

Aus dem
Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dennis Nowak

**Wirkung wiederholter Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt
auf die Proliferation menschlicher Lungenfibroblasten**

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

vorgelegt von
Emilie Cécile Cannard

aus
Den Haag

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Rudolf A. Jörres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Behr

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Dennis Nowak

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Hintergrund	12
1.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD)	12
1.1.1 Definition der COPD	12
1.1.2 Chronisch-obstruktive Bronchitis	13
1.1.3 Lungenemphysem	14
1.2 Entstehung einer COPD	15
1.2.1 Umweltfaktoren bei der Entstehung einer COPD	15
1.2.2 Rauchen als Hauptrisikofaktor der COPD	15
1.3 Rolle der Lungenfibroblasten	17
1.4 Seneszenz als Faktor der COPD	18
1.5 <i>In vitro</i> -Exposition menschlicher Lungenfibroblasten gegenüber Zigarettenrauchextrakt	23
2. Fragestellung	25
3. Material und Methoden	26
3.1 Allgemeines zu den Methoden	26
3.1.1 Kulturmedium-Ansatz	26
3.1.2 Reagenzien auftauen	26
3.1.3 Arbeit mit Zellkulturen	26
3.2 Zellkultur	27

3.2.1 Zellen aus Gewebeproben anzüchten	27
3.2.2 Arbeitsschema der Zellkulturen in TC25-Flaschen	27
3.3 Weiterverarbeitung der Zellen	28
3.3.1 Trypsinisieren der Zellen aus TC25-Flaschen	28
3.3.2 Zellzählung	28
3.3.3 Proliferationsversuch	29
3.3.4 Weiterkultivieren der Zellen	29
3.3.5 Einfrieren der Zellen	29
3.4 Herstellung des Zigarettenrauchextraktes	29
3.4.1 Abrauchen der Zigaretten	29
3.4.2 Weiterverarbeiten des Zigarettenrauchextraktes	30
3.4.3 Bestimmung der Nikotinkonzentration im Zigarettenrauchextrakt	31
3.5 Proliferationsversuche	31
3.5.1 Proliferationsversuche in einer TC24-Well-Platte	31
3.5.2 Trypsinisierung einer TC24-Well-Platte	32
3.5.3 Zellzählung einer TC24-Well-Platte	32
3.6 Zigarettenrauchextrakt-Exposition	32
3.6.1 Prozentuale Verdünnung des Zigarettenrauchextraktes	32
3.6.2 Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt	33
3.6.3 Beendigung der Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt	34
3.7 Gewebegewinnung aus Operationsresektaten	34
3.8 Datenauswertung	34
4. Ergebnisse	36
4.1 Beschreibung der Zellproliferation über die Zeit	36
4.2 Relative Änderungen der Zellzahl über 4 Tage	39
4.2.1 Frühe Exposition	39
4.2.2 Späte Exposition	40

4.2.2.1 Frühe Kontroll-Exposition als Vorgeschichte	40
4.2.2.2 Frühe CSE-Exposition als Vorgeschichte	40
4.2.2.3 Vergleiche bei verschiedener Vorgeschichte	41
4.3 Aufschlüsselung in Effekte während und nach Exposition	41
4.4 Unterschiede der absoluten Zellzahlen	43
4.5 Korrelationsanalysen	44
4.5.1 Früher Expositionszeitpunkt	45
4.5.2 Später Expositionszeitpunkt	47
4.5.3 Unterschiedliche Expositionszeitpunkte	50
5. Diskussion	52
5.1 Hauptergebnis	52
5.2 Beziehung zwischen Zigarettenrauch und Seneszenz	52
5.3 Unterschiede in den Effekten der Einzelexpositionen	53
5.4 Vergleich mit den Effekten der wiederholten CSE-Exposition	53
5.5 Dynamik des zeitlichen Verlaufs	54
5.6 Heterogenität primärer Zellen	55
5.7 Konsistenz der Ergebnisse	57
5.8 Zellproliferation als Marker der Seneszenz	58
5.9 Mögliche Limitationen der Versuche	59
5.10 Schlussfolgerung	62
6. Literaturverzeichnis	63
Anhang A: Diagramme der Einzelversuche	76
Gesamtzellzahlen	76
Trypanblau-negative Zellen	84
Trypanblau-positive Zellen	91
Anhang B: Material	99
Anhang C: Poster, European Respiratory Society Annual Congress	101

Danksagung	102
Affidavit	103
Publikationsliste	104

Zusammenfassung

Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine weltweit häufige Erkrankung der Lunge und Atemwege. Sie ist in vielen Fällen mit Zigarettenrauchen und einem höheren Alter assoziiert. Ihre beiden Manifestationsformen sind die chronisch-obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem, wobei meistens Mischformen beider Entitäten vorkommen. Während bei der chronischen Bronchitis die entzündliche Reaktion der Bronchiolen im Vordergrund steht, ist das Emphysem durch die irreversible Erweiterung der Lufträume distal der *Bronchioli terminales* sowie die Zerstörung der alveolären Struktur charakterisiert; auch sind nach gängiger Meinung entzündliche Prozesse wesentlich. Es wird zwischen unterschiedlichen Typen des Emphysems differenziert, wobei das zentrilobuläre Emphysem am stärksten mit dem Rauchen von Tabak in Verbindung gebracht wird. Bei allen Veränderungen des Lungengerüsts sind Fibroblasten als essentielle Strukturzellen von Bedeutung, und aufgrund der Notwendigkeit zur Erhaltung der Struktur ist die Teilungsfähigkeit dieser Zellen für die dauerhafte Integrität der Lunge relevant. Entsprechend könnte eine Abnahme dieser Fähigkeit durch äußere Einflüsse mitursächlich für Strukturschäden wie das Lungenemphysem sein.

Andererseits gilt eine reduzierte Proliferationsfähigkeit von Zellen als typisches Zeichen der Zellalterung bzw. zellulären Seneszenz, und es gibt Daten derart, dass eine induzierte oder vorgezogene Seneszenz vor allem bei Rauchern auftritt. Daher gibt es Grund zu der Annahme, dass die zelluläre Seneszenz einen wesentlichen Faktor bei der Genese und Progression des Lungenemphysems darstellt. Auf diesen Zusammenhang zwischen Seneszenz und Emphysem deuten eine Reihe von Arbeiten hin, in denen eine erhöhte Anzahl seneszenten Zellen bei Patienten mit Emphysem nachgewiesen wurde. Derartige Effekte ließen sich in Zellkulturmodellen verifizieren. Die typischen Expositionen eines Rauchers erstrecken sich über viele Jahre, d.h. erfolgen in vielfacher Wiederholung. Daher stellt sich die Frage, inwieweit mit einmaliger Exposition erhaltene Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind. Entsprechend war das Ziel dieser Arbeit, zu ermitteln, wie eine wiederholte im Vergleich zu einer einfachen Exposition gegenüber Zigarettenrauch die Proliferationsrate und -kapazität menschlicher Lungenfibroblasten beeinflusst. Zugleich wurde die Frage adressiert, ob eine frühe und eine späte Exposition unterschiedliche Effekte hervorrufen, und zwar relativ zu den Kurven abnehmender Proliferationsraten, welche unter Kulturbedingungen das Eintreten der

natürlicherweise auftretenden replikativen Seneszenz signalisieren.

Zu diesem Zweck wurden primäre menschliche Lungenfibroblasten, die aus Operationsresektaten gewonnen worden waren, zunächst in Nährmedium kultiviert und anschließend über 48 Stunden gegenüber 2% Zigarettenrauchextrakt (CSE) exponiert. Dabei wurden eine Zellreihe zu einem frühen Zeitpunkt und eine Zellreihe zu einem späteren Zeitpunkt belastet. Parallel dazu wurde eine weitere Zellreihe zu beiden Zeitpunkten exponiert. Als Kontrolle wurden Zellen des gleichen Spenders ausschließlich mit Nährmedium versorgt. Zählungen fanden immer zu Anfang und Ende der jeweils 2-tägigen Exposition statt, außerdem wurden nach dem Zeitpunkt der zweiten Exposition drei weitere Zählungen durchgeführt.

Insgesamt konnten 15 Versuche mit Zellen von 13 verschiedenen Spendern erfolgreich durchgeführt und vollständig ausgewertet werden. Diese zeigten, dass bei einmaliger Exposition gegenüber CSE diejenige zum späten Zeitpunkt im Vergleich zu derjenigen zum frühen Zeitpunkt einen signifikant größeren relativen dämpfenden Effekt auf die Zellproliferation hatte, d.h. die intrinsische replikative Seneszenz mit zunehmendem Zellalter eine stärkere Rolle für den CSE-induzierten Effekt spielte. Dies deutet auf ein Zusammenwirken zwischen induzierten Veränderungen und intrinsischer Disposition zur Seneszenz hin. Bei zweifacher Exposition gegenüber CSE waren zwar die Zellzahlen am Ende der Versuchsreihe am geringsten, gleichwohl war der relative Effekt der zweiten Exposition kleiner als dies der Fall war, wenn nicht bereits vorher CSE appliziert wurde. Dies wiederum deutet darauf hin, dass die Zellen durch die erste Exposition einen wenigstens teilweise wirksamen Schutzmechanismus aktiviert hatten. Vermutlich handelte es sich um die Aufregulierung antioxidativer Mechanismen, wie durch anderweitig erhobene Daten nahegelegt. Bei den Versuchen traten keine erkennbaren Effekte auf die Zellintegrität im Sinne der klassischen Trypanblau-Färbung auf.

