange darauf hingewiesen wird, dass das Rauchen während der Schwangerschaft komplexe Auswirkungen auf das ungeborene Kind hat. Die Veränderungen können bei den Kindern sowohl auf molekularer, morphologischer als auch auf genetischer Ebene nachgewiesen werden. Dadurch ist nicht nur die individuelle Lebensqualität beeinträchtigt, sondern es ergeben sich auch enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Daher ist es wichtig zu verstehen wann, wo und in welchem Ausmaß die Pathomechanismen im Organismus ansetzen.

Meine Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob histologische Untersuchungen bereits zu einem frühen Zeitpunkt morphologische Veränderungen der Atemwege und des Lungenparenchyms zeigen. Diese Untersuchungen sind am Menschen nicht möglich, daher wurde ein Rauchmodell mit Mäusen etabliert, das das Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft simuliert.

2 Materialien und Geräte

2.1 Materialien

Reagenzien

- Deckmedium Entellan® (107960), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Deckmedium Pertex®, Histolab Products AB, Göteborg, Sweden
- Ultrareines Wasser Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Gibco® ohne Calcium, ohne Magnesium, Life Technologies™, Carlsbad, USA
- Narkosemittel:
 - Ketamin 10%, Medistar Arzneimittelvertrie GmbH, Ascheberg, Germany
 - Xylazin, bela-pharm GmbH, Vechta, Germany

Reagenzien für histologische Färbungen

- Eosin Y (115935), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Mayers Hämatoxylin (109249), Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Ethanol absolut, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Germany
- Xylol, AppliChem, Darmstadt, Germany
- Bovine Serum Albumin, Fraction V, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate, Sigma-Aldrich, Munich, Germany
- Anti- β -Tubulin IV, Spezies: Maus, Biogenex, Fremont, California, USA
- Anti- α smooth muscle actin, Spezies: Maus, Abcam Cambridge, UK

Färbeküvetten

- Glaskasten mit Deckel aus SMG-Glas, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen, Germany
- Färbeeinsatz, SMG-Glas, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen, Germany
- Drahtbügel für Färbeeinsatz, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen, Germany

Objektträger

- Superfrost® Plus, Gerhard-Menzel GmbH, Braunschweig, Germany

- Mikroskopische Deckgläser 24 x 65 mm, Glasdicke 0,13 - 0,17 mm, R. Langenbrinck Labortechnik, Emmendingen, Germany

Sonstiges

- Biopsie- Eindeckkassetten Histosette, I M490 Simport, Bernard-Pilon, Kanada

2.2 Geräte und Software

Histologie-Gerätschaften

- Paraffin-Ausgießstation: Microm EC 350-2 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Mikrotom: Hyrax M55, Zeiss, Oberkochen, Germany
- Gewebereinbettung: Microm STP 420D, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Mikroskope

- Axio Imager 2, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Olympus BX 51 Lichtmikroskop mit dem CAST-Grid (computerassisted, stereological toolbox), CAST-Grid 2.1; Olympus, Ballerup, Denmark

Sonstiges

- Rauchmaschine: modified TE-2, Teague Enterprises, Davis, USA
- Käfige: VentiRack™, Typ CU-31, BioZone, Ramsgate, Kent, United Kingdom

Software

- AxioVision, Carl Zeiss, Jena, Germany
- GraphPad Prism 7.0 (GraphPadPrism Software, San Diego, USA)

Verbrauchsmaterialien

- Research cigarettes 3R4F, Tobacco Research Institute, Kentucky, USA
- Glasfaser-Mikrofilter, 25 mm Durchmesser, Katalognummer 513-5202, Whatman (GE Healthcare)

2.3 Versuchstiere

Muttertiere

- Weibliche Balb/c- Mäuse im Alter von 8 Wochen, Charles River, Sulzfeld, Deutschland

Nachwuchs der Muttertiere in der Expositions- sowie Kontrollgruppe

- Fetale Balb/c-Mäuse
- Balb/c-Mäuse im Alter von 3 Wochen
- Balb/c-Mäuse im Alter von 8 Wochen

Die genaue Aufteilung der Tiere nach Expositionsart, Identifikationsnummern und Geschlecht sind in den Tabellen A.1-A.7 im Anhang aufgeführt.

3 Methoden

3.1 Methoden im Tierexperiment

3.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Experimente wurden an weiblichen Balb/c Mäuse durchgeführt, die von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 8 Wochen in die Tierhaltung des Helmholtz-Zentrums München in Neuherberg geliefert wurden. Sie waren in Kleingruppen zu je drei Mäusen in individuell belüfteten Käfigen (IVC) untergebracht. Diese standen in einem speziellen, keimfreien Versuchstierstall mit einem regelmäßigen 12-Stunden-Rhythmus mittels künstlicher Beleuchtung. Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden stets konstant bei 20°C bzw. 33% gehalten. Den Tieren stand Tierfutter und Wasser stets zur freien Verfügung. Zur individuellen Unterscheidung wurde jede Maus mit einer Ohrlochmarkierung gekennzeichnet.

Die histologischen Untersuchungen wurde am Nachwuchs der mit Zigaretten gerauchten Muttertiere vorgenommen (genauer Versuchsaufbau siehe Kapitel 3.1.2.2.).

Dabei wurden die Lungen von den fetalen, den 3 Wochen alten und den 8 Wochen alten Tieren entnommen. Insgesamt wurden in dieser Arbeit die Lungen von 36 Tieren untersucht.

Das Geschlecht der Tiere wurde durch Genotypisierung festgestellt. Die DNA wurde aus dem Schwanz der Tiere extrahiert. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden Tiere aus unterschiedlichen Verpaarungszyklen untersucht. Pro Zyklus wurden 48 weibliche Mäuse verpaart. Insgesamt wurden 13 Verpaarungszyklen zwischen März 2013 und Januar 2014 durchgeführt.

Der Tierversuch entspricht den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (GZ. 55.2-1-54-2532-91-11).

3.1.2 Der Versuchsaufbau - das Rauchmodell für Mäuse

Um die Effekte von Rauchen während der Schwangerschaft im Tierexperiment untersuchen zu können, wurde zunächst ein entsprechendes Modell etabliert. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Stefan Dehmel und cand. rer. nat. Petra Nathan.

3.1.2.1 Verpaarung, Tragzeit und Selektion der Versuchstiere

Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche wurde je ein Weibchen im Alter von acht Wochen zur Verpaarung 24 Stunden mit je einem Balb/c-Männchen gemeinsam in einen Käfig gesetzt. Insgesamt wurden pro Zyklus 48 Tiere verpaart um jeweils 24 weibliche Mäuse in der Rauchexposition – bzw. Kontrollgruppe einsetzen zu können. Nach 24 Stunden wurde die Verpaarung aufgelöst und dieser Zeitpunkt wurde als Gestationstag (GT) 0,5 der Tragzeit festgelegt.

Um eine stressbedingte Abstoßung der befruchteten Eizelle zu verhindern und die Wahrscheinlichkeit der Einnistung zu erhöhen, wurden die Tiere erst ab GT 1,5 nach der Verpaarung gegenüber Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert.

Da zu diesem frühen Zeitpunkt eine erfolgreiche Befruchtung noch nicht sicher festgestellt werden kann, wurde ab Tag GT 2,5 jede Maus der Expositionsgruppe beraucht. Die Trächtigkeit konnte erst im weiteren Verlauf durch die Beobachtung der Gewichtsentwicklung festgestellt werden. Die endgültige Selektion erfolgte dann an Tag 10, die nicht trächtigen Tiere wurden geopfert.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden Lungen des Nachwuchses aus drei verschiedenen Altersgruppen verwendet.

- a) Die Lungen der fetalen Mäuse, die per Kaiserschnitt entbunden worden waren, um die Entfaltung der Lungen zu verhindern. Diese wurden kurz vor Ende der Tragzeit (mittlere Dauer der Tragzeit: 19,8 Tage) entnommen.
- b) Die Lungen von 3 Wochen (21 Tage) alten Mäusen.
- c) Die Lungen von 8 Wochen (56 Tage) alten Mäusen. Diese kamen durch eine spontane Geburt auf die Welt, wurden zunächst von dem Muttertier gestillt und nach dem Abstillen mit dem Standardfutter versorgt (siehe Abbildung 1).

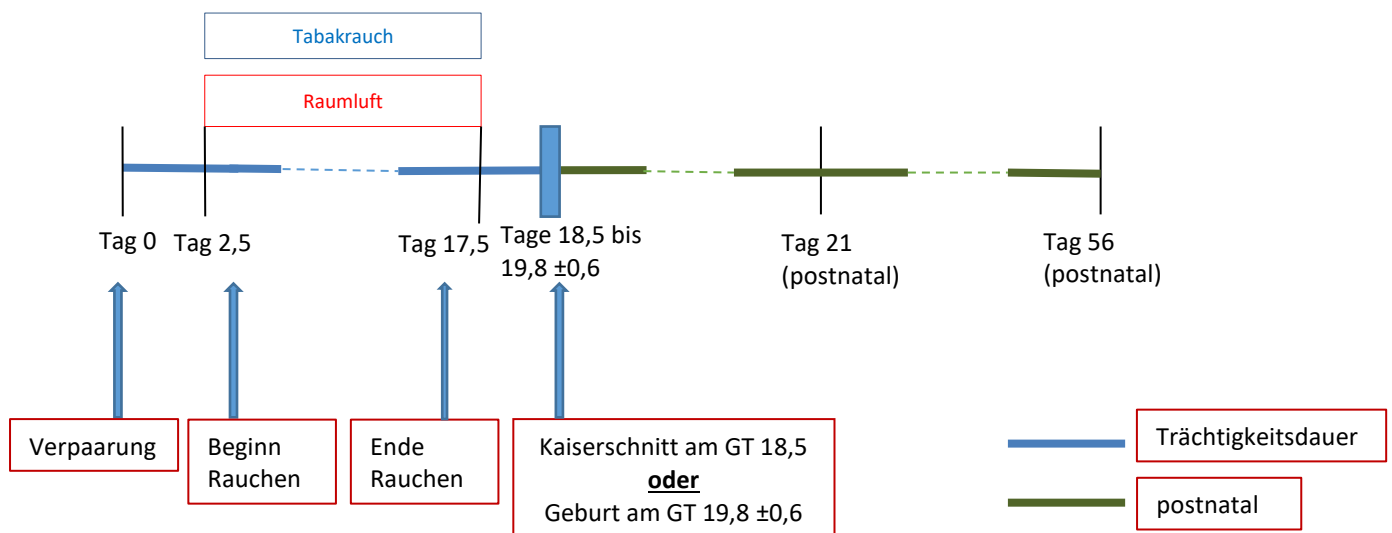


Abbildung 1: Zeitstrahl des Rauchmodells für Mäuse mit den beiden Expositionsgruppen Tabakrauch und Raumluft. Lungen von ungeborenen Föten wurden am GT18,5 durch einen Kaiserschnitt entnommen. Die am postnatalen Tag 21 bzw. 56 untersuchten Mäuse wurden normal zur Welt gebracht.

3.1.2.2 Rauchexposition

Für die Rauch-Erzeugung wurden 3R4F Research Cigarettes des Tobacco Research Institute (University of Kentucky, Lexington, KY, U.S.A.) verwendet. In einem Zeitraum von 50 Minuten wurden dabei zehn Zigaretten mit Hilfe einer modifizierten TE-10 Rauchmaschine (Teague Enterprise, siehe Abbildung 2) abgeraucht und in die Expositions-kammer geleitet. Die Rauchexposition fand täglich morgens ab Tag 2,5 statt. Diese Anwendung wurde entweder bis zur spontanen Geburt fortgeführt oder bis Tag 17,5 im Falle eines geplanten

Kaiserschnittes am Tag 18,5.

Die Konzentration von Zigarettenrauch in der Rauchkammer hatte im Durchschnitt eine Partikelkonzentration von $321 \pm 89 \text{ mg/m}^3$. Damit wurde sogenanntes *mainstream smoking* – also aktives Rauchen - simuliert.

Während der Exposition wurde täglich nach der 3., der 6. und der 9. Zigarette die Partikelkonzentration innerhalb der Expositions-kammer mit Hilfe eines Quarz Filters gemessen.

Die Erhebung der Partikelkonzentration erfolgte durch gravimetrische Messung des Gewichts des Filters vor und nach Exposition gegenüber einem spezifizierten Volumenstrom aus der Expositions-kammer.

Von allen Mäusen wurde täglich vor der Behandlung das Gewicht gemessen und notiert. Anschließend wurden die Mäuse in eine der beiden Expositions-kammern entsprechend ihrer zuvor randomisiert ausgewählten Gruppe (CS = *Cigarette smoke* bzw. AIR = Raumluft) umgesetzt. Die Expositionsgruppe wurde dabei Zigarettenrauch ausgesetzt, die Kontrollgruppe atmete gefilterte Raumluft.