Die Resultate deuten auf einen zu allen Zeitpunkten der Exposition irreversiblen Effekt von Zigarettenrauch auf die Proliferation primärer Lungenfibroblasten hin. Die Irreversibilität stützt die Hypothese, dass eine durch Rauchen induzierte Seneszenz zur Genese eines Lungenemphysems beitragen könnte und dies phänomenologisch im Zellkulturversuch zu verifizieren ist. Andererseits zeigen sie, dass dann, wenn man die *in vivo*-Realität wiederholter Expositionen simulieren will, am Ende mit geringeren Effekten als bei einmaligen Expositionen zu rechnen ist. Dieser relativ schützende

Effekt einer frühen CSE-Exposition auf die Antwort gegenüber einer folgenden Exposition deutet darauf hin, dass das Studium potentieller Mechanismen einer CSE-induzierten Seneszenz und ihrer relativen Bedeutung in Langzeitexperimenten mit wiederholter oder gar kontinuierlicher Exposition zu anderen Schlüssen führen könnte als die Kurzzeitexperimente mit einmaliger Exposition, die üblicherweise durchgeführt werden. Obgleich die Untersuchung nicht die zugrundeliegenden Mechanismen analysierte, lieferte sie einen Beitrag dazu, mittels Zellkulturexperimenten die Genese der COPD besser zu verstehen.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Apparatur zum Abrauchen der Zigaretten in D-MEM	30
Abb. 2: Aufteilung der Wells einer TC24-Well-Platte mit 2 Experimenten/Proben pro Platte	31
Abb. 3: Aufteilung der Wells einer TC24-Well-Platte mit jeweils 2 Wells pro Zählung	33
Abb. 4: Expositionszeitpunkte bei Kontrolle, früher Exposition, später Exposition und wiederholter Exposition	33
Abb. 5: Proliferationskurven der Gesamtzellzahlen für die 4 Versuchsreihen	36
Abb. 6: Proliferationskurven der Trypanblau-negativen Zellen für die 4 Versuchsreihen	37
Abb. 7: Proliferationskurven der Trypanblau-positiven Zellen für die 4 Versuchsreihen	38
Abb. 8: Totale relative Änderung der Proliferationsraten im 4-tägigen Intervall zwischen Beginn der Exposition und Ende der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen	40
Abb. 9: Akute relative Änderung der Proliferationsraten während der 2-tägigen Exposition unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen	42
Abb. 10: Relative Änderung der Proliferationsraten während der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen	42
Abb. 11: Veränderungen der absoluten Zellzahlen im 4-tägigen Intervall zwischen Beginn der Exposition und Ende der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen	43
Abb. 12: Veränderungen der absoluten Zellzahlen während der 2-tägigen Exposition unter unterschiedlichen Bedingungen	44
Abb. 13: Veränderungen der absoluten Zellzahlen während der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Bedingungen	44
Abb. 14: Korrelationsanalyse zwischen den Medium-Gaben zum frühen Expositionszeitpunkt	45
Abb. 15: Korrelationsanalyse zwischen den CSE-Gaben zum frühen Expositionszeitpunkt	46

Abb. 16: Korrelationsanalyse zwischen den CSE-Gaben und den Medium-Gaben zum frühen Expositionszeitpunkt	46
Abb. 17: Korrelationsanalyse zwischen der einmaligen späten CSE-Gabe und der doppelten Medium-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt	47
Abb. 18: Korrelationsanalyse zwischen der einmaligen frühen CSE-Gabe und der doppelten CSE-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt	48
Abb. 19: Korrelationsanalyse zwischen der doppelten und der einmaligen späten CSE-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt	49
Abb. 20: Korrelationsanalyse zwischen der doppelten Medium-Gabe und der einmaligen frühen CSE-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt	49
Abb. 21: Korrelationsanalyse zwischen der doppelten CSE-Gabe und der doppelten Medium-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt	50
Abb. 22: Korrelationsanalyse zwischen dem frühen und dem späten Expositionszeitpunkt der doppelten CSE-Gabe	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mittelwerte und Standardfehler der Gesamtzellzahlen für jeden Zählungstag und den 4 Versuchsreihen	37
Tab. 2: Mittelwerte und Standardfehler der Trypanblau-negativen Zellen für jeden Zählungstag und den 4 Versuchsreihen	38
Tab. 3: Mittelwerte und Standardfehler der Trypanblau-positiven Zellen für jeden Zählungstag und den 4 Versuchsreihen	39

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (Cyclin-dependent Kinase)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
CSE	Zigarettenrauchextrakt (Cigarette smoke extract)
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
CT	Computertomographie
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal calf serum)
FEV ₁	Forciertes Einsekundenvolumen (Forced Expiratory Volume in the first second)
g	Schwerebeschleunigung
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HBSS	Hanks' balanced salt solution
IFN- α	Interferon-alpha
IGF 1 & 2	Insulin-like Growth Factor 1 & 2
l	Liter
log ₁₀	dekadischer Logarithmus
miRNA	microRNA
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mm ²	Quadratmillimeter
p	Signifikanzwert
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
pH	pondus Hydrogenii
p16	CDK-Inhibitor Protein 16
p16 ^{INK4a}	CDK-Inhibitor am Genlocus INK4a
p21	CDK-Inhibitor Protein 21
p21 ^{CIP1/WAF1/Sdi1}	CDK-Inhibitor am Genlocus CIP1/WAF1/Sdi1
p53	Tumorsuppressor
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RV	Residualvolumen
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
Tab.	Tabelle
TLCO	Diffusionskapazität
(v/v)	Volume (of solute) per volume (of solvent)
WHO	World Health Organisation
°C	Grad Celsius

1. HINTERGRUND

1.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

1.1.1 Definition der COPD

Die Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) definiert die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung als „eine heterogene Lungenerkrankung, die durch chronische Atemwegssymptome (Atemnot, Husten, Sputum-Produktion und/oder Exazerbationen) aufgrund von Anomalien der Atemwege (Bronchitis, Bronchiolitis) und/oder der Alveolen (Emphysem) gekennzeichnet ist, die eine anhaltende, oft fortschreitende Obstruktion des Luftstroms verursachen“ [GOLD 2024 Report].

Die COPD ist eine schwere chronische Erkrankung mit hoher Prävalenz in der alternden Bevölkerung. Inzwischen ist sie weltweit die dritthäufigste Todesursache und war 2019 die Ursache für ca. 3,23 Millionen Todesfälle weltweit [WHO, 2023]. Sie ist somit eine der Hauptursachen für chronische Morbidität und Mortalität auf der Welt. Viele Menschen leiden jahrelang unter der Erkrankung und versterben verfrüht durch die Lungenerkrankung oder eine ihrer Komorbiditäten. Aufgrund der andauernden Exposition gegenüber Risikofaktoren, vor allem dem Zigarettenrauchen, sowie der Alterung der Bevölkerung wird die Prävalenz der COPD in den kommenden Jahrzehnten voraussichtlich weiter zunehmen [Mathers & Loncar, 2006]. Zusätzlich ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen, weil viele Erkrankte erst bei fortgeschrittener Krankheit einen Arzt aufsuchen, außerdem werden die Symptome nicht immer von Anfang an einer COPD zugeordnet.

Die weite Verbreitung der COPD und ihre weitreichenden ökonomischen Folgen [Sullivan *et al.*, 2000; Zafari *et al.*, 2021] lassen das Interesse an der COPD seit Jahren kontinuierlich steigen, und dem zunehmenden Wissen über die Erkrankung folgt eine stete Fortentwicklung der therapeutischen Möglichkeiten und Perspektiven [Celli, 2006]. So sollte die COPD aufgrund neuer Erkenntnisse regelmäßig neu kategorisiert und phänotypisiert werden [Celli *et al.*, 2022]. Als Beispiel kann die Häufigkeit der Exazerbation, die inzwischen als wichtige Vorhersagevariable für den Krankheitsverlauf gilt, genannt werden [z. B. Anzueto, 2006; Miravitlles *et al.*, 2013].

Während bei der gesunden Lunge die elastische Rückstellkraft einen Kollaps der kleinen Bronchien während der Ausatmung verhindert, kommt es bei der COPD zu einer Abnahme der Elastizität mit einem expiratorischen Kollaps der Atemwege und

folglich zur Atemflussbegrenzung [MacNee, 2005], die sich in einer Lungenüberblähung und Abnahme des inspiratorischen Reservevolumens manifestiert.

Die chronisch-obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem stellen die beiden pulmonalen Hauptmanifestationsformen bzw. Phänotypen der COPD dar. In der Regel weisen Patienten eine Mischung beider Formen auf, wohingegen ein isoliertes Auftreten eines der beiden genannten Erscheinungsbilder selten ist. Für die Quantifizierung der verschiedenen ausgeprägten Anteile waren lange aufwendige Verfahren erforderlich, in den letzten Jahren spielt die Computertomographie (CT) jedoch eine zunehmende Rolle bei der Einschätzung der COPD-Phänotypen [Bhatt *et al.*, 2019].

1.1.2 Chronisch-obstruktive Bronchitis

Laut Definition der WHO liegt eine chronische Bronchitis vor, wenn ein Patient über wenigstens drei Monate pro Jahr in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Jahren einen produktiven Husten aufweist und andere Ursachen ausgeschlossen sind [WHO 1961]. Liegt zusätzlich eine Einschränkung des Atemflusses vor, so handelt es sich um eine chronisch-obstruktive Bronchitis. Hierbei handelt es sich um die häufigste und klinisch auffälligste Form der COPD.

Während das Leitsymptom im frühen Stadium insbesondere morgens auftretender produktiver Husten ist, kommt es im Laufe der Zeit zu ganztägigen Beschwerden mit häufigen Atemwegsinfekten im Rahmen von Infekt-Exazerbationen sowie einem schubweisen Fortschreiten der Belastungsdyspnoe bis hin zur Ruhedyspnoe.

Charakteristischerweise liegt bei einer chronisch-obstruktiven Bronchitis eine chronische Inflammation auf Ebene der Bronchiolen und des Lungenparenchyms vor. Hieran beteiligt sind vor allem Neutrophile, Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten [MacNee, 2005; Caramori *et al.*, 2016]. Das Epithel der zentralen Luftwege sowie die für die Schleimproduktion zuständigen Drüsenzellen sind Hauptschauplätze der Entzündung. Damit einhergehend kommt es zur Steigerung der Mukusproduktion, Reduzierung des Zilienschlags und Zunahme der Durchlässigkeit des Epithels [Hogg, 2004; MacNee, 2005]. Während die Schleimproduktion in frühen Stadien noch nachrangig ist, beeinflusst die steigende Mukusproduktion mit Voranschreiten der Erkrankung das zunehmende Exazerbationsrisiko, wobei diese chronische Schleimproduktion möglicherweise unter anderem eine Antwort auf die chronische Inflammation der Submucosa darstellt [MacNee, 2005]. Schließlich kommt es in

fortgeschrittenen Stadien zu einer ausgeprägten Behinderung des Gasaustausches in der Lunge mit darauffolgender Hypoxie und Hyperkapnie [Paliogiannis *et al.*, 2018].