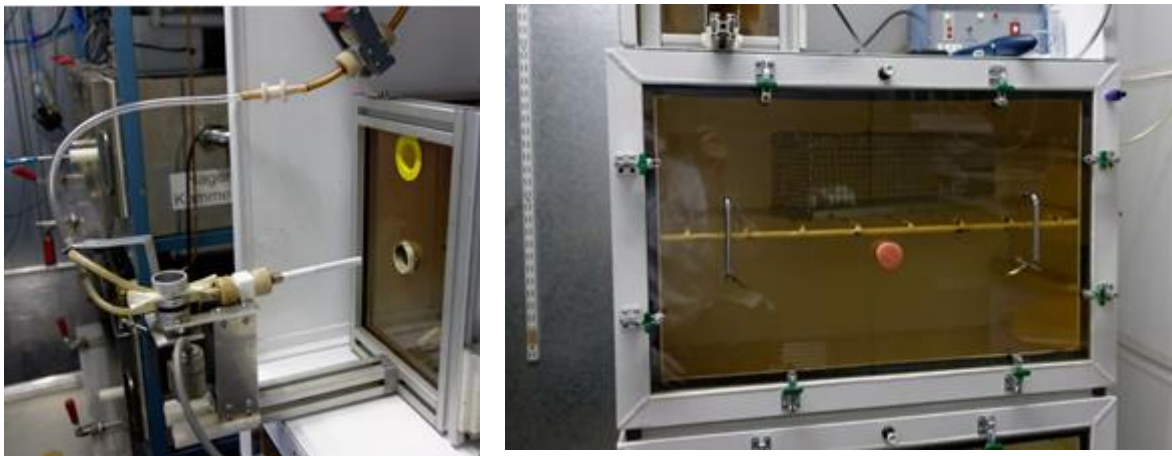


Abbildung 2: links: Vorrichtung zur Raucherzeugung mit angesetzter Zigarette; rechts: Rauchexpositions-kammer. Der Rauch wird vom nicht-brennenden Ende der Zigarette mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgezogen und in die Rauchexpositions-kammer geleitet. Ein Steuerventil kontrolliert die Raucherzeugung (2 Sek. Rauch, 4 Sek. Luft).

Die Kontrollgruppe wurde ebenfalls gewogen und von ihren üblichen Käfigen in große Versuchskäfige umgesetzt, um identische äußere Bedingungen für die berauchte und die nicht-berauchte Gruppe herzustellen. Die Kontrollgruppe kam allerdings in eine Schleuse und

atmete während dieser Zeit Raumlufte.

3.1.2.3 Kontrolle der Rauchexposition

Zur Kontrolle der Rauchexposition wurden sowohl die Cotininkonzentration im Urin bestimmt als auch Messungen des Carboxyhämoglobins durchgeführt. Da die Tiere nach diesem Verfahren geopfert werden mussten, wurden dafür ausschließlich die nicht-trächtigen Tiere eingesetzt.

Die Cotininmessung im Urin erfolgte vier Stunden nach der Rauchexposition mittels eines kommerziellen ELISA (Calbiotech, Spring Valley, US).

Das Carboxyhämoglobin (CO-Hb) wurde im venösen Blut des retrobulbären Venenplexus 30 Minuten nach der Rauchexposition mit einem Hämoxymeter bestimmt (OSM3, Radiometer, Kopenhagen).

Sowohl die Cotininmessungen, als auch die Bestimmung des Carboxyhämoglobins wurden von cand. rer. nat. Petra Nathan und Rabea Imker, MTA, durchgeführt.

3.1.2.4 Entnahme der Lungen bei den 3- bzw. 8- Wochen alten Nachkommen

Vor der Organentnahme wurden die Mäuse fachgerecht durch die subkutane Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (1 ml Ketamin+ 0,25 ml Xylazin+ 6 ml PBS; 100 µl/10g) intraperitoneal narkotisiert. Das Töten des Versuchstieres erfolgte nach der Eröffnung des Bauchraumes und Durchtrennung der Vena cava durch letalen Blutverlust. Für diese Arbeit nicht benötigte Versuchszwecke wurde zunächst ein bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Daraufhin wurde das Herz mit 3ml PBS perfundiert, um die Lunge vollständig zu spülen. Im nächsten Schritt erfolgte die Organentnahme. Dabei wurden neben der Lunge auch Leber, Milz und Gehirn für weitere Untersuchungen entnommen. Für die Entnahme des linken Lungenflügels wurde dieser zunächst über den Bronchus bei 20cm Wassersäule über 10 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Dies ist notwendig, um eine Entfaltung der Lungen zu gewährleisten. Danach wurde die Lunge präpariert und zur Fixierung bei Raumtemperatur über Nacht in 4%igem PFA gelagert. Für die histologischen Auswertungen in dieser Arbeit wurde stets der linke Lungenflügel verwendet. Der rechte Lungenflügel wurde nach der Entnahme kryokonserviert.

3.1.2.5 Entnahme fetaler Lungen nach Kaiserschnitt

Für die Gewinnung der fetalen Lungen wurden die trächtigen Tiere zunächst bis Tag 17,5 beraucht, am Tag 18,5 fand dann die Sectio statt. Es erfolgte zunächst erneut die Einleitung der Narkose durch die subkutane Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (1 ml Ketamin+ 0,25 ml Xylazin+ 6 ml PBS; 100 µl/10g) intraperitoneal. Nachdem das Abdomen eröffnet wurde, wurden zunächst die Positionen der Feten sowie der resorbierten Feten notiert. Nach dem Wiegen wurden die Feten durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital getötet. Zur weiteren Verwendung in der Histologie wurden die Lungen zunächst über Nacht in 4% PFA gelagert.

Diese Arbeiten, sowie die Entnahme der Lungen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden von cand. rer. nat. Petra Nathan und Rabea Imker, MTA, durchgeführt.

3.2 Methoden in der Histologie

3.2.1 Gewebeaufbereitung

3.2.1.1 Fixieren und Einbetten

Das Lungengewebe jeder Maus wurde zur Systematisierung durchnummeriert. Zur weiteren Kategorisierung wurden Monat und Jahr beigefügt (beispielsweise 01-11-13).

Bis zur endgültigen Auswertung waren die Gewebeproben verblindet.

Das Volumen der Lungen wurde nach der Methode von W. Scherle mittels Flüssigkeitsverdrängung bestimmt [35].

Vor dem Fixieren der Lungen wurden sie über Nacht in den entsprechenden Kassetten in 70%igen Ethanol gelegt.

Danach wurde das Gewebe in mehreren Schritten entwässert und in Paraffin eingebettet.

Der hier verwendete Gewebe-Einbeter durchläuft in 15 Stunden 10 Stationen.

(siehe Tabelle 1)

Schritt	Reagenz	Dauer in Minuten
1	70% Ethanol	60
2	96% Ethanol	60
3	96% Ethanol	120
4	96% Ethanol	120
5	100% Ethanol	60
6	100% Ethanol	120
7	100% Ethanol	120
8	Xylol	60
9	Paraffin	60
10	Paraffin	120

Tabelle 1: Stationen des Gewebeeinbeters

3.2.1.2 Schneiden nach dem Prinzip des „Isotropic Uniform Randomised Sectioning“

Das Schneiden des Gewebes der 3 und 8 Wochen alten Lungen erfolgte nach der Methode des sogenannten *Isotropic Uniform Randomised Sectioning (IUR)*, um eine unabhängige, randomisierte Auswertung nach den Regeln der Stereologie zu gewährleisten [36]. Dadurch wird sichergestellt, dass die Schnittführung im Organ durch die Randomisierung stets unterschiedlich ist. Zudem wird jeder Teil des Organs mit derselben Wahrscheinlichkeit ausgewertet.

Hierfür wurde der Paraffinblock mit der eingebetteten Lunge zunächst aus der Kassette gelöst. Mittels Excel wurde zunächst eine Liste mit Zufallszahlen zwischen null und 36 erstellt (insgesamt wurden für diese Arbeit 36 Lungen untersucht). Eine Zahl wurde ausgewählt und der Paraffinblock der entsprechenden Zufallszahl nach auf die Vorlage gelegt (siehe Abbildung 4). Dann wurde der erste Schnitt entlang der Gradlinie geführt.

Im nächsten Schritt wurde, wie zuvor, eine Liste aus Zufallszahlen zwischen null und 100 bei Excel erstellt. Nun wiederholt sich der Vorgang. Die im ersten Schritt neu entstandene Schnittfläche wurde mit der Schnittfläche nach unten an der 0° Linie angelegt. Der zweite Schnitt erfolgte dann entlang der zweiten ermittelten Zufallszahl.

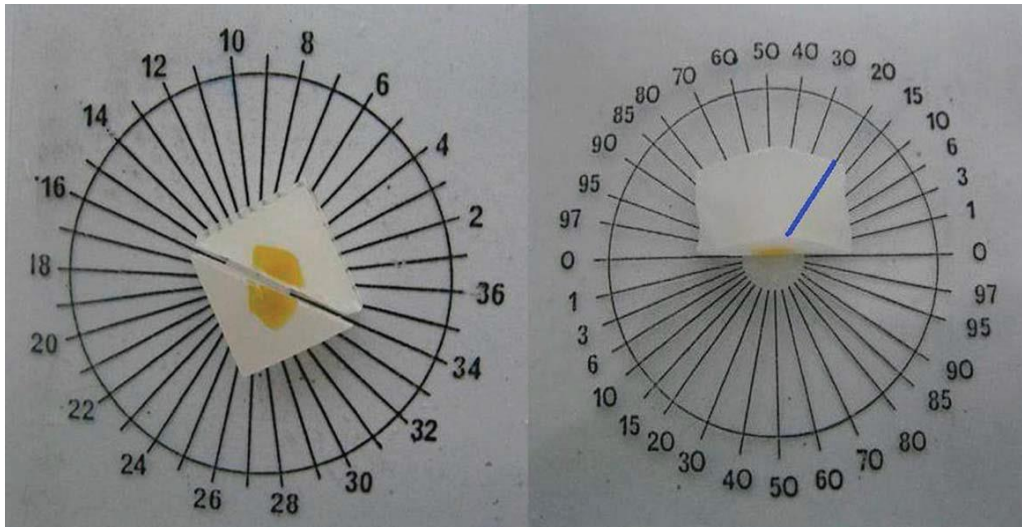


Abbildung 3: Isotropic Uniform Randomised Sectioning: In der linken Abbildung wird der Gewebeblock zunächst auf dem Orientierungskreis auf der Gradlinie einer Zufallszahl zwischen 0 und 36 (hier 16) angelegt und geschnitten. Auf der rechten Abbildung wird die neu entstandene Schnittfläche auf der Null-Grad- Linie angelegt und entlang einer zweiten zufällig ermittelten Gradzahl (hier 20) geschnitten. Abbildung aus [37].

Der Block wurde dann mit der im zweiten Schritt entstandenen Schnittfläche auf einem eigens dafür hergestellten Montageblock fixiert. Um eine sichere Fixierung zu gewährleisten wurde der Montageblock erwärmt und flüssiges Paraffin als Kleber benutzt. Nach diesem Verfahren wurden die Proben ca. 30 Minuten in einen Gefrierschrank bei -20°C gegeben.

Nach dem Einspannen des Blockes in das Mikrotom, wurde der Block bei circa $15\ \mu\text{m}$ Schnittdicke getrimmt bis die Schnittfläche im Lungenlappen lag. Pro Lunge wurden 10 Schnitte in einer Dicke von $3\ \mu\text{m}$ angefertigt, mit einem Objektträger (Superfrost® Plus) aufgefangen und 10 Minuten bei 39°C auf die Wärmeplatte gelegt. Pro Objektträger wurden je zwei Schnitte gesammelt. Die Schnitte wurden dann über Nacht zum Trocknen in den Wärmeschrank bei 37°C gelegt.

Im Unterschied zu den 3 und 5 Wochen alten Lungen wurden die fetalen Lungen zur besseren Beurteilung $5\ \mu\text{m}$ dick geschnitten.

3.2.1.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Pro Lunge wurden je zwei Objektträger, daher insgesamt vier Schnitte pro Lunge, mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt.

Die hierfür durchgeführten Schritte sind in der Abbildung 5 angeführt.

1. Entparaffinierung (absteigende Alkoholreihe)

Xylol	Xylol	100% EtOH	100% EtOH	90% EtOH	80% EtOH	70% EtOH
5min	5min	1min	1min	1min	1min	1min

2. Färbung

1. Kurz spülen mit destilliertem Wasser
2. 5 Minuten in Hämatoxylin nach Mayer
3. Kurz spülen unter fließendem Wasser (Leitungswasser)
4. Kurz spülen mit 0,3% HCl-Alkohol
5. 10-15 Minuten spülen unter fließendem Wasser (Leitungswasser)
6. Kurz spülen mit destilliertem Wasser
7. 8 Minuten in Eosin Y

3. Entwässerung (aufsteigende Alkoholreihe)

70% EtOH	80% EtOH	90% EtOH	96% EtOH	100% EtOH	100% EtOH	Xylol	Xylol
Kurz, 3 x dippen		1min	1min	1min	2min	5min	5min

Abbildung 4: Schritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

3.2.1.4 Immunfluoreszenzfärbung der fetalen Lungen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Paraffinschnitte der mittels Sectio gewonnenen, nicht entfalteten fetalen Lungen verwendet.

Zunächst wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer (pH 6) in einer vorgewärmten Mikrowelle über 15 Minuten. Durch Inkubation mit 1,5% H₂O₂ in PBS wurde die endogene Peroxidase inaktiviert. Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten mit einer Blockingreagenz (bovines Serumalbumin (BSA) in PBS) blockiert und über Nacht mit der adäquaten Verdünnung des Primärantikörpers bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte auf Raumtemperatur erwärmt und mehrmals mit PBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem HRP-konjugierten

Sekundärantikörper für 90 Minuten. Um eine Kreuzreaktion zu vermeiden, wurde hierfür ein Antikörper aus einer anderen Spezies im Vergleich zum Primärantikörper verwendet.

Daraufhin wurden die Schnitte wiederum mehrmals gespült. Zum sichtbar Machen des HRP-

konjugierten Sekundärantikörpers wurden die Schnitte für sechs Minuten mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in PBS und H₂O₂ zum Starten der Reaktion inkubiert. Damit wird erreicht, dass jede HRP-gebundene Zelle eine braune Färbung erhält. Nach dem Waschen unter Leitungswasser und Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, sowie Xylol, erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Die Arbeitsschritte im Detail sind in der nachfolgenden Abbildung 6 dargestellt.

Erster Tag:

1. Entparaffinierung (absteigende Alkoholreihe)

Xylol	Xylol	100% EtOH	95% EtOH	70% EtOH	50% EtOH	mit PBS spülen
2 Minuten	2 Minuten	2 Minuten	2 Minuten	2 Minuten	2 Minuten	5 Minuten

2. Demaskierung mit Citratpuffer pH 6,0: Topf mit vollionisiertem Wasser füllen, Küvette mit Citratpuffer füllen, Schnitte hineinstellen und verschließen
3. Schnitte in Mikrowelle (600 W) für 15 Minuten erhitzen
4. Schnitte langsam im Wasserbad auf Raumtemperatur abkühlen lassen
5. 5 Minuten mit PBS spülen
6. Inhibition der endogenen Peroxidaseaktivität: Schnitte 10 Minuten in H₂O₂ (1,5% H₂O₂ in 200 ml PBS) inkubieren
7. 5 Minuten mit PBS spülen
8. Blocken: Schnitte mit Blocking-Puffer für 10 Minuten bedecken (Blocking-Puffer: 1:100 BSA in PBS)
9. Verdünnen des Primärantikörpers
10. Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper bei 4°C in der Feuchtkammer über Nacht

Zweiter Tag:

1. Schnitte auf Raumtemperatur erwärmen
2. 3 mal je 5 Minuten mit PBS spülen
3. Inkubation mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (verdünnt 1:100 in Blocking-Puffer) für 90 Minuten
4. 3 mal 5 Minuten mit PBS spülen
5. DAB-Reaktion: Inkubation für 6 Minuten mit Lösung aus 4ml 3,3'-Diaminobenzidin- Grundlösung (DAB, 5g Diaminobenzidin in 100ml PBS) + 200 ml PBS und 70µl 35% H₂O₂, um die Reaktion zu starten
6. 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
7. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 Sekunden

8. Kurz unter fließendem Leitungswasser spülen
9. Dehydrierung (aufsteigende Alkoholreihe)

70% EtOH	80% EtOH	90% EtOH	100% EtOH	100% EtOH	Xylol
10 Sekunden	10 Sekunden	10 Sekunden	1 Minute	2 Minuten	3 Minuten

10. Eindecken mit Pertex (Histolab®)

Abbildung 5: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Die fetalen Lungenschnitte wurden jeweils mit den Antikörpern gegen β -Tubulin IV und α -smooth muscle actin angefärbt (siehe Tabelle 1).

Antigen	Spezies	Verdünnung	Firma
β -Tubulin IV	Maus	1:100	Biogenex
α smooth muscle actin	Maus	1:1000	Abcam

Tabelle 2: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie

3.2.2 Quantitative Strukturanalyse

3.2.2.1 Prinzipien der Stereologie

Pro Lunge aus der Gruppe der 3 und 8 Wochen alten Tiere wurden zwei zufällig ausgewählte, Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte mit dem CAST System (*computer assisted stereological toolbox*) von Olympus an einem Olympus BX 51 Lichtmikroskop ausgewertet. Dies erfolgte nach dem sogenannten „design-basierten“ Verfahren der Stereologie, das heißt durch die Interpretation von dreidimensionalen Strukturen anhand von zweidimensionalen Schnitten. Diese hat sich in der Wissenschaft als anerkannte Methode durchgesetzt, um organische und somit dreidimensionale Strukturen anhand von histologischen Schnitten zu beurteilen [38]. Durch quantitative Analysen lassen sich somit Rückschlüsse auf das Volumen, die Oberfläche, die Dicke von Strukturen sowie deren Anzahl ziehen. Besonders entscheidend dabei ist die konsequente Verblindung und Standardisierung der Methode, von der Gewebeaufbereitung über die Probenanalyse bis zur Auswertung [39].

In jedem der ausgewerteten Schnitte der 3 und 8 Wochen alten Tiere wurde die *Mean Chord*

Length (L_m), die Gesamtalveolaroberfläche (S_a) sowie die Gesamtoberflächendichte des Alveolarepithels (S_{v_a}) bestimmt.

Dabei handelt es sich um Parameter zur Beurteilung der Gasaustauschfläche (siehe Kapitel 3.2.2.2.).

Dafür wurde der entsprechende histologische Schnitt eingelesen und zunächst als Übersichtsbild dargestellt. Nicht zu analysierende Bereiche (große Gefäße, Artefakte oder „fehlerhafte“ Areale, z.B. Quetschungen durch den Schnitt) wurden ausgeschlossen. Durch die speziell für stereologische Auswertungen entworfene Software (*Computerassisted, Stereological Toolbox*, CAST-Grid 2.1; Olympus, Ballerup, Dänemark) wurde ein Linien- und Punkteraster über den jeweiligen 20-fach vergrößerten Lungenschnitt gelegt und konnte daraufhin ausgewertet werden (siehe Abbildung 7). Die Anzahl der auszuwertenden Sichtfelder wurden durch die Software festgelegt und betrug im Schnitt 20 Sichtfelder pro Lunge.

Durch Auszählung verschiedener Parameter wird zwischen Parenchym und Nicht-Parenchym unterschieden. Zu Parenchym zählen dabei sämtliche Bereiche der Lunge, die am Gasaustausch teilnehmen (Alveolarbereich), zu Nicht-Parenchym entsprechend andere Strukturen, wie z.B. Blutgefäße und die luftleitenden Atemwege.

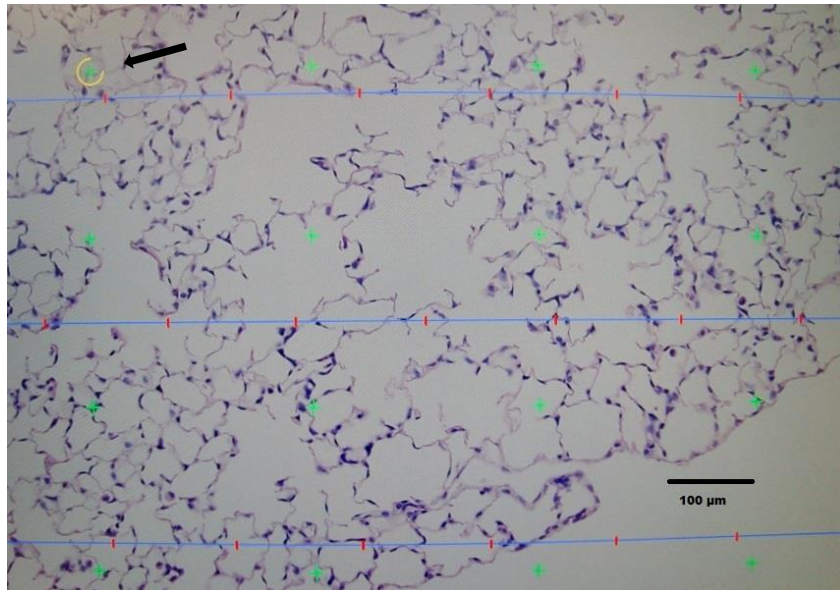


Abbildung 6: Screenshot aus dem CAST -System. Ein Gitter, bestehend aus drei blauen Linien, 19 roten Punkten, 16 grünen Kreuzen und einem Masterpunkt (siehe Pfeil), wurde über jedes Sichtfeld des Lungenschnittes in 20-facher Vergrößerung gelegt. Der Masterpunkt (P_{ref}) in der linken, oberen Ecke wurde nur gezählt, wenn er im Parenchym lag. Die restlichen 15 grünen Kreuze wurden jeweils aufgeteilt in diejenigen, die auf Alveolargewebe trafen (S_{par}), diejenigen, die auf Luft im Alveolarbereich (S_{air}) trafen und diejenigen, die auf Nicht-Alveolarbereich ($S_{non-par}$), also Gefäße oder Atemwege, trafen. Die roten Punkte (P_{air}) wurden gezählt, wenn sie auf Luft trafen. Zudem wurden die Schnittpunkte der blauen, horizontalen Linien mit Alveolarsepten (I_{sept}) gezählt.

3.2.2.2 Strukturparameter

Zur Beurteilung der Gasaustauschfläche der Lungen wurden im Einzelnen die Volumenanteile des Parenchyms (V_v), die *Mean Chord Length* (L_m), die Gesamtoberflächendichte des Alveolarepithels (S_{V_a}), sowie die Gesamtalveolaroberfläche (S_a) bestimmt, um die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen zu einem späteren Zeitpunkt mit einem t-Test für unabhängige Stichproben untersuchen zu können.

Volumenanteil des Parenchyms ($V_{v(par,lung)}$)

Zur Berechnung der Volumenfraktion des Parenchyms ($V_{v(par,lung)}$) wurde der sogenannte Masterpunkt (P_{ref}), generiert durch die Software, gezählt, der nur markiert wurde, wenn er im Parenchym lag (siehe Abbildung 7). Dieser wurde mit 16 multipliziert und im Verhältnis der Punkte im Nicht-Parenchym $S_{non-par}$ gesetzt, um den Parenchymanteil zu erhalten (siehe Abbildung 8).

$$Vv(par) = \frac{\Sigma Pref \cdot 16}{(\Sigma Pref \cdot 16) + \Sigma S_{non-par}} \cdot 100 \quad [\%]$$

Abbildung 7: Formel zum Berechnen des Parenchymanteils: $Vv(par)$: Volumenfraktion des Parenchyms (%), $\Sigma Pref$: Summe der Masterpunkte, die im Parenchymbereich liegen, $\Sigma S_{non-par}$: Summe der Punkte, die im Nicht-Alveolarbereich liegen.

Mean Chord Length

Die *Mean Chord Length* (L_m) ist der mittlere freie Abstand zwischen den benachbarten Alveolarsepten und unabhängig von der Dicke der Alveolarwand, da diese nicht mit einbezogen wird. Eine Erweiterung der Alveolen führt somit zu einer Vergrößerung der *Mean Chord Length*, wodurch sie einen wichtigen Parameter zur Feststellung einer Luftraumerweiterung darstellt [40].

Zur Messung der *Mean Chord Length* wurden die Schnittpunkte (I_{sept}) der horizontalen Linien mit dem Alveolarepithel gemessen, die über den Lungenschnitt gelegt wurden. Die horizontalen Linien waren zudem in regelmäßigen Abständen mit Punkten (P_{air}) versehen, die gezählt wurden, wenn sie auf einen Luftraum im Lungenparenchym trafen (siehe Abbildung 7). Nach Hsia et al. 2010 handelt es sich um ein kombiniertes *point* und *intersection counting*. Voraussetzung hierfür ist ein kohärentes Testliniensystem mit einer einheitlichen Linienlänge ($L(p) = \text{length per point}$), hier $86,9 \mu\text{m}$.

Die *Mean Chord Length* wurde nach [39] wie folgt berechnet:

$$L_m = \frac{\Sigma P_{air} \cdot L(p)}{\Sigma I_{sept} \cdot 0,5} \quad [\mu\text{m}]$$

Abbildung 8: Formel zum Berechnen der Mean Chord Length L_m : P_{air} sind dabei die Punkte des Liniengitters, die auf Luft treffen. $L(p)$ ist die Linienlänge pro Punkt (dies wird automatisch vom Computer ausgerechnet und war $86,9 \mu\text{m}$ in allen Auswertungen). I_{sept} ist die Summe der Schnittpunkte von Alveolarsepten mit Gitterlinien.