Die nichtobstruktive Form der chronischen Bronchitis kann durch den Wegfall der schädlichen Substanzen sowie eine intensive Schulung der Patienten zumindest teilweise rückgängig sein. Ist hingegen eine Obstruktion bereits vorhanden, wird eine Linderung der Symptome durch den Einsatz kurz- oder langwirksamer Beta-2-Sympathomimetika und Anticholinergika, inhalativer Corticosteroide, Roflumilast, Mukolytika sowie Atemphysiotherapie angestrebt. Die Therapie wird ergänzt durch eine Immunisierung gegen Pneumokokken und Influenza und schließlich können bei ausgeprägter Erkrankung eine Sauerstofflangzeittherapie sowie auch mechanische Maßnahmen wie z.B. eine nicht-invasive Beatmung zum Einsatz kommen [z.B. Appleton *et al.*, 2006; Budweiser *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 2014; Chong *et al.*, 2017].

1.1.3 Lungenemphysem

Als Lungenemphysem wird eine irreversible Erweiterung der Lufträume distal der terminalen Bronchiolen bezeichnet. Wie bei der chronisch-obstruktiven Bronchitis sind vermutlich chronisch-entzündliche Prozesse ursächlich für die Entwicklung des Lungenemphysems. Allerdings kommt es beim Emphysem zu einer strukturellen Zerstörung der Alveolararchitektur als kennzeichnendes Merkmal. In der Gesamtbevölkerung liegt die Prävalenz des Lungenemphysems weltweit schätzungsweise bei 1,8% [Halbert *et al.*, 2006]. Allerdings zeigten Analysen von Autopsie-Ergebnissen, dass bei bis zu 50% der Obduktionen Zeichen eines, allerdings zumeist gering ausgeprägten, Lungenemphysems nachzuweisen waren [Jinno *et al.*, 1994], hierbei waren die Veränderungen überwiegend bei Männern zu beobachten [Anderson *et al.*, 1972; Cockcroft *et al.*, 1982].

Pathophysiologisch werden drei Formen des Lungenemphysems unterschieden: das zentrilobuläre bzw. zentroazinäre Lungenemphysem, das panlobuläre bzw. panazinäre Lungenemphysem sowie das paraseptale Lungenemphysem [Lynch *et al.*, 2015; Bhatt *et al.*, 2019]. Das zentrilobuläre Emphysem ist durch Schäden im Bereich der respiratorischen Bronchiolen charakterisiert. Häufig findet sich bei diesem Emphysemtyp eine Bevorzugung der Oberlappen [Anderson & Foraker, 1973], hingegen liegt beim panlobulären Emphysem, das bei α -1-Antitrypsinmangel zu finden ist [MacNee, 2005], eher eine diffuse Verteilung vor, mit einer Betonung der Unterlappen [Anderson & Foraker, 1973]. Beim panlobulären Lungenemphysem ist der

gesamte Acinus zerstört, mit einem möglichen Verlust der alveolären Septierung. Die Beeinträchtigung der Elastizität der Lunge und des Gasaustausches ist im Vergleich zur zentrilobulären Form deutlicher ausgeprägt [Saetta *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2014]. Liegt auch eine Zerstörung der weiter proximal gelegenen Atemwege vor, kommt es zur Ausbildung großer dünnwandiger Blasen; diese Blasen können eine erhebliche Größe annehmen und sind dann auch auskultatorisch erkennbar, wobei eine chirurgische Entfernung dieser Bullae möglich ist. Das paraseptale Emphysem beschreibt emphysematöse Veränderungen im Bereich der pleuralen Oberfläche der Lunge, entweder nahe der Thoraxwand oder an den Lappenspalten angrenzend. Diese Form des Emphysems ist seltener mit signifikanten Symptomen assoziiert [Smith *et al.*, 2014].

Infolge eines Lungenemphysems kommt es häufig zu einer pulmonalen Hypertonie sowie einem *Cor pulmonale*. Hier ist es, auch aufgrund der geringen oder fehlenden Therapiemöglichkeiten, in erster Linie entscheidend, die auslösende Noxe auszuschalten. Die Prognose des Lungenemphysems ist im Vergleich zur chronisch-obstruktiven Bronchitis schlechter [Lynch *et al.*, 2018], da es sich nach gegenwärtigem Wissensstand um eine irreversible Zerstörung handelt.

1.2 Entstehung einer COPD

1.2.1 Umweltfaktoren bei der Entstehung einer COPD

Die Exposition am Arbeitsplatz gegenüber Noxen wie zum Beispiel Gasen oder Lösungsmitteldämpfen sowie Industrie- oder Metallstäuben ist ein wichtiger, häufig übersehener Faktor bei der Entstehung und dem Fortschreiten der COPD und anderer Atemwegserkrankungen. Weltweit erhöht diese Belastung am Arbeitsplatz das COPD-Risiko im Schnitt um 14%, wobei das Risiko bei Nicht-Rauchern um 31% erhöht ist [Blanc *et al.*, 2019]. Des Weiteren belegen mehrere Studien Verbindungen zwischen COPD und Luftverschmutzung sowie der Verbrennung fossiler Brennstoffe beim Kochen bei Frauen [Eisner *et al.*, 2010] in Ländern mit offenen Feuerstellen im Innenraum. Ob diese die Entstehung einer COPD nicht nur begünstigen, sondern auch verursachen können, ist noch nicht gesichert. Schließlich gehen auch ein niedriges Bildungsniveau, unabhängig vom Rauchverhalten, sowie eine Reihe damit assoziierter sozialer Faktoren mit einem erhöhten COPD-Risiko einher [Prescott *et al.*, 1999].

1.2.2 Rauchen als Hauptrisikofaktor der COPD

In Ländern mit hohem Einkommen ist Zigarettenrauch der Hauptrisikofaktor für die

Entstehung einer COPD und wird für ca. 70% der Erkrankungen verantwortlich gemacht [Soriano *et al.*, 2017]. Beispielsweise besteht ein enger Zusammenhang zwischen einem zentrilobulären Emphysem und einer Tabakrauchbelastung [MacNee, 2005]. Auch in Niedriglohnländern, in denen bis dato Umweltnoxen die wichtigsten Risikofaktoren waren, nimmt die Bedeutung des Rauchens als auslösender Faktor immer mehr zu [Adeloye *et al.*, 2022]. Dabei erhöht insbesondere die Dauer des Rauchens das Risiko, an COPD zu erkranken [Bhatt *et al.*, 2018].

Im Zigarettenrauch sind u.a. Oxidantien nachweisbar [Pryor *et al.*, 1983], die zu einer direkten Belastung der Lunge führen. Weitere Oxidantien werden durch Entzündungszellen als Reaktion auf den Rauch gebildet, wodurch der Zigarettenrauch sowohl direkt als auch indirekt das Lungengewebe schädigt [Agustí & Hogg, 2019]. Dieser oxidative Stress ist u.a. für die vorzeitige zelluläre Alterung im Sinne einer induzierten Seneszenz und die damit einhergehenden Verhaltensänderungen der Zellen von Bedeutung [Chen *et al.*, 2001; MacNee, 2016].

Nach Beendigung des Rauchens kann es, zumindest zeitweise, zu einer zahlenmäßigen Zunahme der neutrophilen Granulozyten im Sputum sowie einem Fortbestehen der Atemwegsentzündung in der bronchialen Schleimhaut kommen [Willemsen *et al.*, 2004 und 2005]. Diese entzündliche Antwort der Lunge, die auch nach Beendigung des Rauchens persistieren kann, spielt vermutlich ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und Progression der COPD. Dabei entstehen die Gewebeveränderungen zum einen durch die Schädigung des Gewebes und zum anderen durch das Fehlen einer anschließenden Wiederherstellung der Organstruktur durch Reparaturmechanismen. So kommt es zum Beispiel zur vermehrten Schleimproduktion mit gleichzeitiger Behinderung des Transports [Pauwels & Rabe, 2004; Di Stefano *et al.*, 2004]. Diese fortbestehende entzündliche Antwort kann unter anderem durch eine gesteigerte Sekretion von Prostaglandin E₂ generiert werden, verantwortlich hierfür ist eine Unterproduktion entsprechender miRNA-Moleküle (miR-146a) [Sato *et al.*, 2010]. Dies könnte den eher geringen Erfolg entzündungshemmender Medikamente bei der COPD erklären.

Die Aufrechterhaltung der Atemwegsentzündung würde mit der von Oelsner und Mitarbeitern [Oelsner *et al.*, 2020] beobachteten persistierenden Akzeleration der Lungenfunktionsabnahme auch nach Beendigung des Rauchens korrelieren. Dieses Phänomen war selbst bei ehemaligen Rauchern mit einer Belastung unter 10 Pack-

years sowie bei Rauchern, die weniger als 5 Zigaretten am Tag rauchten nachweisbar; somit gibt es beim Tabakkonsum mutmaßlich keinen Schwellenwert, sondern die bloße Tatsache zu rauchen ist bereits wesentlich für die Entstehung einer COPD. Warum eine Vielzahl von Rauchern, in Anbetracht der großen Mengen an aggressiven chemischen Inhaltsstoffen im Zigarettenrauch, nur relativ leichte Symptome und eine geringe Atemwegsobstruktion entwickeln, ist nach wie vor ungeklärt, und die Untersuchung dieses Phänomens könnte zum Verständnis der COPD beitragen.