Gesamtoberflächendichte des Alveolarepithels

Analog zur *Mean Chord Length* kann die alveoläre Oberflächendichte (S_{v_a}) berechnet werden. Die Oberflächendichte definiert sich als die Oberfläche pro Referenzvolumen. Hier fließen als Parameter die Anzahl die Schnittpunkte der Testlinien mit Alveolarsepten (I_{sept}) und die Summe der Testpunkte, die auf Luft treffen (P_{air}) und diejenigen, die auf Parenchym treffen, ein (siehe [39]).

$$S_{va} = \frac{2 \cdot \Sigma I_{sept}}{\Sigma P_{air} \cdot L(p)} \quad [\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3]$$

Abbildung 9: Formel zum Berechnen der Oberflächendichte S_v : I_{sept} ist die Summe der Schnittpunkte von Alveolarsepten mit Gitterlinien. P_{air} sind die Punkte des Liniengitters, die auf Luft treffen. $L(p)$ ist die Linienlänge pro Punkt (dies wird automatisch vom Computer ausgerechnet und war $86,9 \mu\text{m}$ in allen Auswertungen)

Gesamtalveolaroberfläche

Zur Berechnung der Gesamtalveolaroberfläche S_a in cm^2 wurde die Oberflächendichte S_{v_a} mit dem Lungenvolumen V_{lung} und dem Parenchymanteil $V_{v(par, ung)}$ in Prozent multipliziert (siehe [41]).

$$S_a = S_{va} \cdot V_{lung} \cdot V_{v(par, lung)} \quad [\text{cm}^2]$$

Abbildung 10: Formel zu Berechnung der Gesamtalveolaroberfläche S_a : S_{v_a} ist die Gesamtoberflächendichte des Alveolarepithels (siehe Abbildung 10), V_{lung} ist das durch Flüssigkeitsverdrängung (nach Scherle) bestimmte Volumen der Lunge und $V_{v(par, lung)}$ ist der prozentuale Anteil des Parenchyms (siehe Abbildung 8)

3.2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der statistischen, quantitativen Auswertung werden als arithmetischer Mittelwert mit der dazugehörigen einfachen Standardabweichung (SD) berechnet und in Form von Streudiagrammen im Ergebnisteil graphisch dargestellt. Dabei wurden von jeder Lunge jeweils zwei zufällig ausgewählte Schnitte ausgewertet und von diesen beiden Werten dann der Mittelwert gebildet. Die beiden Gruppen Expositionsgruppe und Kontrollgruppe wurden mit einem Mann Whitney U Test hinsichtlich der Signifikanz ($p < 0,05$) getestet.

Alle Grafiken wurden mit der GraphPad Prism 5 Software erstellt.

4 Ergebnisse

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ist die histologische Untersuchung der fetalen und 3- bzw. 8-Wochen alten Lungen.

In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Robbert Rottier (Erasmus University Medical Center, Rotterdam, Niederlande) wurden die fetalen, nicht entfaltenen Lungen ausgewertet. Dabei wurden die Lungen mit den Antikörpern β -Tubulin IV und α smooth muscle actin gefärbt und mit der Kontrollgruppe verglichen.

Die 3 Wochen bzw. 8 Wochen alten Lungen der Experimental-, sowie Kontrollgruppe wurden quantitativ-stereologisch ausgewertet. Dabei wurden die *Mean Chord Length*, die Alveolaroberfläche, sowie die Oberflächendichte bestimmt, um eine pathologische Erweiterung der Gasaustauschräume aufgrund des Zigarettenrauches beurteilen zu können.

Die statistischen Auswertungen und Ergebnisse sind in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

4.1 Beurteilung des Rauchmodells für Mäuse

Zur Bestätigung einer ausreichenden Zigarettenrauchexposition der Mäuse wurden das Cotinin im Urin, sowie Carboxy-Hämoglobin (CO-Hb) im Blut der Tiere bestimmt. Hierfür wurden nicht-trächtige Tiere verwendet. Zum einen, da die Tragzeit nicht durch äußere Stressfaktoren gefährdet werden sollte und zum anderen, da die Tötung der Tiere zur Bestimmung des CO-Hb notwendig war und der Bestand trächtiger Tiere geschont werden sollte. Tabelle 3 zeigt die Werte von Cotinin im Urin und CO-Hb im Blut der trächtigen Mäuse. Die statistische Auswertung wurde mittels ungepaartem t-Test durchgeführt. Beide Werte waren in der

berauchten Gruppe signifikant erhöht. Diese Ergebnisse waren Bestandteil der Doktorarbeit von Petra Nathan, sind aber für das Verständnis dieser Arbeit von Bedeutung [42].

	Zigarettenrauch	Raumluft	p-Wert
Cotinin im Urin [mg/ml] # (n)	600 ± 25 15	117 ± 26 7	<0.0001
Carboxyhämoglobin [%] # (n)	6.3 ± 0.6 22	1.3 ± 0.2 17	<0.0001
Mütterliches Gewicht bei Sectio [g] (n)	32.8 ± 2.4 8	34.4 ± 2.1 15	0.1

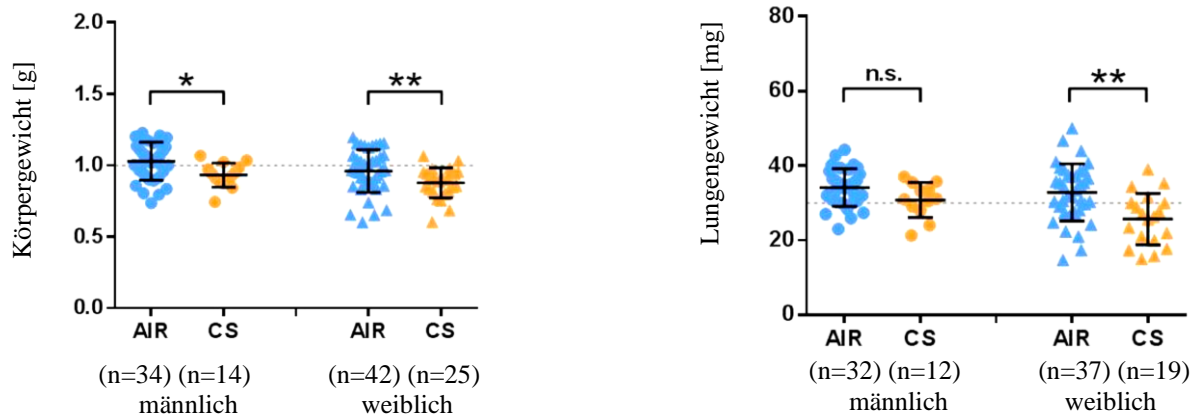
Tabelle 3: Konzentration des Cotinin im Urin und des Carboxyhämoglobin im Blut, sowie mütterliches Gewicht bei Sectio in der Experimental- und Kontrollgruppe. Angabe in Mittelwert ± Standardabweichung, das Kreuz (#) bedeutet, dass diese Untersuchungen an nicht schwangeren Mäusen durchgeführt wurden. Der p-Wert bezieht sich auf den durchgeführten ungepaarten t-Test.

4.1.1 Körpergewicht und Lungengewicht fetaler Tiere

In der Abbildung 12 wird die Gewichtsentwicklung der Tiere, die zum Zeitpunkt GT 18,5 per Kaiserschnitt entbunden und präpariert wurden, dargestellt.

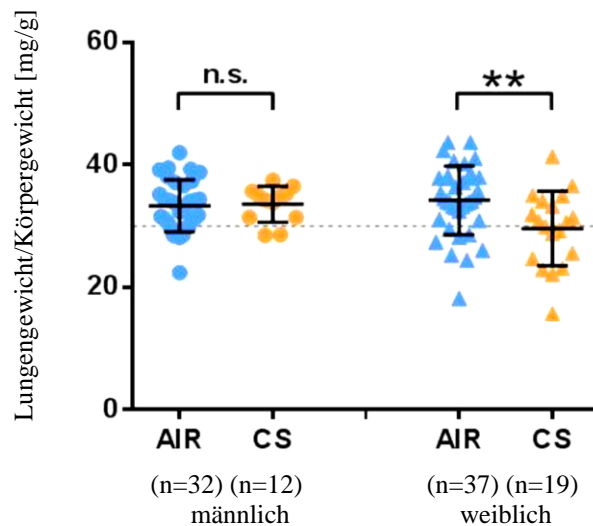
Das Geburtsgewicht und das Lungengewicht der intrauterin rauchexponierten Mäuse sind signifikant niedriger als das der Kontrollgruppe. Dies wurde bereits dadurch sichtbar, dass die rauchexponierten, trächtigen Mäuse signifikant weniger an Gewicht zunahmten als die Kontrollgruppe (- 157 mg/d; 95%-Konfidenzintervall: 145-168, $p < 0,0001$). Dieser Gewichtsunterschied war auch weiterhin signifikant, nachdem das mütterliche Gewicht auf die Wurfgröße korrigiert wurde.

Beim Nachwuchs der Expositionsgruppe war vor allem bei den weiblichen Tieren ein im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigeres Lungengewicht festzustellen. Als Konsequenz war somit das Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht bei den weiblichen Mäusen vermindert, nicht aber bei den männlichen Tieren (siehe Abbildung 12).



a

b



c

Abbildung 11: Intrauterine Wachstumsretardierung nach Zigarettenrauchexposition anhand des Gewichts zum Zeitpunkt der Entbindung mit Kaiserschnitt (E18.5). (a) Körpergewicht, (b) Lungengewicht und (c) Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht der Feten. AIR (blau) und Rauchexposition (orange) von männlichen (•) und weiblichen (▲) Feten. Wurfgröße > 6, Mittelwert ± Standardabweichung; Der p-Wert bezieht sich auf den ungepaarten t-Test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

4.2 Quantitative Auswertung der 3 und 8 Wochen alten Lungenschnitte

Für die quantitativ histologische Auswertung der 3 und 8 Wochen alten Lungen, wurden die HE-gefärbten Lungenschnitte am CAST-System ausgewertet (siehe Kapitel 3.2.2.2). Die Abbildung 13 (Beispiel eines HE-gefärbten Lungenschnittes) zeigt eine charakteristische

Darstellung einer 3 Wochen alten Mäuselunge. Die Kapillaren sind frei von Blut oder anderen Bestandteilen, was auf eine gelungene Spülung, sowie Fixierung hinweist. Die Lufträume der fixierten Lunge sind gebläht.

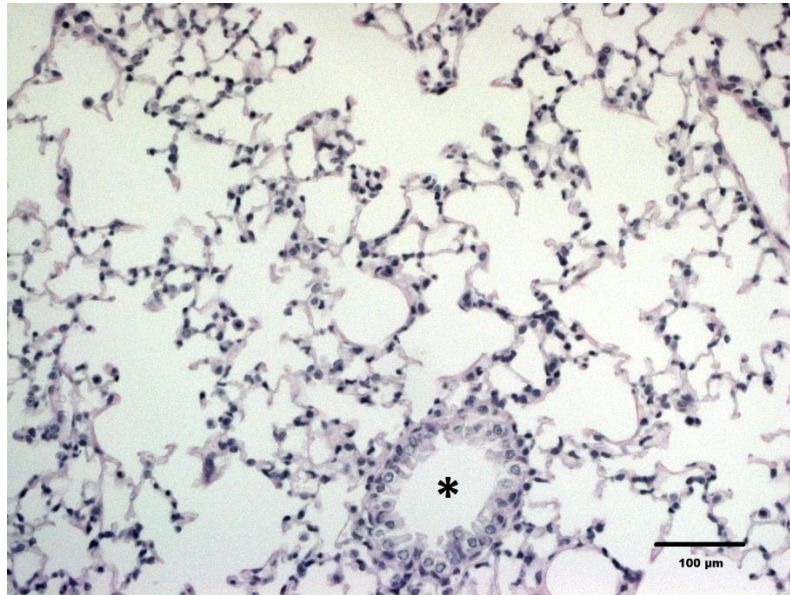


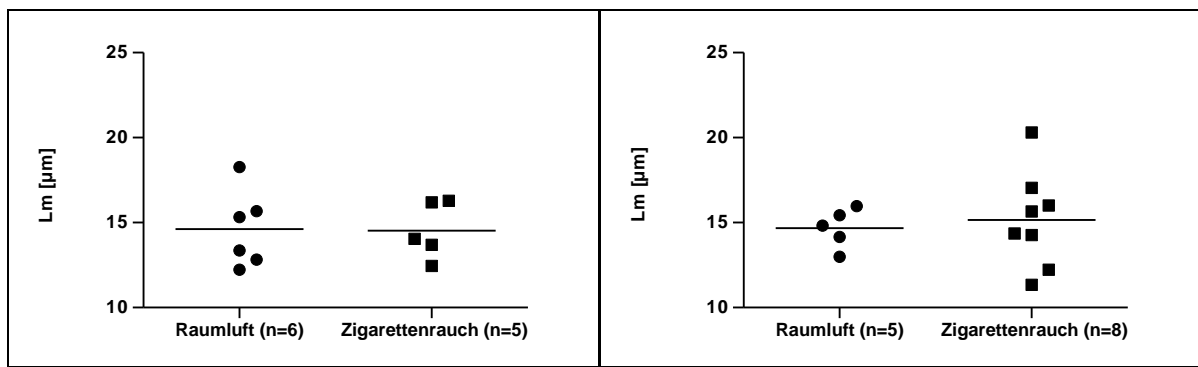
Abbildung 12: Beispiel eines HE-gefärbten Lungenschnittes (20-fache Vergrößerung) einer 3 Wochen alten Maus. Sie stammt aus einer intrauterin rauchexponierten Gruppe (Identifikationsnummer 03-04-14). Bei der mit Stern gekennzeichneten Struktur handelt es sich um einen Bronchiolus. Dieser ist andersartig aufgebaut (Flimmerepithel) als das umliegende Alveolarepithel und daher gut zu unterscheiden.

Für die statistische Auswertung wurden Messpunkte wie in Kapitel 3.2.2.2. beschrieben mit dem CAST-System bestimmt und dann die *Mean Chord Length*, die Oberfläche des Alveolarepithels und die alveoläre Oberflächendichte berechnet.

Für die Auswertung wurde nur eine Lungenhälfte verwendet, da die andere Hälfte für PCR-Analysen für weitere Fragestellungen in der Arbeitsgruppe verwendet wurde.

Pro Lunge wurden insgesamt zwei Schnitte ausgezählt und hierfür der Mittelwert aus den zwei Werten berechnet. Bei den 3 Wochen alten Lungen wurden insgesamt 11 Lungen (22 Schnitte) ausgewertet, bei den 8 Wochen alten Lungen waren es insgesamt 13 Lungen (26 Schnitte).

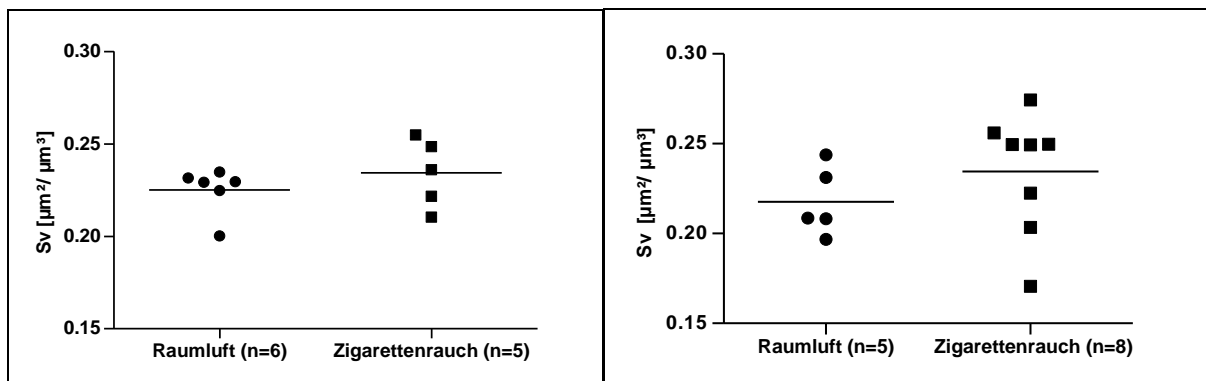
Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 14-16 als Streudiagramme dargestellt und werden in Tabellen 4 und 5 miteinander verglichen.



A 3 Wochen alte Tiere

B 8 Wochen alte Tiere

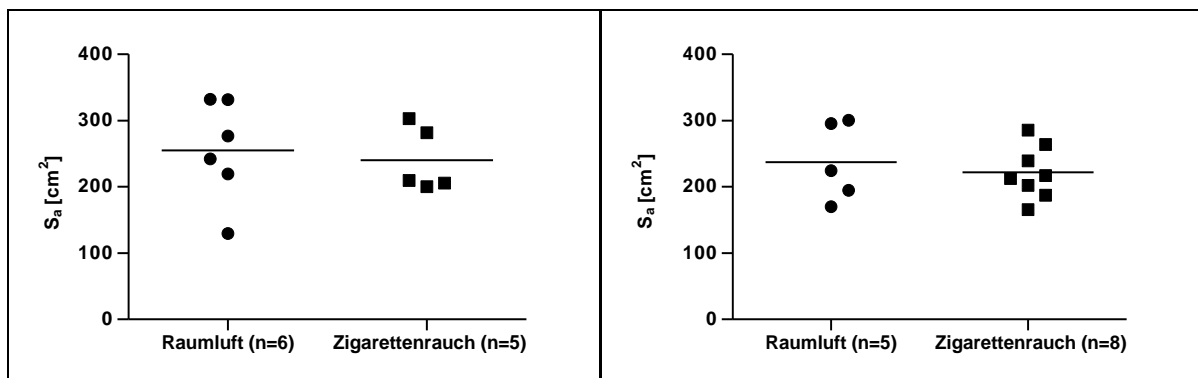
Abbildung 13: Die Daten zeigen die Ergebnisse der Mean Chord Length (Lm): (a) 3 Wochen alte Mäuse (b) 8 Wochen alte Mäuse



A 3 Wochen alte Tiere

B 8 Wochen alte Tiere

Abbildung 14: Die Daten zeigen die Ergebnisse der Oberflächendichte (Sv (alvepi, lung): (A) 3 Wochen alte Mäuse (B) 8 Wochen alte Mäuse



A 3 Wochen alte Tiere

B 8 Wochen alte Tiere

Abbildung 15: Die Daten zeigen die Ergebnisse der Oberfläche (S (alvepi, lung): (A) 3 Wochen alte Mäuse (B) 8 Wochen alte Mäuse

3 Wochen

Parameter	Statistik	Zigarettenrauch	Raumluft
Lm [μm]			
	n	5	6
	MW	14,5	14,6
	SD	$\pm 1,7$	$\pm 2,3$
	Min	12,5	12,2
	Median	14,1	14,4
	Max	16,3	18,3
	p-Wert	0,7922	
S (alvepi, lung) [cm^2]			
	n	5	6
	MW	240,0	255,3
	SD	$\pm 48,4$	$\pm 76,7$
	Min	200,3	129,7
	Median	209,6	259,5
	Max	303,0	332,1
	p-Wert	0,5368	
Sv (alvepi, lung) [$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$]			
	n	5	6
	MW	0,234	0,225
	SD	$\pm 0,018$	$\pm 0,012$
	Min	0,210	0,200
	Median	0,236	0,229
	Max	0,255	0,235
	p-Wert	0,4286	

Tabelle 4: Darstellung der errechneten Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) der analysierten Parameter der 3 Wochen alten Tiere in der exponierten und nicht-exponierten Gruppe. Zudem sind die Gruppengröße (n), der minimale Wert (Min), der maximale Wert (Max), Median, sowie p-Wert angegeben. Lm (μm) = Mean Chord Length; S (alvepi, lung) (cm^2) = totale Alveolaroberfläche; Sv (alvepi, lung) ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) = Dichte der Alveolaroberfläche.

Die mittlere Mean Chord Length (Lm) der Lungen der 3 Wochen alten Tiere ist in der Expositionsgruppe $14,5 \mu\text{m}$ (SD = $1,7 \mu\text{m}$) und in der Kontrollgruppe $14,6 \mu\text{m}$ (SD = $2,3 \mu\text{m}$). Der Vergleich der beiden Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied auf (Mann-Whitney-U = 13, n1 = 5, n2 = 6, p = 0,7922 zweiseitig). Die mittlere totale Alveolaroberfläche (S) der 3 Wochen alten Tiere betrug in der Expositionsgruppe $240,0 \text{ cm}^2$ (SD = $48,4 \text{ cm}^2$) und in der Kontrollgruppe $255,3 \text{ cm}^2$ (SD = $76,7 \text{ cm}^2$). Auch hier zeigte der Vergleich der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied auf (Mann-Whitney-U = 11, n1 = 5, n2 = 6, p = 0,5368 zweiseitig).

Der letzte bestimmte Parameter der 3 Wochen alten Tiere ist die Dichte der Alveolaroberfläche (Sv). Hier ist der mittlere Wert der Expositionsgruppe $0,234 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ (SD = $0,018 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) und in der Kontrollgruppe $0,225 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ (SD = $0,012 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$). Dieses Ergebnis ist ebenfalls nicht signifikant (Mann-Whitney-U = 10, n1 = 5, n2 = 6, p = 0,4286 zweiseitig)

8 Wochen

Parameter	Statistik	Zigarettenrauch	Raumluft
Lm [μm]			
	n	8	5
	MW	15,2	14,7
	SD	$\pm 2,8$	$\pm 1,2$
	Min	11,3	12,9
	Median	15,0	14,8
	Max	20,3	15,9
	p-Wert	0,7242	
S (alvepi, lung) [cm^2]			
	n	8	5
	MW	221,8	237,1
	SD	$\pm 39,6$	$\pm 58,8$
	Min	165,9	170,2
	Median	214,9	224,2
	Max	264,0	300,5
	p-Wert	0,6216	
Sv (alvepi, lung) [$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$]			
	n	8	5
	MW	0,234	0,217
	SD	$\pm 0,033$	$\pm 0,019$
	Min	0,171	0,197
	Median	0,249	0,208
	Max	0,274	0,244
	p-Wert	0,2222	

Tabelle 5: Darstellung der errechneten Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) der analysierten Parameter der 8 Wochen alten Tiere in der exponierten und nicht-exponierten Gruppe. Zudem sind die Gruppengröße (n), der minimale Wert (Min), der maximale Wert (Max), Median, sowie p-Wert angegeben. Lm (μm) = Mean Chord Length; S (alvepi, lung) (cm^2)= totale Alveolaroberfläche; Sv (alvepi, lung) ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) = Dichte der Aveolaroberfläche.

Bei der Auswertung der mittleren Mean Chord Length (Lm) der Lungen der 8 Wochen alten Tiere ist diese in der Expositionsgruppe 15,2 μm (SD = 2,8 μm) und in der Kontrollgruppe 14,7 μm (SD = 1,2 μm). Der Vergleich der beiden Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied auf (Mann-Whitney-U = 17, n1 = 8, n2 = 5, p = 0,7242 zweiseitig). Die mittlere totale Alveolaroberfläche (S) der 8 Wochen alten Tiere ist in der Expositionsgruppe 221,8 cm^2 (SD = 39,6 cm^2) und in der Kontrollgruppe 237,1 cm^2 (SD = 58,8 cm^2). Im Vergleich der beiden Gruppen ist der Unterschied nicht signifikant (Mann-Whitney-U = 16, n1 = 8, n2 = 5, p = 0,6216 zweiseitig).

Die mittlere Dichte der Alveolaroberfläche (Sv) der 8 Wochen alten Tiere der Expositionsgruppe ist 0,234 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ (SD = 0,033 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) und in der Kontrollgruppe 0,217 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ (SD = 0,019 $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$). Auch dieses Ergebnis ist nicht signifikant (Mann-Whitney-U = 11, n1 = 8, n2 = 5, p = 0,2222 zweiseitig)

4.3 Qualitative Auswertung der fetalen Lungen

Für die Auswertung der fetalen Lungen konnte weder die *Mean Chord Length*, noch die Oberflächendichte, noch die Gesamtalveolaroberfläche bestimmt werden, da diese Methode nur bei bereits entfaltenen Lungen anwendbar ist. Das Lungengewebe der fetalen Lungen ist dicht und nicht entfaltet, da die Organentnahme vor dem ersten Atemzug nach dem Kaiserschnitt stattfindet.

In Zusammenarbeit mit Dr. Robbert Rottier und dessen Team aus dem Institut für Zellbiologie des Erasmus MC Rotterdam wurden immunhistochemische Färbungen auf die fetalen Lungenschnitte angewendet und anschließend im Vergleich mikroskopisch ausgewertet.

Die Abbildungen der nachfolgenden Kapitel zeigen exemplarische, charakteristische Lungenschnitte der fetalen Lungen mit der jeweiligen Antikörperfärbung (α smooth muscle actin und β -Tubulin IV) jeweils ein Schnitt aus einer exponierten Gruppe und aus der Kontrollgruppe.

4.3.1 Antikörperfärbungen mit α smooth muscle actin und β -Tubulin IV

In Abbildung 17 ist eine fetale Lunge in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zum Vergleich abgebildet. Abbildungen 18 und 19 sind immunhistochemische Färbungen mit α smooth muscle actin und von repräsentativen Schnitten der Rauch – und Kontrollgruppe dargestellt. In diesen

Abbildungen wird deutlich, dass im Vergleich keine Unterschiede in beiden Gruppen zu sehen sind.