Trotz dieser Erkenntnisse, ist die Beendigung des Rauchens weiterhin die effektivste Therapie der COPD [Fletcher & Peto, 1977; Anthonisen *et al.*, 2002; Anzueto, 2006] und kann zu einer Besserung der Symptome sowie einer teilweisen Normalisierung der altersabhängigen Einschränkung der Lungenfunktion führen [Anthonisen *et al.*, 2002; Anzueto, 2006; Kohansal *et al.*, 2009]. Die bei Rauchern beobachtete Hyperreaktivität der Atemwege ist nach der Tabakentwöhnung ebenfalls rückläufig [Willemse *et al.*, 2004].

Zwar wurde bei Nagern die spontane Rückbildung der emphysemartigen Veränderungen alveolärer Strukturen, soweit diese durch Hungern hervorgerufen wurden, mehrfach beschrieben [Massaro *et al.*, 2002], doch scheint diese Fähigkeit beim erwachsenen Menschen nicht vorhanden zu sein. Diese Kapazität wurde bei Menschen lediglich bei sehr jungen Kindern, z.B. bei Zustand nach Lobektomie und ansonsten gesunder Lunge, beobachtet [Nakajima *et al.*, 1998]. Die bei ehemaligen Rauchern nachweisbaren Lungenfunktionsveränderungen unterstützen die Annahme, dass sich die, über Jahre entstandenen strukturellen, Veränderungen der Lunge nach Abschalten der Noxe nicht spontan zurückbilden. Folglich gibt es aktuell keine Hinweise darauf, dass die beim Emphysem entstandenen Schäden an den alveolären Strukturen reversibel sind. Entsprechend ist auch bekannt, dass die Beendigung des Rauchens rechtzeitig erfolgen muss, um zu verhindern, dass die Krankheit auch ohne weitere inhalative Belastung fortschreitet.

1.3 Rolle der Lungenfibroblasten

Fibroblasten, der häufigste Zelltyp im Lungeninterstitium [Weibel *et al.*, 1975], sind neben Epithel- und Endothelzellen aufgrund ihrer Produktion extrazellulärer Matrixproteine sowie ihrer strukturellen Unterstützung von großer Bedeutung [Plikus *et al.*, 2021]. Kommt es zur Apoptose oder zu Schäden dieser Strukturzellen, verändert sich die Lungenstruktur in Abhängigkeit von Ausmaß und Dauer der Vorgänge [Kasahara

et al., 2001; Aoshiba *et al.*, 2003; Tuder *et al.*, 2003], wodurch eine Reparatur notwendig wird.

Da alveoläre Strukturzellen gegenüber Einflüssen von außen besonders exponiert sind, müssen sie besonders schnell auf unterschiedliche Stressoren reagieren und entstandene Schäden zügig beheben. Hierfür erscheint ein kontinuierlicher Zellersatz notwendig, wofür beim Menschen unter normalen Umständen mutmaßlich ortsständige Zellen zuständig sind. Liegt jedoch eine Störung der Teilungseigenschaften dieser Zellen vor, sind irreversible Änderungen der Lungenstruktur aufgrund des fehlenden Zellersatzes die Konsequenz. So zeigten Experimente an Fibroblastenkulturen von Lungenemphysem-Patienten und gesunden Probanden Unterschiede zwischen beiden Gruppen z.B. bei der Stimulierbarkeit durch Zytokine [Noordhoek *et al.*, 2003]. Diese Beobachtungen weisen bereits in die Richtung einer zellulären Seneszenz als einem der beteiligten kausalen Faktoren.

1.4 Seneszenz als Faktor der COPD

Zelluläre Seneszenz stellt das zelluläre Korrelat von Alterungsprozessen dar, die an allen Organen auftreten, einschließlich Lunge und Haut. Der Alterungsprozess der Haut wird sowohl intrinsisch im Sinne einer chronologischen Alterung als auch extrinsisch hervorgerufen [Fisher *et al.*, 2002], weshalb er von besonderem Interesse ist. So wurden verschiedentlich Zeichen einer vorgezogenen Alterung bei Rauchern insbesondere an der Haut gezeigt [Freiman *et al.*, 2004], außerdem besteht eine Korrelation zwischen Telomerenlänge und Faltenscores des Gesichtes bei Patienten mit COPD [Lucke, 2015]. Trotz Überlagerung dieser Effekte mit denen der natürlichen Alterung ist anzunehmen, dass 20 Pack-years Rauchbelastung ca. 10 Jahren natürlicher Alterung entsprechen [Leung & Harvey, 2002]. Die mit dem Rauchen verbundenen Veränderungen der extrazellulären Matrix der Haut sind denen, die im Rahmen der natürlichen Hautalterung auftreten, teilweise ähnlich. Kürzlich konnten Zusammenhänge zwischen Veränderungen der Haut des Innenarms, als Maß für Hautalterung, und der Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid (TLCO), als möglicher Emphysem-Indikator, nachgewiesen werden [Graf, 2020]. In Übereinstimmung damit wurden die Anti-Aging-Wirkungen des bekannten Antidiabetikums Metformin mit einer Reduktion der Abnahme der TLCO über die Zeit in Verbindung gebracht; dieser Zusammenhang war für die Obstruktion, die stärker von der chronischen Bronchitis bestimmt wird, nicht nachweisbar [Kahnert *et al.*, 2022].

Die Kennzeichen der Alterung von Zellen oder Organismen sind vielfältig und umfassen die Häufung von DNA-Schäden, die mitochondriale Dysfunktion und die Verkürzung der Telomere [López-Otín *et al.*, 2013]. Die sinkende Zellteilungsbereitschaft, bis hin zum vollständigen Stopp der Proliferationsfähigkeit, ist eine herausragende, sozusagen klassische Eigenschaft (Hayflick limit) gealterter Zellen in Kultur [Hayflick & Moorhead, 1961]. Ungeachtet dessen wird die Relation zwischen der Alterung eines Organs und einer zellulären Seneszenz beim Menschen auch in Zweifel gezogen [z.B. Rubin, 2002a und 2002b; Bird *et al.*, 2003; Hayflick, 2004; de Magalhães, 2004], mit der Begründung, dass es sich bei der *in vitro* beobachteten zellulären Seneszenz zum Teil um ein Artefakt handele [z.B. Mondello *et al.*, 1999].

Bei der COPD erhobene Daten sprechen jedoch sehr wohl für eine Beziehung zwischen zellulärer Seneszenz und Alterung der Lunge oder auch der Haut. Allerdings ist die Frage, inwieweit die Seneszenz bei der COPD und insbesondere bei der Entstehung des Lungenemphysems eine Rolle spielt, nicht leicht zu beantworten. Die Prävalenz der COPD liegt bei Menschen mit einem Lebensalter über 60 Jahren 2-3x höher als bei jungen Erwachsenen [Fukuchi *et al.*, 2004; Buist *et al.*, 2007]. Neben kumulierenden Wirkungen des Zigarettenrauchens spielt vermutlich auch die zunehmende Alterung der Bevölkerung eine Rolle bei der steigenden Zahl an Erkrankten in dem Sinne, dass mehr Lebenszeit zur Verfügung steht, um die COPD manifest werden zu lassen. Warum die COPD bei älteren Individuen besonders häufig auftritt, ließe sich teils so erklären, dass die altersbedingten Veränderungen der Lungenstruktur und Lungenfunktion an sich das Risiko einer COPD erhöhen, wobei die sogenannte Alterslunge im Extremfall die COPD direkt verursachen könnte [Fukuchi, 2009].

Die Alterung der Lunge geht mit typischen Veränderungen einher. So zeigten Autopsien eine Erweiterung der Lufträume in Lungen von Menschen über 60 Jahren ohne bekannte Erkrankung der Lunge. Diese Erweiterung ging jedoch, im Gegensatz zum Lungenemphysem, nicht mit einer Destruktion der alveolären Wände einher, auch waren keine fibrotischen Veränderungen oder Entzündung nachweisbar, wie sie häufig beim Emphysem lokal zu sehen sind [Richards, 1956; Verbeken *et al.*, 1992]. Eine weitere Unterscheidung zum Emphysem war die gleichmäßigere Verteilung der Veränderungen.

Wie beim Emphysem ließen sich Veränderungen des elastischen Gewebes

nachweisen [Andreotti *et al.*, 1983], welche die funktionell messbare Abnahme der elastischen Rückstellkraft der Lunge im Alter erklären könnten. Allerdings ist die Minderung im Rahmen der Alterung weniger ausgeprägt als beim Emphysem. Der damit einhergehende expiratorische Kollaps der kleinen Atemwege führt zu einem verstärkten Auftreten von sogenannter gefesselter Luft (air trapping), d.h. Lungenvolumina und -bereichen, die nur sehr schlecht belüftet sind und in der Regel mit einer Lungenüberblähung einhergehen. Diese Veränderungen sind wiederum bildmorphologisch in der CT als Abnahme der Lungendichte greifbar. Die Änderungen der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix betreffen nicht nur die Lunge, vielmehr handelt es sich um ein generell bei der Organalterung nachweisbares Phänomen [Ladislav, 2000].

Funktionell kommt es neben einer Abnahme der elastischen Rückstellkraft der Lunge auch zu einer Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks (PaO_2). Parallel entwickelt sich eine zunehmende Steife der Thoraxwand, und die Atemmuskulatur verliert an Kraft. Hieraus resultiert eine Zunahme des Residualvolumens (RV) bei gleichzeitiger Abnahme der Vitalkapazität und des forciert expiratorischen Volumens in 1 Sekunde (FEV_1), das häufig als Marker einer Atemwegsobstruktion verwendet wird. Außerdem kommt es zur Abnahme der funktionellen Reserve mit Zunahme des Risikos von Lungenerkrankungen [Campbell & Lefrak, 1978; Rossi *et al.*, 1996]. Trotzdem bleibt das respiratorische System auch im Alter in der Regel in der Lage, einen ausreichenden Gasaustausch sowohl in Ruhe als auch bei Belastung zu erhalten [Janssens, 2005]. Insgesamt ist es schwierig und oft sogar unmöglich, zwischen altersbedingten nicht krankhaften und pathologischen Veränderungen der Lunge zu unterscheiden. Zusammenfassend besteht keine eindeutige Evidenz für ein eigentliches "seniles Emphysem", so dass der Begriff "senile Lunge" zutreffender erscheint [Verbeken *et al.*, 1992; Hansell, 2010].