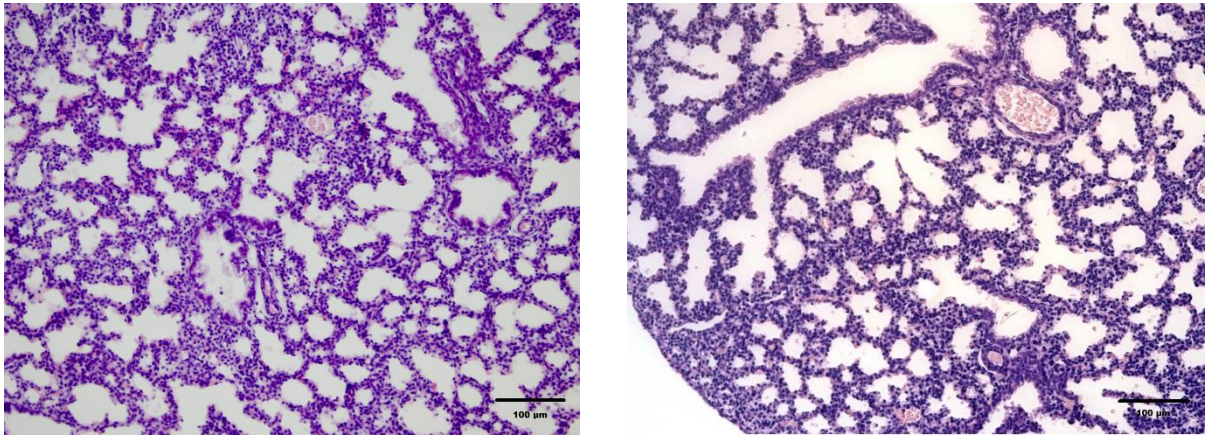


Abbildung 16: Hämatoxylin-Eosin-Färbung einer fetalen Lunge: links Expositionsgruppe, rechts Kontrollgruppe; 20-fache Vergrößerung

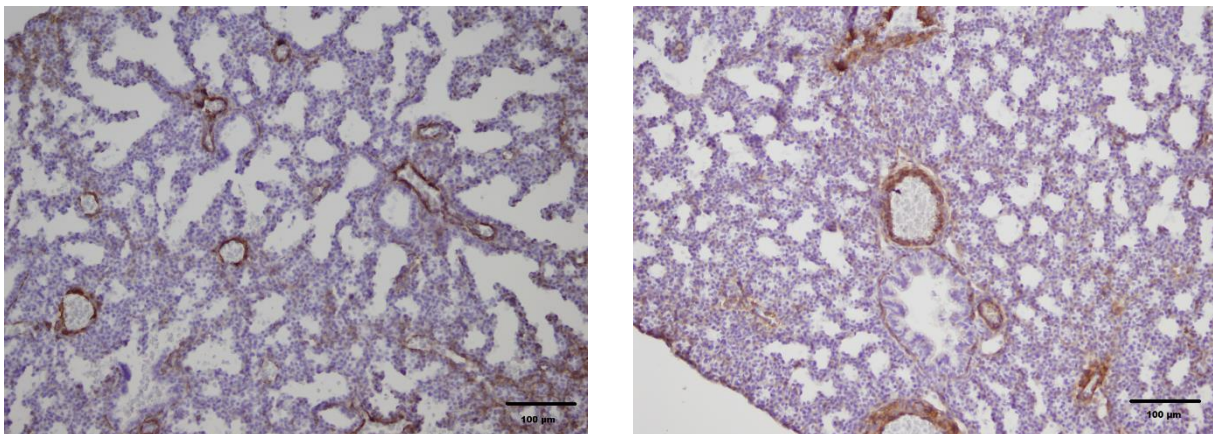


Abbildung 17: immunhistochemische Färbung mit α smooth muscle actin: links Expositionsgruppe, rechts Kontrollgruppe; 20-fache Vergrößerung.

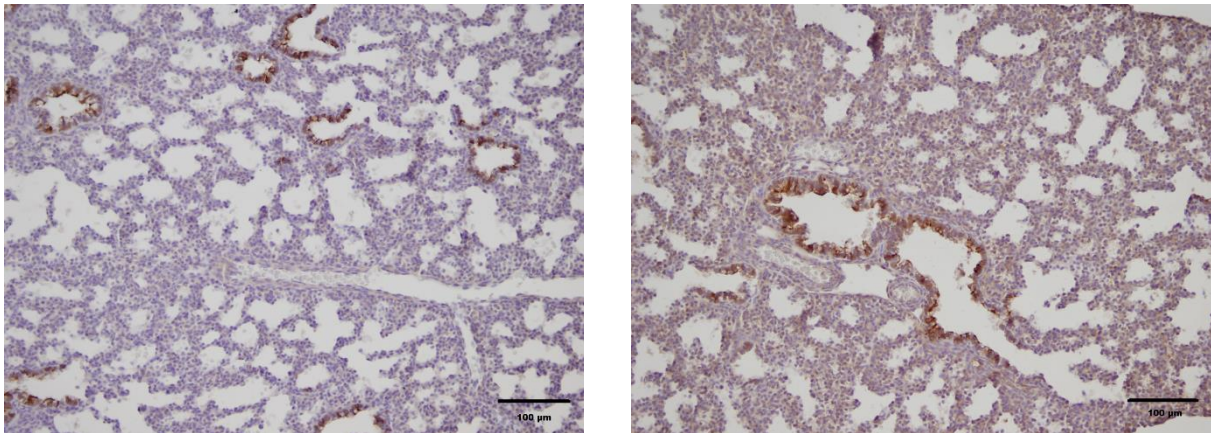


Abbildung 18: immunhistochemische Färbung mit β -Tubulin IV: links Expositionsgruppe, rechts Kontrollgruppe; 20-fache Vergrößerung

5 Diskussion

Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es Unterschiede in der Lungenhistologie bei in utero rauchexponierten und nicht exponierten Mäusen in 3 verschiedenen Altersgruppen zu untersuchen: fetal, 3 Wochen und 8 Wochen. Die fetalen, nicht entfalteten Lungen wurden mit den Antikörpern α smooth muscle actin und β -Tubulin IV gefärbt und untereinander verglichen. Bei den 3 Wochen alten Lungen wurden insgesamt 22 histologische Schnitte, bei den 8 Wochen alten Lungen 26 Schnitte quantitativ-stereologisch ausgewertet. Es wurden damit *Mean Chord Length*, alveoläre Oberflächendichte und die Oberfläche berechnet.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Das murine Rauchmodell

Es gibt bereits Studien, die „Rauchmodelle“ bei Mäusen benützen um deren Tauglichkeit als Labortiere zur Untersuchung der Konsequenzen von Tabakkonsum zu zeigen [43-45]. Aufgrund der Parallelen bei Entwicklung, Morphologie und zellulärem Aufbau der Lungen sind Mäuse besonders gut geeignet die Auswirkungen des Rauchens während der Tragzeit zu untersuchen [46]. Allerdings variieren in den verschiedenen Studien die Dauer der Rauchexposition, sowie die Messtechnik der Rauchkonzentration. Auch unsere Studie ist in ihrer Aussage limitiert: Bereits der Rauch selbst, sowie dessen Geruch bedeutet Stress für die

Mäuse, welche nicht-exponierte Mäuse nicht in diesem Ausmaß erfahren und haben daher Auswirkungen auf den gesamten Organismus der trächtigen Maus. Wie gravierend sich Stress auf trächtige Mäuse auswirkt, konnte beispielsweise von Pincus-Knackstedt et al. [47] gezeigt werden. In deren Studie zeigte sich, dass Nachwuchs von Mäusen, welche während der Tragzeit Stress durch Lärm ausgesetzt waren, bereits eine höhere Anfälligkeit für Asthma zeigten.

Die Rauchexposition der Mäuse startete erst mit Beginn der Tragzeit, um die Befruchtung und Einnistung der Eizelle ohne externen Stressor zu gewährleisten. Bei Frauen, die während der Schwangerschaft rauchen, ist aber tendenziell eine Reduktion des Zigarettenkonsums zu beobachten [48]. Ein Rauchbeginn zu Beginn einer Schwangerschaft bei zuvor Nichtraucherinnen ist eher selten und daher ist hier eine Übertragung des Tiermodells auf den Menschen kaum möglich. Es ist zu vermuten, dass der akute Rauchbeginn insbesondere auf die Gewichtsentwicklung der trächtigen Mäuse einen Einfluss hat, welche womöglich bei chronischem Tabakkonsum anders verlaufen würde.

5.1.2 Methoden der Histologie

Die Einbettung von organischem Gewebe in Paraffin ist üblich und weit verbreitet und wurde auch in dieser Arbeit angewendet. Dabei muss mit einer ungleichmäßigen Schrumpfung des Gewebes von bis zu 25% gerechnet werden. Zudem kann der histologische Schnitt durch die Scherkräfte der Klinge um bis zu 10% komprimiert werden [36].

Da in dieser Arbeit Lungenflügel von einem Gewicht von circa 0,1g untersucht wurden, gestaltete sich insbesondere die Präparation, Fixation und das Schneiden als schwierig.

Alternativ ist hier ein Glutaraldehyd-haltiges Fixationsmittel mit anschließender Einbettung in Glycol-Methacrylat von Vorteil, welche die Mäuselunge deutlich weniger schrumpfen lässt und somit das bestmögliche Ergebnis bietet [49]. Ein systematischer Bias wurde vermieden indem, wie bereits im Kapitel „Methoden“ beschrieben, die in der design-basierten Stereologie gängigen Verfahren angewendet wurden [39].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Cotinin Ergebnisse

Cotinin ist ein Abbauprodukt von Nikotin und kann im Urin und im Blut festgestellt werden. Aufgrund der einfachen Messbarkeit und langanhaltenden Nachweisbarkeit, dient es als Marker für das Rauchverhalten und das Ausmaß der Zigarettenrauchexposition [50]. Es konnte ein signifikanter Anstieg des Cotinin im Urin, sowie des Co-Hb in der rauchexponierten Gruppe beobachtet werden. Diese Daten wurden 4 Stunden nach der letzten Rauchexposition erhoben, obwohl die Halbwertszeit von Cotinin in C57BL/6 Mäusen 38 Minuten beträgt [51]. Vergleicht man die Daten dieser Arbeit mit denen schwangerer Frauen, ist bei dem hier beschriebenen Mausmodell von einem „leichten“ Zigarettenkonsum auszugehen [52].

5.2.2 Gewichtsentwicklung der rauchexponierten und nicht exponierten Mäusegruppe

Das Gewicht der Mäuse wurde täglich gemessen. Das Geburtsgewicht der in-utero rauchexponierter Mäuse war bei beiden Geschlechtern signifikant niedriger. Dies wurde bereits in einer vergleichbaren Studie von Larcombe et al. gezeigt [53]. Auffallend bei unserer Studie ist, dass beim weiblichen, rauchexponierten Nachwuchs sowohl das Lungengewicht als auch das Verhältnis von Lungengewicht zu Körpergewicht signifikant erniedrigt ist. Im Gegensatz dazu sind diese beiden Parameter beim männlichen Nachwuchs nicht signifikant erniedrigt. Weitere geschlechtsspezifische Unterschiede durch die Rauchexposition in utero konnten in weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Besonders interessant auf molekularer Ebene ist die signifikant erhöhte Expression des Wachstumsfaktors Igf1 (insulin-like growth factor-1) beim weiblichen Nachwuchs [54].

5.2.3 Diskussion der ausgezählten Parameter und Antikörperfärbungen der fetalen Lungen

Die *Mean Chord Length*, Gesamtalveolaroberfläche und Gesamtoberflächendichte des Alveolarepithels haben sich als nützliche Parameter etabliert, um zu beurteilen welche Schäden eine Lunge durch direktes oder passives Rauchen genommen hat. [29, 55, 56] Eine erhöhte *Mean Chord Length* findet man beispielsweise bei einem Emphysem bei

chronisch obstruktiver Lungenkrankheit (COPD) [57].

Eine entscheidende Frage, die sich stellt, ist die nach geschlechtsspezifischen Unterschieden.

Durch das randomisierte Auswahlverfahren der zu untersuchenden Lungen, wurde die Verteilung der untersuchten weiblichen und männlichen Tiere sehr asymmetrisch.

Bei den 3 Wochen alten Tieren wurden in der Rauchgruppe 4 weibliche Tiere und ein männliches Tier ausgezählt. In der Kontrollgruppe waren es 4 weibliche Tiere und 2 männliche Tiere.

Bei den 8 Wochen alten Tieren wurden in der Rauchgruppe 3 männliche Tiere und 5 weibliche Tiere gezählt. In der Kontrollgruppe waren es 2 weibliche und 3 männliche Tiere.

Durch die kleine Stichprobe der zu vergleichenden Gruppen wird es schwierig sein eine Signifikanz zu erreichen. Ein geschlechtsspezifischer Vergleich wird nicht repräsentativ sein. Dies ist ein generelles Problem experimenteller Tierversuche. Interessanterweise wurden auf molekularer Ebene Unterschiede in der Genexpression zwischen weiblichen und männlichen Tieren nachgewiesen. Daher könnte man spekulieren, dass auch auf histologischer Ebene geschlechtsspezifische Unterschiede zu beobachten sind [54].

In der Literatur finden sich ebenfalls unterschiedliche und teils widersprüchliche Daten zu den histologischen Veränderungen der Lungen intrauterin rauchexponierter Tiere: Noel et al. konnten Veränderungen an den Lungen erwachsener, 15 Wochen alter Mäuse, nachweisen. Diese Tiere waren intrauterin täglich vier Stunden „Passivrauchen“ ausgesetzt. Bei männlichen ebenso wie weiblichen Tieren waren die *Mean Chord Length* signifikant erhöht und die Oberfläche pro Volumen signifikant erniedrigt [58].

Vergleicht man das Rauchprotokoll dieser Arbeit mit dem von Noel et al. war die Partikelkonzentration bei Noel et al. deutlich niedriger mit 10 mg/m^3 (verglichen mit $321 \pm 89 \text{ mg/m}^3$ in dieser Studie), dafür wurden die Mäuse über 4 Stunden am Tag geraucht (anstatt wie in unserem Experiment lediglich 50 Minuten). Zudem erfolgte die histologische Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt, das heißt an 15 Wochen alten Tieren. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Maus erwachsen, wohingegen 3 bzw. 8 Wochen alte Tiere als kindlich bzw. adoleszent gelten, da eine Maus normalerweise ab einem Alter von 6 Wochen als geschlechtsreif gilt.

Demgegenüber stehen beispielsweise Untersuchungen von Larcombe et al., die ebenfalls keine Unterschiede in der Histologie der Lunge bei 2 Wochen altem Nachwuchs feststellen konnten, obwohl die Lungenfunktion der exponierten Gruppe zu diesem Zeitpunkt bereits signifikant erniedrigt war. Bei diesem Rauchprotokoll wurden die trächtigen Tiere 2-Mal täglich geraucht, Cotinin im Urin erreichte hier eine 8-fach höhere Konzentration als bei unserem Protokoll [53].