Trotz der Unterschiede, wie einer fehlenden Destruktion der alveolären Wände, bestehen auch Parallelen zwischen den Veränderungen der Lunge im Alter und denen, die bei einer COPD auftreten. Neben der Erweiterung der distalen Lufträume stellt der erwähnte Verlust der elastischen Rückstellkraft der Lunge eine herausragende Gemeinsamkeit zwischen seniler Lunge und COPD dar. Folglich ist das zunehmende air trapping bei beiden Entitäten nachweisbar. Auch auf zellulärer Ebene sind mit dem Alter assoziierte Mechanismen bei der COPD vorzufinden. So wurden Kennzeichen der Alterung [López-Otín *et al.*, 2013] wie DNA-Schäden, zum Beispiel durch

oxidativen Stress, aber auch Telomeren-Verkürzung, Histon-Modifikationen, Verlust der Protein-Homöostase, mitochondriale Dysfunktionen und Alterationen der zellulären Kommunikation, die als Alterserscheinungen bekannt sind, ebenfalls bei COPD-Patienten beobachtet [MacNee, 2016]. Schließlich ist die zelluläre Seneszenz ein weiteres Kennzeichen der Alterung bei der COPD.

Die oben genannten Erkenntnisse erlauben die Aufstellung der Hypothese, dass die zelluläre Seneszenz eine Gemeinsamkeit einer natürlichen Alterung und der Veränderungen der Lunge bei COPD darstellt. Hier liegt es nahe, Unterschiede im Teilungsverhalten von Lungenstrukturzellen, wie z.B. Fibroblasten, von Emphysem-Patienten und Gesunden zu eruieren, die bei der Entstehung eines Lungenemphysems eine Rolle spielen könnten. Wenn die Analogie korrekt ist, sollte sich dieser Unterschied in Anzeichen unterschiedlicher zellulärer Seneszenz bemerkbar machen. Diese würde auf irreversible Veränderungen hinweisen und eine Teilerklärung für den ab einem gewissen Zeitpunkt gewissermaßen selbständigen Verlauf der Erkrankung bieten. Diese Annahme impliziert, dass das veränderte Zellverhalten nicht akut durch entzündliche Prozesse hervorgerufen wird, sondern als persistierendes Phänomen unter standardisierten Bedingungen auch in Kultur in Abwesenheit entzündlicher Faktoren auftreten sollte.

Diese Hypothese wurde in Zellkulturstudien überprüft. Untersuchungen von Lungenfibroblasten von Patienten mit Lungenemphysem zeigten in der Tat in einer Kultur mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) eine signifikant geringere Proliferationsrate als entsprechende Fibroblasten von Patienten ohne Emphysem [Holz *et al.*, 2004]. Des Weiteren zeigte sich in der Langzeitkultur eine niedrigere proliferative Kapazität der Fibroblasten beim Emphysem, d.h. eine geringere Maximalzahl von Zellteilungen, wobei die generelle Überlebenszeit der Zellen nicht verkürzt war. Langzeitkulturen mit 1% FCS im Sinne einer geringeren Proliferationsstimulation zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch waren sowohl die gleichbleibend hohe Vitalität der Zellen, Apoptose- und Nekroserate sowie die Konzentration der Laktatdehydrogenase als Marker für eine Zellschädigung bei beiden Untersuchungsgruppen ähnlich [Holz *et al.*, 2004]. Beobachtungen der Proliferationsraten sowie der Anfärbung für die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase bei Endothelzellen der Lunge von COPD-Patienten zeigten ähnliche Ergebnisse, gleichzeitig wurden auch Verbindungen mit der Telomerenlänge und Telomerasenaktivität sowie der Zytokinproduktion und der Expression zellzyklusregulierender Proteine wie p16, p21 und p53 nachgewiesen

[Amsellem *et al.*, 2011].

In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem gegenüber denen von Patienten ohne Emphysem signifikant stärker für die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase anfärben ließen; allerdings konnte keine Verkürzung der Telomeren der Lungenfibroblasten nachgewiesen werden [Müller *et al.*, 2006]. Spätere Untersuchungen fanden hingegen eine Verkürzung der Telomerenlänge von Leukozyten im peripheren Blut bei Patienten mit COPD im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen [Savale *et al.*, 2009].

Diese Beobachtungen an Strukturzellen von COPD-Patienten und Patienten ohne COPD, bei ähnlicher Raucheranamnese, ließen vermuten, dass sich die Zellen intrinsisch voneinander unterscheiden und mutmaßlich auch auf Wachstumsstimuli mit unterschiedlichem Proliferationsverhalten reagieren. Dies war tatsächlich zu beobachten [Noordhoek *et al.*, 2003] und steht mit der Hypothese einer zellulären Seneszenz im Einklang. Da es Hinweise darauf gibt, dass Insulin und Insulin-verwandte Komponenten für Seneszenz und Langlebigkeit von Bedeutung sind, wurden auch Versuche mit Zugabe von Insulin sowie den Insulin-like growth factors IGF-1 und IGF-2 an Lungenfibroblasten durchgeführt. Bemerkenswerterweise zeigten die Zellen der Patienten mit Emphysem gegenüber denen der Patienten ohne Emphysem eine geringfügige, gleichwohl statistisch signifikante Steigerung der Proliferationsrate [Müller *et al.*, 2007].

Anhand dieser Fakten lässt sich wiederum vermuten, dass Strukturzellen der Lunge, und somit auch parenchymale Lungenfibroblasten, bei einem Lungenemphysem einer intrinsischen Veränderung unterliegen, die als zelluläre Seneszenz zu deuten ist. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass es sich bei den Versuchen nicht um eine natürliche replikative Seneszenz, sondern um eine induzierte Seneszenz handelt. Diese weist aufgrund der multiplen Mechanismen und Signalwege vielfältige Möglichkeiten der Manifestation im zellulären Verhalten auf, die Proliferationsrate und -kapazität inbegriffen [Famulski & Halloran, 2005; Rivas *et al.*, 2022].

Auch bei den häufig zusammen mit der COPD vorkommenden Gefäßerkrankungen scheint die zelluläre Seneszenz bei der Entstehung und dem Verlauf der Krankheit von Bedeutung zu sein [Erusalimsky & Kurz, 2005 und 2006; Shimizu & Minamino, 2019]. Wobei die hier involvierten Mechanismen nur teilweise von Telomeren abhängig zu

sein scheinen. Dies bestärkt die Annahme, dass eine mutmaßliche Beteiligung von Mechanismen der Seneszenz beim Lungenemphysem auf multiple Veränderungen basiert und es sich nicht um einen einzigen Mechanismus handelt. Die Beeinträchtigung von endothelialen Progenitorzellen bei Rauchern und COPD-Patienten [Paschalaki *et al.*, 2013] stützt die Vermutung einer Abnahme der Fähigkeit zur Regeneration zusätzlich. Diese Annahme ist bei kardialen Erkrankungen bereits bestätigt worden [Sato *et al.*, 2008]; hier bestand eine Beziehung zwischen der Telomerenlänge der Progenitorzellen und der Ausprägung der oxidativen Schädigung der DNA.

Basierend auf diesen und weiteren Ergebnissen, sowie in Anbetracht der physiologischen und molekularen Unterschiede im Vergleich zur natürlichen Alterung [Fukuchi, 2009], stellten eine Reihe von Autoren die Hypothese auf, dass zelluläre Alterung bei der Entstehung der COPD eine entscheidende Rolle spielt [z.B. Karrasch *et al.*, 2008; Ito & Barnes, 2009; MacNee, 2009 und 2016; Barnes *et al.*, 2019].

Die verstärkte zelluläre Alterung, wie sie beim Lungenemphysem im Vergleich zur gesunden Lunge auftritt, scheint auf dem Weg zu einer regenerativen Therapie ein entscheidendes Hindernis darzustellen. Daraus lässt sich schließen, dass das Verständnis dieser Form der Alterung, sowohl *in vivo* als auch im Rahmen von Versuchen an isolierten Zellen, von großer Bedeutung ist.

1.5 *In vitro*-Exposition menschlicher Lungenfibroblasten gegenüber Zigarettenrauchextrakt

Bekanntermaßen finden sich im Zigarettenrauch viele aggressive Komponenten, wobei diese zum Teil oxidativ wirksam sind. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die einmalige Exposition von primären menschlichen Lungenfibroblasten gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE) eine Reduktion der Zahl der Verdopplungen sowie der finalen Zellzahl verursacht. So führte die dauerhafte Exposition gegenüber CSE, in Abhängigkeit von der Dosis, zu einer erniedrigten Proliferationsrate bei Lungenfibroblasten [z.B. Tsuji *et al.*, 2004; Nyunoya *et al.*, 2006; Schindler, 2015]. Dabei fiel auf, dass es nicht zu einem kompletten Stillstand in kurzer Zeit kam, wie es bei einem zunehmenden, fortwährenden Effekt zu erwarten gewesen wäre. Bei einer Belastung mit 2% CSE wurde zudem kein Plateauwert erreicht, weshalb der Einfluss einer wiederholten Exposition gegenüber CSE sinnvoll erscheint, um den Verlauf der Empfindlichkeit gegenüber der Noxe nach ihrer ersten Applikation

aufzuklären. Zusätzlich wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die Zigarettenrauch-extrakt-Exposition einen dauerhaften Einfluss auf die Zellen hat, ohne dass weitere Schlüsse hieraus gezogen werden können. Grundsätzlich sind die Beobachtungen mit der Annahme einer induzierten zellulären Seneszenz als Einflussfaktor in der Entwicklung des Lungenemphysems jedoch im Einklang.

Folglich drängt sich die Frage auf, ob es zugleich mit der Verringerung der Proliferation auch zu einer Zunahme antioxidativer Abwehrmechanismen kommt, die die Zellen bei einer erneuten Exposition, zumindest teilweise, schützen. Hier erscheint eine Aussage zur Aktivierung solcher Schutzmechanismen anhand der Messung der proliferativen Antwort als simple, direkt im Zellverhalten messbare Methode zielführend. Des Weiteren ist es möglich, dass die Empfindlichkeit der Fibroblasten gegenüber Schadstoffen von der Phase ihres Wachstums oder ihrer Differenzierung vor Eintreten einer spontanen replikativen Seneszenz abhängt. Um die möglichen Mechanismen zu verstehen und um die Perspektiven und Grenzen des Modells der CSE-Exposition *in vitro* einschätzen zu können ist die Beantwortung dieser Fragen von Bedeutung.

Aufbauend auf diesen Überlegungen widmete sich die vorliegende Arbeit der Frage, inwiefern eine Belastung mit CSE die Antwort auf eine weitere, anschließende Exposition beeinflusst und ob bei einmaliger Exposition das Ausmaß des Einflusses vom Zeitpunkt der Applikation von CSE abhängt. Das in dieser Arbeit als Marker genutzte Proliferationsverhalten und -potential der Zellen stellt im Vergleich zu den vielen inzwischen bekannten biochemischen und molekularbiologischen Markern der Seneszenz eine simple Methode dar. Nichtsdestotrotz handelt es sich um einen empfindlichen und aussagekräftigen Marker der Seneszenz von Zellen [Holz *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006], zumal das proliferative Potential direkt mit Regenerationsfähigkeit und Gewebeerhalt in Verbindung gebracht werden kann.

2. FRAGESTELLUNG

Den oben genannten Überlegungen zufolge sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden,

1. inwiefern der Zeitpunkt einer temporären Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt die Proliferation von primären menschlichen parenchymalen Lungenfibroblasten beeinflusst,
2. welche Effekte die wiederholte temporäre Belastung mit Zigarettenrauchextrakt auf die Proliferation primärer menschlicher parenchymaler Lungenfibroblasten ausübt,
3. wie stark sich Lungenfibroblasten verschiedener Provenienz in der Antwort auf Zigarettenrauchextrakt unterscheiden und wie konsistent diese Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Versuchsbedingungen sind,
4. inwieweit die Veränderungen der Gesamtzellzahlen mit Änderungen der Anzahl an Trypanblau-negativen und Trypanblau-positiven Lungenfibroblasten einhergehen.

Zu diesem Zweck wurden im zellbiologischen Labor am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München Methoden verwendet, die bereits vorher in anderen Arbeiten erfolgreich Anwendung gefunden hatten, und für die gegenwärtige Fragestellung modifiziert. Es sei darauf hingewiesen, dass die hier beschriebenen Zellkulturversuche in den Jahren 2005 und 2006 erfolgten und mit den zu dieser Zeit im Labor zur Verfügung stehenden Technologien durchgeführt wurden. Daher sind sie auf die – gleichwohl für die Analyse der zellulären Seneszenz essentielle – Bestimmung der Proliferationsraten beschränkt. Die Daten werden in der vorliegenden Arbeit präsentiert und im Licht des heutigen Wissens diskutiert, da sie nach wie vor im Ansatz originell und im Ergebnis aussagekräftig sind. Dies betrifft auch die Verwendung primärer Zellen sowie die Analyse der Frage, ob sich die Zellen für jede Linie konsistent verhielten oder die Variation der Zellantworten unter jeder der Versuchsbedingungen ausschließlich auf Zufall beruhte. Die Hauptergebnisse wurden 2006 als Poster auf dem Kongress der European Respiratory Society (ERS) vorgestellt (siehe Anhang C).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeines zu den Methoden

3.1.1 Kulturmedium-Ansatz

Zunächst wurden 50 ml aus einer 500-ml-Flasche mit Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) entnommen. Danach wurden 50 ml fötales Kälberserum (FCS, E.G. zugelassen, getestet auf Viren und Mycoplasmen), 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 Einheiten/ml) und 2,5 ml Gentamicin hinzugegeben und das Medium ohne größere Schaumbildung gemischt. Das Medium wurde anschließend bei 4-8°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.2 Reagenzien auftauen

Zum Auftauen wurden die Reagenzien in ein maximal 37°C warmes Wasserbad gestellt, alternativ wurden sie unter fließendes warmes Wasser gehalten. Als Nächstes wurden die einzelnen Reagenzien kurz bei 37°C in den Brutschrank gestellt, somit wurden sie exakt an die Temperatur der Kultur angepasst.

3.1.3 Arbeit mit Zellkulturen

Die Arbeiten mit den Zellkulturen fanden unter einer Sicherheitswerkbank statt. Alle verwendeten Geräte mussten autoklaviert oder bei 200°C für mindestens eine Stunde (bei 250°C mindestens 30 Minuten) hitzebehandelt worden sein. Verwendete Einwegmaterialien mussten als steril und/oder pyrogenfrei gekennzeichnet sein.

Vor Arbeitsbeginn lief die Werkbank mindestens eine halbe Stunde, damit die Sterilität gewährleistet war. Vor und nach jedem einzelnen Arbeitsgang wurde die Arbeitsfläche zusätzlich obligatorisch mit Bacillol gesäubert. Es wurden immer Latexhandschuhe zum Arbeiten verwendet, diese wurden zusätzlich vor jedem Arbeitsgang mit Sterillium gereinigt. Gegenstände, die unter die Werkbank gebracht wurden, waren autoklaviert, hitzebehandelt und/oder wurden mit Bacillol gründlich desinfiziert. Die verwendeten Reagenzien waren für die Zellkultur zugelassen oder wiesen einen ausreichenden Reinheitsgrad wie steril oder pyrogenfrei auf.

Im Inneren des Brutschrankes herrschten eine Temperatur von 37°C sowie eine CO₂-Konzentration von 5%. Das verwendete CO₂ (Linde AG) hatte einen Reinheitsgrad von mindestens 4.5. Der Boden des Brutschrankes war mit 3-4 l Sterilwasser befüllt, hiermit wurde eine möglichst hohe Luftfeuchtigkeit gesichert. Das Kulturmedium der Zellen

war mit einem pH- bzw. CO₂-Indikator versetzt, so wechselte das Medium im Brutschrank von rot nach violett, wenn es nicht ausreichend mit CO₂ versorgt war. Ein Farbwechsel von rot nach orange zeigte hingegen gute Wachstumsbedingungen an, bei denen die Zellen sich teilten.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zellen aus Gewebeproben anzüchten

Die Verwendung der Zellen für Kulturversuche mit der Fragestellung der zellulären Seneszenz war durch ein positives Ethik-Votum der Institution, von der die Gewebeproben bezogen wurden, abgesichert, und die Anonymität der Spender war stets gewährleistet, zumal von den anthropometrischen Daten nur Alter und Geschlecht bekannt waren.

Als Erstes wurden die Gewebeproben unter der sterilen Werkbank mit etwas Hanks' balanced salt solution (HBSS) in einer Petrischale gewaschen und somit unerwünschte Blutreste entfernt. Anschließend wurde unerwünschtes Gewebe wie Pleura, Schwarte oder Gefäße entfernt. Im nächsten Schritt wurde die Gewebeprobe mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke zerteilt und bei Bedarf mit HBSS gewaschen.

Etwa 10-20 der so entstandenen Gewebestücke wurden in eine TC25-Flasche überführt und mit 3 ml Kulturmedium aufgefüllt. Anhand von Bewegen und Schütteln wurden die Gewebestücke möglichst gleichmäßig über den Boden der TC25-Flasche verteilt. Die Flasche wurde als Nächstes in den Inkubator gestellt und der Flaschenverschluss gelockert um die Zellen dort unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) 3-4 Tage lang anzuzüchten, währenddessen durfte die Flasche nicht bewegt werden. Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen zur Kontrolle unter dem Mikroskop angeschaut. Gleichzeitig erfolgte ein Mediumwechsel. Je nach Wachstum konnten die Zellen nach ca. 3 Wochen geerntet werden.

3.2.2 Arbeitsschema der Zellkulturen in TC25-Flaschen

Der Mediumwechsel wurde unter der sterilen Werkbank am Montag, Mittwoch und Freitag durchgeführt. Hierzu wurden der Flaschendeckel abgeschraubt und das Medium anschließend mit einer abgeflammt und auf dem Schlauch der Absaugpumpe aufgesteckten Pasteurpipette abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden Montag und Mittwoch erneut 3 ml Medium zugegeben, am Freitag wurden hingegen 5

ml Medium zugegeben, um den Bedarf der Zellen über das Wochenende zu decken. Der Hals und der Deckel der Flaschen wurden vor dem Verschließen abgeflammt, danach wurden die Flaschen erneut mit leicht geöffnetem Deckel bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.3 Weiterverarbeitung der Zellen

3.3.1 Trypsinisierung der Zellen aus TC25-Flaschen

Um die Sterilität zu gewährleisten musste die sterile Werkbank bereits seit mindestens einer halben Stunde laufen. Außerdem wurde die Absaugpumpe eingeschaltet und die Gasversorgung des Brenners geöffnet und eingeschaltet. Im nächsten Schritt wurde die TC25-Flasche mit verschlossenem Deckel aus dem Inkubator unter die sterile Werkbank gebracht und geöffnet. Die Pasteurpipette wurde abgeflammt, auf den Pumpenschlauch aufgesetzt und das Medium aus der Flasche abgesaugt. Danach wurde die Flasche mit 1 ml HBSS gespült und leicht bewegt. Als Nächstes wurde HBSS wieder abgesaugt, dann wurde 1 ml Trypsin zugegeben sowie Flaschenhals und -deckel abgeflammt. Die TC25-Flasche wurde verschlossen und 7 Minuten lang inkubiert. Dabei wurde die Flasche bewegt und leicht auf dem Tisch aufgeklopft, um die Fibroblasten von Flaschenboden zu lösen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Flasche wieder geöffnet und 1 ml Medium hinzugegeben, um die Wirkung des Trypsins zu beenden. Daraufhin wurden die Zellen in der TC25-Flasche mit einer 2 ml-Serumpipette mit aufgesetztem Gummisaugball kräftig aufgemischt, vom Flaschenboden abgespült und in ein 15 ml-Sarstedt-Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde bei Raumtemperatur und 612 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Als Nächstes wurde das Zentrifugenröhrchen mit Bacillol abgewischt, unter die sterile Werkbank gebracht und dort geöffnet. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, hierbei wurde darauf geachtet, dass das Zell-Pellet nicht versehentlich mitabgesaugt wurde. Das Pellet wurde je nach Größe in 1-4 ml Medium resuspendiert mit anschließender Zellzählung.