In den hier dargestellten Schnitten konnte rein histologisch betrachtet kein direkter Unterschied bei den mit Antikörpern gefärbten Schnitten im Vergleich der Expositions- und Kontrollgruppe gesehen werden. Als Antikörperfärbungen wurde smooth muscle actin, sowie β -Tubulin IV gewählt, da diese als guter Indikator einer strukturellen Umbildung der Atemwege durch Zigarettenrauchexposition dienen. Das smooth muscle actin ist Baustein der Myofilamente der glatten Muskulatur im Bronchialsystem, β -Tubulin IV ist ein Hauptbestandteil der Mikrotubuli. So konnte Blacquiere et al. am Mausmodell zeigen, dass Rauchen während der Schwangerschaft zu einer dickeren Schicht glatter Muskulatur und vermehrten Anreicherung von Kollagen III um die Atemwege des Nachwuchses führt, wodurch eine Assoziation zwischen mütterlichem Rauchen und Asthma angenommen wird [43]. Allerdings war der Nachwuchs zusätzlich postnatal von der 5.-10. Woche Hausstaubmilben ausgesetzt. Der Untersuchungszeitpunkt der Lungen war zudem bei 10 Wochen.

Die Vermutung liegt also nahe, dass histologische Unterschiede in den Lungen des exponierten Nachwuchses erst zu einem späteren Zeitpunkt festzustellen sind, da vermutlich die Funktion, also Dehnbarkeit und Elastizität des Lungengewebes zunächst geschädigt ist. Dauerhafte Schäden, die sich dann auch histologisch manifestieren, sind als Spätschäden erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar und nachweisbar. Vermutlich spielt der Zeitpunkt und weniger die Intensität der Rauchexposition eine größere Rolle.

5.3 Limitierung der Auswertungen

Wie auch in anderen publizierten Untersuchungen ist die Fallzahl der untersuchten Versuchstiere niedrig. Die Methode ist material – und zeitaufwendig, eine größere Anzahl an Tieren zu opfern erbringt zudem keine wesentlichen neuen Erkenntnisse. Der Vergleich mit den bisherigen Ergebnissen aus der Literatur ist allerdings besonders wichtig.

In unserer Untersuchung ist kein Trend hinsichtlich Unterschiede zwischen geraucherter und nicht-geraucherter Gruppe zu erkennen. Auch größere Fallzahlen werden dieses Ergebnis nicht mehr ändern. Rauchen führt auch bei der Maus zu einer deutlichen Gewichtsabnahme, ähnlich wie beim Menschen. Das Rauchmodell war deshalb bewusst für mildes Rauchen konstruiert worden, um zu verhindern, dass die mütterliche Gewichtsabnahme unter Rauchen den Haupteinflussfaktor auf die Nachkommen darstellt. Möglicherweise war das Rauchmodell aber genau dadurch zu schwach, um histomorphologische Unterschiede zu sehen. Durch Randomisierung und Verblindung sind die Fallzahlen besonders hinsichtlich der Geschlechterverteilung unterschiedlich. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der

Suszeptibilität bei mütterlichem Rauchen ist bereits bekannt. Hu et al. [59] wiesen nach, dass intrauterin rauchexponierte Kinder eine reduzierte Lungenfunktion verglichen mit gleichaltrigen Kindern der Kontrollgruppe erzielen. Dieser Effekt ist stärker beim männlichen Nachwuchs erkennbar. Somit wären bei höheren Fallzahlen und gleichmäßiger Verteilung der Geschlechter in den Gruppen in dieser Studie womöglich ebenfalls Unterschiede erkennbar gewesen.

Auch wenn histologisch keine Unterschiede zwischen Experimental- und Kontrollgruppe gefunden werden konnten, schließt dies nicht aus, dass auf molekularer Ebene sowie in der späteren Lungenfunktion Unterschiede vorhanden sind. In weiteren Untersuchungen unserer Forschungsgruppe konnten beispielsweise geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung insulinähnlicher Wachstumsfaktoren (IGF) nachgewiesen werden [54].

Kinder, welche intrauterin rauchexponiert sind, werden dies mit hoher Wahrscheinlichkeit auch postnatal sein. In unserem Modell war ein solches Szenario nicht Teil der Untersuchung. Eine weitere Exposition des Nachwuchses mit niedrig konzentrierter Rauchkonzentration als Simulation von Passivrauchen, hätte möglicherweise Unterschiede in der Lungenhistologie hervorgerufen.

Zudem beträgt die Dauer der Schwangerschaft der Maus 21 Tage, so dass die Dauer der Rauchexposition kurz ist. So konnten beispielsweise Rinaldi et al. feststellen, dass emphysemtypische Läsionen in der Lunge bei rauchexponierten Mäusen typischerweise nach einer 6-monatigen Exposition auftreten [60].

Das Lungengewebe stellt sich unter dem Mikroskop teils sehr heterogen dar. So erschienen unter dem Lichtmikroskop einige Areale dichter als andere, was durchaus auch an der Methodik liegen könnte. Durch das sehr filigrane Gewebe der kleinen Lungen, waren leichtere Quetschungen, beispielsweise durch die Schnittweise, kaum zu vermeiden.

Zwar konnte durch die Software fehlerhaftes Gewebe weggelassen werden, dennoch führte dies teils zu deutlichen qualitativen Unterschieden. Durch die heterogene Darstellung erklärt sich auch die teils große Standardabweichung der Ergebnisse.

6 Zusammenfassung

Mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft stellt für das ungeborene Kind ein Risiko dar und hat auch postnatal längerfristige Auswirkungen auf den gesamten Organismus des Nachwuchses. Aktuellen Daten von 2018 zufolge, haben 10,9% der Mütter von 0- bis 6-jährigen Kindern in Deutschland während der Schwangerschaft geraucht [14].

Ziel dieser Studie war es die Auswirkungen intrauteriner Zigarettenrauchexposition auf die Histologie der Lunge des Nachwuchses am Mausmodell zu untersuchen.

Dafür wurde zunächst ein Rauchmodell für trächtige Mäuse etabliert. Dessen Nachwuchs wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten, fetal, 3 Wochen alt und 8 Wochen alt untersucht. Dafür wurde die Lunge der fetalen Mäuse durch Antikörperfärbungen mit β -Tubulin IV und α smooth muscle actin untersucht. Die Lungen der 3 und 8 Wochen alten Lungen wurden quantitativ-stereologisch ausgewertet und daraus die *Mean Chord Length*, Gesamtalveolaroberfläche und Gesamtoberflächendichte des Alveolarepithels bestimmt.

Durch die Messung des Cotinin im Urin konnte eine ausreichende Rauchkonzentration der Experimentalgruppe nachgewiesen werden.

Keine der histologischen Untersuchungen, einschließlich der Antikörperfärbungen der fetalen Lungen, zeigte bei den 3 und 8 Wochen alten Lungen Unterschiede zwischen der berauchten und nicht-berauchten Gruppe. Daher ist besonders interessant, dass molekulargenetische Untersuchungen bereits nachweisbare Veränderungen aufzeigen.

7 Literaturverzeichnis

1. Schünke, M., et al., *Prometheus. Hals und Innere Organe*. Auflage. Thieme Verlag. Stuttgart, 2005: p. 105-113.
2. World Health, O., *WHO report on the global tobacco epidemic, 2019: offer help to quit tobacco use*. 2019, Geneva: World Health Organization.
3. Gibson, G., et al., *The European lung white book*. 2013.
4. Kramer, M.S., *Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis*. Bull World Health Organ, 1987. **65**(5): p. 663-737.
5. Jaakkola, J.J.K. and M. Gissler, *Maternal Smoking in Pregnancy, Fetal Development, and Childhood Asthma*. American Journal of Public Health, 2004. **94**(1): p. 136-140.
6. Kiechl-Kohlendorfer, U., et al., *Smoking in pregnancy: a risk factor for adverse neurodevelopmental outcome in preterm infants?* Acta Pædiatrica, 2010. **99**(7): p. 1016-1019.
7. Torre, L.A., R.L. Siegel, and A. Jemal, *Lung cancer statistics*. Lung cancer and personalized medicine, 2016: p. 1-19.
8. Jha, P. and R. Peto, *Global Effects of Smoking, of Quitting, and of Taxing Tobacco*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(1): p. 60-68.
9. Steidl, F. and B.U. Wigger, *External Costs of Smoking in Germany*. Wirtschaftsdienst, 2015. **95**(8): p. 563-568.
10. *WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking*. 2015, World Health Organisation.
11. Zeiher, J. and B. Kuntz, *Rauchen bei Erwachsenen in Deutschland*. 2017, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
12. Fleitmann, S., et al., *Women and smoking*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2010. **53**(2): p. 117-124.
13. Peristat, E. and A. Macfarlane, *Euro-Peristat Project. European Perinatal Health Report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015*. 2018.
14. Kuntz, B., et al., *Rauchen in der Schwangerschaft – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends*. 2018, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
15. Smedberg, J., et al., *Characteristics of women who continue smoking during pregnancy: a cross-sectional study of pregnant women and new mothers in 15 European countries*. BMC Pregnancy Childbirth, 2014. **14**: p. 213.
16. Abel, E.L., *Smoking during pregnancy: a review of effects on growth and development of offspring*. Human biology, 1980: p. 593-625.
17. Gibbs, K., J.M. Collaco, and S.A. McGrath-Morrow, *Impact of tobacco smoke and nicotine exposure on lung development*. Chest, 2016. **149**(2): p. 552-561.
18. Castles, A., et al., *Effects of smoking during pregnancy. Five meta-analyses*. Am J Prev Med, 1999. **16**(3): p. 208-15.
19. Lambers, D.S. and K.E. Clark, *The maternal and fetal physiologic effects of nicotine*. Seminars in Perinatology, 1996. **20**(2): p. 115-126.
20. Gilliland, F.D., et al., *Maternal smoking during pregnancy, environmental tobacco smoke exposure and childhood lung function*. Thorax, 2000. **55**(4): p. 271-6.
21. Beyer, D., H. Mitfessel, and A. Gillissen, *Maternal smoking promotes chronic obstructive lung disease in the offspring as adults*. Eur J Med Res, 2009. **14 Suppl 4**: p. 27-31.

22. Riedel, C., et al., *Parental smoking and childhood obesity: higher effect estimates for maternal smoking in pregnancy compared with paternal smoking—a meta-analysis*. International Journal of Epidemiology, 2014. **43**(5): p. 1593-1606.
23. Landau, L.I., *Tobacco smoke exposure and tracking of lung function into adult life*. Paediatr Respir Rev, 2008. **9**(1): p. 39-43; quiz 43-4.
24. Gilliland, F.D., et al., *Regular smoking and asthma incidence in adolescents*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(10): p. 1094-100.
25. Olds, D.L., C.R. Henderson, and R. Tatelbaum, *Intellectual Impairment in Children of Women Who Smoke Cigarettes During Pregnancy*. Pediatrics, 1994. **93**(2): p. 221-227.
26. Vogelmeier, C., et al., *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease*. Der Internist, 2006. **47**(9): p. 885-894.
27. Vogelmeier, C., et al., *Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD)*. Pneumologie, 2007. **61**(05): p. e1-e40.
28. Collins, M., et al., *Fetal lung hypoplasia associated with maternal smoking: a morphometric analysis*. Pediatric research, 1985. **19**(4): p. 408-412.
29. Maritz, G.S., *Maternal nicotine exposure during gestation and lactation of rats induce microscopic emphysema in the offspring*. Exp Lung Res, 2002. **28**(5): p. 391-403.
30. Sekhon, H.S., et al., *Maternal Nicotine Exposure Upregulates Collagen Gene Expression in Fetal Monkey Lung: Association with $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2002. **26**(1): p. 31-41.
31. Sekhon, H., et al., *Prenatal nicotine exposure increases connective tissue expression in foetal monkey pulmonary vessels*. European respiratory journal, 2004. **23**(6): p. 906-915.
32. Wongtrakool, C., et al., *Prenatal nicotine exposure alters lung function and airway geometry through $\alpha 7$ nicotinic receptors*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2012. **46**(5): p. 695-702.
33. Sandberg, K.L., et al., *Fetal nicotine exposure increases airway responsiveness and alters airway wall composition in young lambs*. Respiratory physiology & neurobiology, 2011. **176**(1-2): p. 57-67.
34. Schneider, S., et al., *E-Zigaretten in der Schwangerschaft—ein neues Risiko in der Neonatologie?* Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2017. **77**(11): p. 1144-1146.
35. Scherle, W., *A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology*. Mikroskopie, 1970. **26**(1): p. 57-60.
36. Mandarim-de-Lacerda, C.A., *Stereological tools in biomedical research*. An Acad Bras Cienc, 2003. **75**(4): p. 469-86.
37. Shao, W.-H., et al., *Stereological Investigation of Age-Related Changes of the Capillaries in White Matter*. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 2010. **293**(8): p. 1400-1407.
38. Weibel, E.R., C.C.W. Hsia, and M. Ochs, *How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry*. Journal of Applied Physiology, 2007. **102**(1): p. 459-467.
39. Hsia, C.C., et al., *An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(4): p. 394-418.
40. Knudsen, L., et al., *Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach*. J Appl Physiol (1985), 2010. **108**(2): p. 412-21.