3.3.2 Zellzählung

Mit einer Pipette wurde ein Teil der Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und auf eine Neubauer-Zählkammer (verbesserter Typ, Tiefe 0,100 mm/0,0025 mm²) aufgetragen. Die Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension entsprach der Anzahl der Zellen pro Großquadrat mal 10 000. Fanden sich bei der Zählung weniger als 100 000 Zellen pro ml, wurden sie in der TC25-Flasche weiterkultiviert.

Waren ausreichend Zellen da ($>200.000/\text{ml}$), gab es mehrere Möglichkeiten, weiter zu verfahren: 1. Aussäen der Zellen für Proliferationsversuche in eine TC24-Well-Platte, 2. Weiterkultivieren der Zellen oder 3. Einfrieren der Zellen.

Für die Proliferationsversuche wurden Zellen der Passage 1-3 (in Ausnahmefällen 4), im Sinne der quasi-linearen Wachstumsphase von subkonfluenten Kulturen, benutzt.

3.3.3 Proliferationsversuch

Für eine TC24-Well-Platte wurden 200 000 Zellen in 12,5 ml Medium resuspendiert. Wurden die Zellen erstmals nach mehr als 48 Stunden gezählt, wurden nur 140 000 Zellen auf 12,5 ml Medium benötigt. In jede Vertiefung der TC24-Well-Platte wurden 500 μl dieses Ansatzes gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen gut durchgemischt wurden, da Fibroblasten dazu neigen, sich schnell auf dem Boden abzusetzen.

3.3.4 Weiterkultivieren der Zellen

Für die Weiterkultivierung wurden 3 ml Medium und 100.000 Zellen in eine TC25-Flasche gegeben und gut vermischt. Nachdem Flaschenhals und Flaschendeckel abgeflammt wurden, wurde die Flasche zugeschraubt, in den Brutschrank gestellt und anschließend zur Belüftung wieder leicht geöffnet.

3.3.5 Einfrieren der Zellen

Zellen, die nicht unmittelbar für die Weiterzucht oder Proliferationsversuche benötigt wurden, konnten für die spätere Verwendung eingefroren werden. Hierfür wurden 2 ml-Kryoröhrchen unter der Sicherheitswerkbank in einen Kühlblock gesetzt, die Zellen in die Röhrchen aliquotiert und mit 10% DMSO (v/v) versetzt. Nach dem Einpacken in Alufolie und einen wattierten Umschlag wurden die Zellen umgehend bei zunächst -32°C zur initialen Abkühlung und Zwischenlagerung eingefroren und nach 24 Stunden bei -80°C zwischengelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen bei ca. -140°C in die Gasphase des Flüssig-Stickstoffs gegeben und schließlich direkt im flüssigen Stickstoff gelagert.

3.4 Herstellung des Zigarettenrauchextraktes

3.4.1 Abrauchen der Zigaretten

Für die Herstellung des Zigarettenrauchextrakts wurde eine Waschflasche mit Fritte verwendet (Abb. 1). So wurde eine Zigarette der Marke Gauloises blondes („blau“;

nominell Teer 10 mg, Nikotin 0,8 mg) mit Filter 5 Minuten lang unter dem Abzug abgeraucht und der Hauptstromrauch in die mit 10 ml D-MEM gefüllte Waschflasche geleitet. Eine automatische Probennahme-Pumpe diente zum Abrauchen, die Saugrate war dabei so eingestellt, dass die Zigarette in 5 Minuten bis kurz vor dem Filter abgeraucht wurde. Eine vollständige Absorption des erzeugten Rauchs im D-MEM wurde nicht erreicht und ein Teil entwich als Nebenrauch in den Abzug.

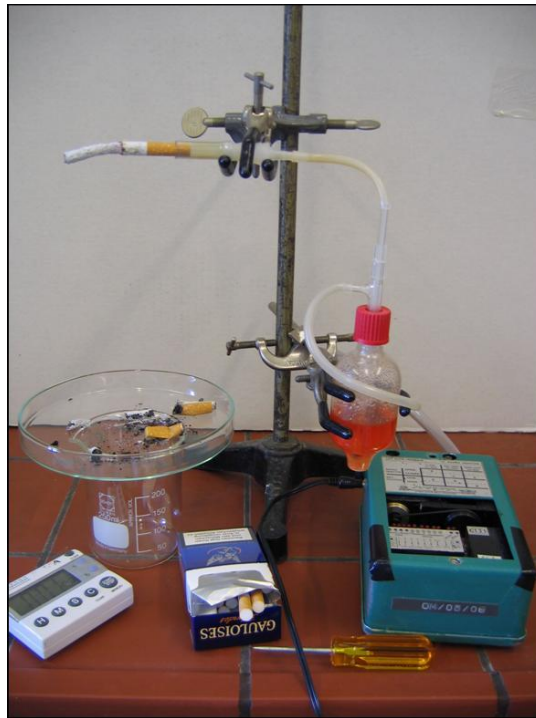


Abbildung 1: Apparatur zum Abrauchen der Zigaretten in D-MEM. Zu sehen sind hier die mit D-MEM gefüllte Waschflasche mit Fritte, die Pumpe und die kurze Schlauchverbindung von der Zigarette zur Flasche. Abbildung aus der Labordokumentation übernommen.

3.4.2 Weiterverarbeitung des Zigarettenrauchextraktes

Nach Aufnahme des Zigarettenrauchs in das D-MEM wurde der Zigarettenrauchextrakt (CSE) mit einem 0,2- μ m-Spritzenvorsatzfilter steril filtriert, aliquotiert und anschließend bei -32°C gelagert.

Alle Versuche erfolgten mit frisch aufgetautem CSE. So musste der aufwendige Herstellungsprozess nicht für jeden einzelnen Versuch erneut erfolgen, außerdem konnte auf diese Weise eine größere Variabilität zwischen den einzelnen Extrakten vermieden werden.

3.4.3 Bestimmung der Nikotinkonzentration im Zigarettenrauchextrakt

Die Nikotinkonzentrationen im Zigarettenrauchextrakt wurden mittels Gaschromatographie bestimmt (Labor Dr. Rudolf Schierl) und lagen zwischen 132 und 200 µg/ml, bei einem Mittel von 168 µg/ml.

3.5 Proliferationsversuche

3.5.1 Proliferationsversuche in einer TC24-Well-Platte

Nach Anzucht der Zellen in den Kulturflaschen wurden diese für die Experimente in TC24-Well-Platten wie in 3.3.3 beschrieben angesät. In früheren Versuchen waren Hinweise auf Randeffekte der Kulturplatten aufgefallen, wodurch es möglicherweise zu einem systematischen, mutmaßlich durch die unterschiedliche Belüftung verursachten, Fehler kommen könnte. Aus diesem Grund wurden die an den Schmalseiten gelegenen Wells der Platte nicht für die Exposition verwendet. Auf diese Weise konnten pro Platte 16 Vertiefungen für 2 Proben von unterschiedlichen Spendern genutzt werden (Abb. 2). Diese Wells wurden so belegt, dass immer eine innen- und eine außenliegende Vertiefung gleichbehandelt wurden und ihre Resultate jeweils als Mittelwert in die Analyse eingingen.

Am zweiten Tag nach der Aussaat wurden die Zellen erstmalig gezählt. Hierzu wurden die einzelnen Wells nacheinander trypsinisiert und ausgezählt.

Bei insgesamt 9 Zählungstagen pro Experiment über einen Zeitraum von 18-19 Tagen wurden 9 Platten angesät. Durch dieses Vorgehen wurde pro Zählungstag eine komplette Platte ausgezählt, wodurch die Gefahr einer Kontamination der restlichen/noch nicht ausgezählten Wells gesenkt wurde und die Vorbereitungen für die Zählungen nicht unter sterilen Bedingungen stattfinden mussten.

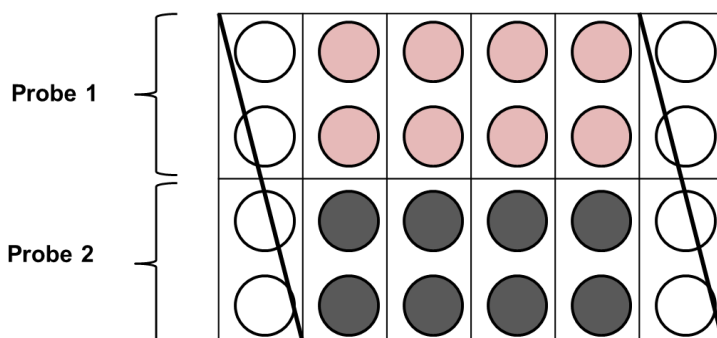


Abbildung 2: Aufteilung der Wells einer TC24-Well-Platte mit 2 Experimenten/Proben pro Platte. Für ein Experiment wurden 2 Wells pro Zählung für unbehandelte Zellen (Kontrollgruppe) und 6 Wells pro Zählung für Zellen mit Zigarettenrauchextrakt (CSE)-Exposition genutzt.

3.5.2 Trypsinisierung einer TC24-Well-Platte

Es wurde bei der Trypsinisierung darauf geachtet, dass der Deckel nur so weit geöffnet wurde, wie es für die Bearbeitung der Platte nötig war. Die restlichen Wells wurden mit dem Deckel bedeckt gehalten um sie vor Kontamination zu schützen.

Das Medium wurde mit einer Eppendorf-Pipette aus den Wells abgesaugt. Als Nächstes wurden die einzelnen Wells mit 500 µl HBSS gespült und unter leichten Schwenkbewegungen gewaschen. Im nächsten Schritt wurde HBSS mit derselben Pipette wieder abgesaugt. Damit es nicht zu einer Kontamination zwischen den verschiedenen Wells kommen konnte, wurde für jedes Well eine neue Pipettenspitze verwendet.