41. Fehrenbach, H., *Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective*. European Respiratory Review, 2006. **15**(101): p. 136-147.
42. Nathan, P., *Effects of maternal smoking on lung function and pulmonary signaling pathways in the offspring : a murine model*. 2015.
43. Blacquiere, M.J., et al., *Maternal smoking during pregnancy induces airway remodelling in mice offspring*. Eur Respir J, 2009. **33**(5): p. 1133-40.
44. Drummond, D., et al., *Combined Effects of in Utero and Adolescent Tobacco Smoke Exposure on Lung Function in C57Bl/6J Mice*. Environ Health Perspect, 2017. **125**(3): p. 392-399.
45. Rouse, R.L., M.J. Boudreaux, and A.L. Penn, *In utero environmental tobacco smoke exposure alters gene expression in lungs of adult BALB/c mice*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(12): p. 1757-66.
46. Hammer, B., et al., *In utero exposure to cigarette smoke and effects across generations: A conference of animals on asthma*. Clinical & Experimental Allergy, 2018. **48**(11): p. 1378-1390.
47. Pincus-Knackstedt, M.K., et al., *Prenatal stress enhances susceptibility of murine adult offspring toward airway inflammation*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8484-92.
48. Cnattingius, S., *The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes*. Nicotine Tob Res, 2004. **6 Suppl 2**: p. S125-40.
49. Schneider, J.P. and M. Ochs, *Alterations of mouse lung tissue dimensions during processing for morphometry: A comparison of methods*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2014. **306**(4): p. L341-L350.
50. Wu, F.Y., et al., *Comparison of urinary and plasma cotinine levels during the three trimesters of pregnancy*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2008. **22**(3): p. 296-301.
51. Siu, E.C. and R.F. Tyndale, *Characterization and comparison of nicotine and cotinine metabolism in vitro and in vivo in DBA/2 and C57BL/6 mice*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(3): p. 826-34.
52. Pickett, K.E., et al., *Self-reported smoking, cotinine levels, and patterns of smoking in pregnancy*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2005. **19**(5): p. 368-76.
53. Larcombe, A.N., et al., *In utero cigarette smoke exposure impairs somatic and lung growth in BALB/c mice*. European Respiratory Journal, 2011. **38**(4): p. 932-938.
54. Dehmel, S., et al., *Intrauterine smoke exposure deregulates lung function, pulmonary transcriptomes, and in particular insulin-like growth factor (IGF)-1 in a sex-specific manner*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 7547.
55. Jia, J., et al., *Cigarette smoke causes acute airway disease and exacerbates chronic obstructive lung disease in neonatal mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **311**(3): p. L602-10.
56. John-Schuster, G., et al., *Inflammaging increases susceptibility to cigarette smoke-induced COPD*. Oncotarget, 2015.
57. Mitzner, W., *Use of mean airspace chord length to assess emphysema*. J Appl Physiol (1985), 2008. **105**(6): p. 1980-1.
58. Noel, A., et al., *Sex-specific lung functional changes in adult mice exposed only to second-hand smoke in utero*. Respir Res, 2017. **18**(1): p. 104.
59. Hu, L.W., et al., *Effects of in utero and Postnatal Exposure to Secondhand Smoke on Lung Function by Gender and Asthma Status: The Seven Northeastern Cities (SNEC) Study*. Respiration, 2017. **93**(3): p. 189-197.
60. Rinaldi, M., et al., *Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice*. Disease Models & Mechanisms, 2012. **5**(3): p. 333-341.

8 Anhang

Exposition	Identifikationsnummer	Geschlecht
Zigarettenrauch	01-02-14	männlich
Zigarettenrauch	02-02-14	weiblich
Zigarettenrauch	03-02-14	weiblich
Zigarettenrauch	04-02-14	weiblich
Zigarettenrauch	05-02-14	weiblich
Zigarettenrauch	06-02-14	weiblich
Zigarettenrauch	11-02-14	männlich
Zigarettenrauch	12-02-14	männlich
Raumluft	07-02-14	männlich
Raumluft	08-02-14	weiblich
Raumluft	09-02-14	weiblich
Raumluft	10-02-14	männlich

Tabelle A. 1: Gruppe der fetalen Mäuse

Exposition	Identifikationsnummer	Geschlecht
Zigarettenrauch	02-11-13	weiblich
Zigarettenrauch	04-11-13	weiblich
Zigarettenrauch	03-12-13	weiblich
Zigarettenrauch	07-12-13	weiblich
Zigarettenrauch	09-12-13	männlich
Raumluft	01-11-13	weiblich
Raumluft	03-11-13	männlich
Raumluft	01-12-13	weiblich
Raumluft	05-12-13	weiblich
Raumluft	02-12-13	weiblich
Raumluft	06-12-13	männlich

Tabelle A. 2: Gruppe der 3 Wochen alten Mäuse

Exposition	Identifikationsnummer	Geschlecht
Zigarettenrauch	3/3*	weiblich
Zigarettenrauch	7/3*	männlich
Zigarettenrauch	01-10-13	männlich
Zigarettenrauch	02-10-13	weiblich
Zigarettenrauch	03-10-13	weiblich
Zigarettenrauch	04-10-13	weiblich
Zigarettenrauch	05-10-13	männlich
Zigarettenrauch	06-10-13	weiblich
Raumluft	21/1*	männlich
Raumluft	07-10-13	männlich
Raumluft	06-11-13	weiblich
Raumluft	10-11-13	weiblich
Raumluft	13-11-13	männlich

Tabelle A. 3: Gruppe der 8 Wochen alten Mäuse

* Diese Mäuse wurden untersucht bevor eine einheitliche Nomenklatur festgelegt wurde und unterscheiden sich daher in ihren Identifikationsnummern von den anderen Mäusen.

CS			Sept 16	non septum	mcl-air	mcl-septum	Sair	Ssept	MCL in μm	MCL mean in μm	Surface Density in μm^{-1}	Surface Density mean in μm^{-1}	Surface Area in cm^2	Surface Area Mean in cm^2
	04-11-13	Nr. 1	9	11	121	1552	101	45	13,5	12,5	0,245	0,256	204,6	209,7
		Nr. 2	9	16	100	1532	98	35	11,3		0,265		214,7	
	02-11-13	Nr. 1	9	23	120	1176	111	42	17,7	16,3	0,177	0,210	167,8	205,5
		Nr. 2	11	18	131	1536	121	24	14,8		0,243		243,3	
	03-12-13	Nr. 1	10	16	142	1529	113	35	16,1	14,1	0,238	0,236	302,6	303,0
		Nr. 2	10	13	103	1497	102	45	12,0		0,234		303,5	
	07-12-13	Nr. 1	14	24	171	1993	132	69	14,9	16,2	0,228	0,222	288,6	281,6
		Nr. 2	13	20	189	1878	123	78	17,5		0,215		274,6	
	09-12-13	Nr. 1	8	16	82	1178	61	37	12,1	13,7	0,277	0,249	221,3	200,3
		Nr. 2	10	17	128	1456	106	46	15,3		0,220		179,4	

Tabelle A. 4: ausgezählte Messwerte der 3 Wochen alten Tiere (Rauchexpositionsgruppe)

AIR			Sept 16	non septum	mcl-air	mcl-septum	Sair	Ssept	MCL in μm	MCL mean in μm	Surface Density in μm^{-1}	Surface Density mean in μm^{-1}	Surface Area in cm^2	Surface Area Mean in cm^2
	01-11-13	Nr.1	10	12	91	1313	82	47	12,0	12,8	0,234	0,229	130,7	129,7
		Nr.2	11	8	116	1481	94	58	13,6		0,224		128,7	
	01-12-13	Nr. 1	12	11	117	1651	105	52	12,3	13,4	0,242	0,235	251,8	242,1
		Nr. 2	13	16	159	1917	128	66	14,4		0,227		232,3	
	05-12-13	Nr. 1	9	29	123	1413	100	38	15,1	15,3	0,236	0,230	333,5	332,1
		Nr. 2	8	19	138	1544	127	32	15,5		0,223		330,8	
	02-12-13	Nr. 1	8	9	99	1410	95	49	12,2	12,2	0,225	0,232	273,7	276,9
		Nr. 2	6	10	105	1488	104	40	12,3		0,238		280,0	
	03-11-13	Nr. 1	11	20	153	1612	112	59	16,5	15,7	0,217	0,225	214,3	219,4
		Nr. 2	9	20	134	1566	128	27	14,9		0,232		224,6	
	06-12-13	Nr. 1	15	4	198	1887	164	42	18,2	18,3	0,211	0,200	352,5	331,6
		Nr. 2	10	6	138	1310	118	41	18,3		0,200		310,7	

Tabelle A. 5: ausgezählte Messwerte der 3 Wochen alten Tiere (Kontrollgruppe)

CS			Sept 16	non septum	mcl-air	mcl-septum	Sair	Ssept	MCL in μm	MCL mean in μm	Surface Density in μm^{-1}	Surface Density mean in μm^{-1}	Surface Area in cm^2	Surface Area Mean in cm^2
	7/3	Nr. 1	6	1	98	1294	63	61	13,2	14,4	0,240	0,222	309,0	285,7
		Nr. 2	12	3	138	1541	104	69	15,6		0,205		262,4	
	3/3	Nr. 1	10	5	158	1302	102	70	21,1	20,3	0,174	0,171	168,9	165,9
		Nr. 2	7	3	89	792	67	42	19,5		0,167		162,9	
	01-10-13	Nr. 1	12	14	146	1828	126	34	13,9	15,7	0,263	0,250	220,6	202,1
		Nr. 2	9	23	135	1347	99	32	17,4		0,237		183,6	
	02-10-13	Nr. 1	8	25	102	1599	88	54	11,1	11,4	0,259	0,249	238,5	239,4
		Nr. 2	11	17	98	1467	75	66	11,6		0,239		240,2	
	03-10-13	Nr. 1	11	30	135	1331	97	41	17,6	16,0	0,222	0,256	189,6	217,0
		Nr. 2	8	24	117	1412	82	30	14,4		0,290		244,3	
	04-10-13	Nr. 1	7	19	103	1407	74	41	12,7	12,2	0,282	0,274	192,6	187,4
		Nr. 2	9	25	105	1556	91	43	11,7		0,267		182,2	
	05-10-13	Nr. 1	11	17	160	1469	138	38	18,9	17,1	0,192	0,203	245,2	264,0
		Nr. 2	9	9	127	1455	108	48	15,2		0,215		282,8	
	06-10-13	Nr. 1	10	23	113	1406	84	51	14,0	14,3	0,240	0,250	209,6	212,8
		Nr. 2	9	29	120	1432	80	47	14,6		0,259		216,0	

Tabelle A. 6: ausgezählte Messwerte der 8 Wochen alten Tiere (Rauchexpositionsgruppe)

AIR			Sept 16	non septum	mcl-air	mcl-septum	Sair	Ssept	MCL in μm	MCL mean in μm	Surface Density in μm^{-1}	Surface Density mean in μm^{-1}	Surface Area in cm^2	Surface Area Mean in cm^2
	21/1	Nr. 1	13	0	164	1996	140	52	14,3	14,2	0,240	0,231	311,0	300,5
		Nr. 2	9	0	111	1376	86	56	14,0		0,223		289,9	
	07-10-13	Nr. 1	9	31	121	1271	102	47	16,6	15,4	0,196	0,197	161,5	170,2
		Nr. 2	8	13	110	1336	90	66	14,3		0,197		178,9	
	06-11-13	Nr. 1	8	10	117	1661	99	62	12,2	13,0	0,237	0,244	286,3	295,6
		Nr. 2	14	15	154	1946	122	57	13,8		0,250		304,9	
	10-11-13	Nr. 1	11	12	115	1636	103	60	12,2	14,8	0,231	0,208	216,2	194,9
		Nr. 2	10	11	127	1266	112	45	17,4		0,186		173,7	
	13-11-13	Nr. 1	7	14	133	1397	110	35	16,6	16,0	0,222	0,209	236,5	224,2
		Nr. 2	10	17	115	1299	106	47	15,4		0,195		212,0	

Tabelle A. 7: ausgezählte Messwerte der 8 Wochen alten Tiere (Kontrollgruppe)

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich in erster Linie bei Frau Prof. Dr. Susanne Krauss-Etschmann für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie das Bereitstellen des Themas bedanken.

Ebenso möchte ich Dr. Stefan Dehmel, Petra Nathan, Dr. Gerrit John-Schuster und Dr. Önder Yildirim für die Einführung und Erklärungen in Material, Methodik und deren Auswertung danken.

Darüber hinaus bin ich etlichen Mitarbeitern des Comprehensive Pneumology Centers in München für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung zu Dank verpflichtet. Besonders Rabea Imker möchte ich für die unentbehrliche Arbeit danken.

Danken möchte ich auch Dr. Robbert Rottier und dessen Team in Rotterdam, die mich herzlich empfangen haben und ausnahmslos hilfsbereit waren.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, hier besonders meiner Mutter, die mich unermüdlich unterstützt haben.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Auswirkungen von mütterlichem Rauchen während der Schwangerschaft auf die Lungenhistologie des Nachwuchses am Mausmodell“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 03.03.2022

Nora Krahl