Anschließend wurde je 100 µl Trypsin in die zu zählenden Wells gegeben. Dann wurden die Wells abgedeckt und 7 Minuten lang inkubiert. Die Platten wurden dabei gelegentlich bewegt damit die Fibroblasten sich leichter vom Boden der Wells lösen konnten.

3.5.3 Zellzählung einer TC24-Well-Platte

Zur Erfassung der Zellintegrität wurden die trypsinisierten Wells mit jeweils 100 µl Trypanblau versehen. Dann wurden die Zellen aus dem Well abgesaugt, in eine Neubauer-Zählkammer (verbesserter Typ, Tiefe 0,100 mm/0,0025 mm²) gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Bei Zellen mit veränderter Membrandurchlässigkeit ermöglichte die Einlagerung von Trypanblau diese Zellen kenntlich zu machen. Die Zellzahl wurde durch dreifache Auszählung und Bildung des Mittelwerts bestimmt.

3.6 Zigarettenrauchextrakt-Exposition

3.6.1 Prozentuale Verdünnung des Zigarettenrauchextraktes

Der Zigarettenrauchextrakt, so wie er unter 3.4.1 erzeugt wurde, wurde als Ausgangslösung mit der Konzentration 100% definiert. Durch die Zugabe von reinem Kulturmedium wurde der Zigarettenrauchextrakt für die Belastung der Wells so verdünnt, dass die doppelte Konzentration (4%) als die für die Exposition festgelegte Endkonzentration (2%) vorlag. Diese verdünnte Lösung wurde anschließend zu den Fibroblasten in die Vertiefungen gegeben. Die Mischung mit dem in den Wells bereits vorhandenen reinen Medium ergab somit die angestrebte Endkonzentration (2%). Den unbehandelten Kontrollzellen wurde die gleiche Menge reines D-MEM hinzugefügt.

3.6.2 Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt

Pro TC24-Well-Platte wurden 2 Experimente parallel durchgeführt. Hier dienen die Wells Nummer 1 und 2 als Kontrolle. Die Wells 3 und 4 wurden zum frühen Zeitpunkt mit 2%igem CSE behandelt, die Wells 5 und 6 wurden zum späten Zeitpunkt mit 2%igem CSE behandelt und die Wells 7 und 8 wurden sowohl zum frühen als auch zum späten Zeitpunkt mit 2%igem CSE behandelt (Abb. 3). An beiden Expositionszeitpunkten wurden die Zellen über einen Zeitraum von 2 Tagen behandelt. Außerdem waren die Expositionen durch ein Intervall von 2 Tagen voneinander getrennt, in dieser Zeit befand sich Kulturmedium auf den Zellen (Abb. 4).

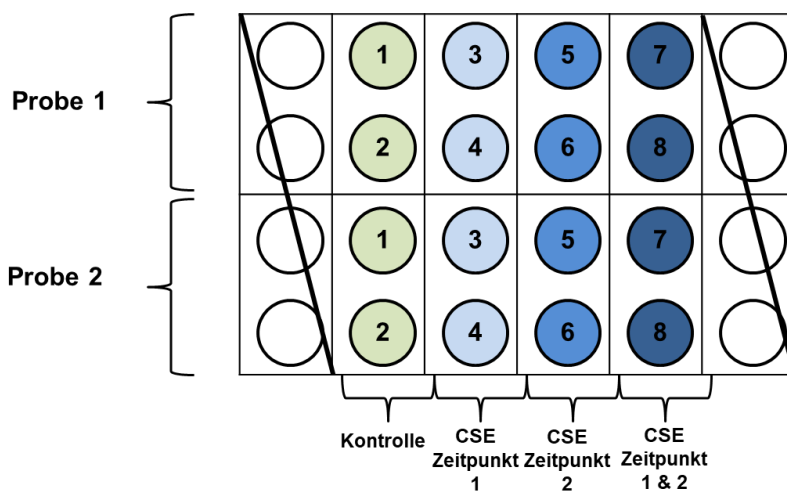


Abbildung 3: Aufteilung der Wells einer TC24-Well-Platte mit jeweils 2 Wells pro Zählung. Markiert sind die Wells mit einer frühen Zigarettenrauchextrakt (CSE)-Exposition, einer späten CSE-Exposition, zwei CSE-Expositionen und Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe.

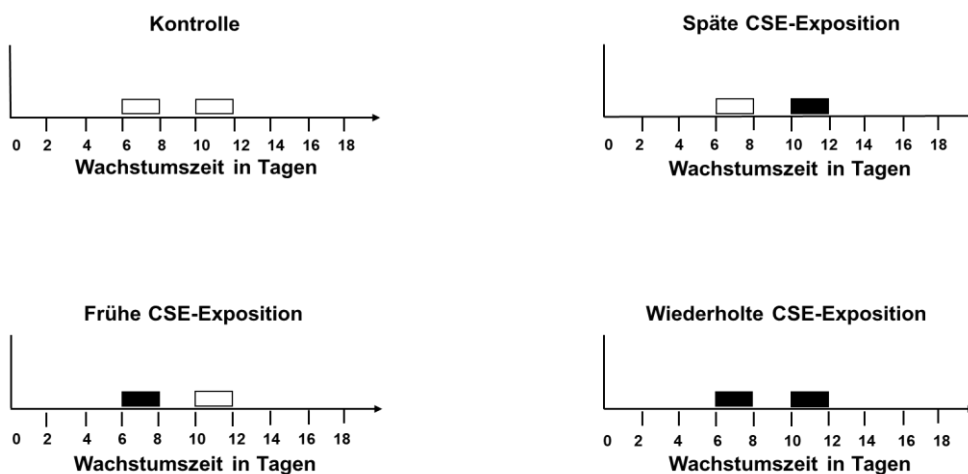


Abbildung 4: Expositionszeitpunkte bei Kontrolle, früher Exposition, später Exposition und wiederholter Exposition
 CSE-Exposition Medium-Gabe

3.6.3 Beendigung der Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt

Durch zwei- bis dreimaliges vorsichtiges Waschen der Wells mit auf 37°C temperiertem D-MEM wurde die Exposition beendet. Zum Schutz der Zellen wurde jeweils ein kleiner Rest von ca. 10% des Mediums in den Wells belassen. Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass nach dem mehrfachen Waschen, im auf den Zellen verbleibenden Kulturmedium, allenfalls noch 0,1% bis 1% des ursprünglich vorhandenen Zigarettenrauchextraktes vorhanden waren.

3.7 Gewebegewinnung aus Operationsresektaten

Die Gewebeproben stammten aus tumorfreien subpleuralen Gewebestücken von OP-Resektaten, die von der Forschungsabteilung des Krankenhauses Großhansdorf zur Verfügung gestellt wurden (Forschungslabor Dr. Olaf Holz), das über eine positive Stellungnahme der Ethikkommission zu Seneszenz-Versuchen mit diesen Fibroblasten sowie über entsprechende Einverständniserklärungen der Patienten verfügte. Alle Zellproben waren pseudonymisiert und konnten von Seiten unseres Labors keiner Person zugeordnet werden. Die Entnahme der Gewebeprobe erfolgte bei Patienten, bei denen auf Grund eines Bronchialkarzinoms ein thoraxchirurgischer Eingriff vorgenommen werden musste. Die meisten Patienten waren Raucher ohne klinisch signifikantes oder nur gering ausgeprägtes Lungenemphysem. Nach der Operation wurden die parenchymalen Proben durch einen erfahrenen Zytologen (Dr. Lutz Welker) aus den Operationsresektaten entnommen.

Das Material wurde nach der Entnahme für ca. 15-20 Stunden in D-MEM mit Antibiotikum gelagert und per Kurier verschickt. Bei Beobachtungen wurde festgestellt, dass die Zellen bei Raumtemperatur die höchste Vitalität aufwiesen. Aus diesem Grund wurden die Proben in einer Wärme-Isolierung versendet, um die Einwirkung von hohen und niedrigen Temperaturen während des Versands zu minimieren. Anschließend wurde wie in 3.2.1 beschrieben weiter verfahren.

3.8 Datenauswertung

Die Veränderung der Zellproliferationsraten wurde zwischen zwei definierten Zeitpunkten (z. B. unmittelbar vor und 2 Tage nach Expositionsende) berechnet und erstreckte sich über 4 Tage ab Expositionsbeginn (4-Tage-Zeitraum). Für die Analyse der doppelten CSE-Exposition wurde die frühe CSE-Exposition als Referenz gewählt. Die Gesamtänderung der Proliferationsraten wurde als Mittelwert \pm Standardfehler des

Mittelwerts (SEM) und die relative Änderung als geometrischer Mittelwert (\pm SEM) ausgedrückt. Verhältnisse der Proliferationsraten werden als Differenzen logarithmisch transformierter Werte angegeben. Vergleiche zwischen Gruppen wurden mithilfe der ANOVA-Methode mit Duncan-*post-hoc*-Korrekturen durchgeführt. Um die Reaktionen der einzelnen Zelllinien miteinander zu vergleichen und systematische Unterschiede in der Reaktion auf CSE-Exposition zu ermitteln, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Vergleiche beziehen sich auf relative Proliferationsraten, die während der 4- oder 2-Tage-Zeiträume quantifiziert wurden, und werden als log₁₀ des Nach-CSE/Vor-CSE-Verhältnisses ausgedrückt. Zum Zweck der Korrelationsanalysen wurden Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) berechnet. Paarige Vergleiche wurden mit dem Wilcoxon-Matched-Pairs-Signed-Ranks-Test durchgeführt. In allen Analysen wurden p -Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Die Auswertungen erfolgten mit dem Statistik-Paket SPSS (Version 26.0.0.1., IBM, Armonk, NY, USA).

4. ERGEBNISSE

15 Versuche konnten erfolgreich durchgeführt und vollständig ausgewertet werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden summarisch beschrieben und illustriert, während die Proliferationsverläufe aller einzelnen Versuche im Anhang zu finden sind.

4.1 Beschreibung der Zellproliferation über die Zeit

Für die Darstellung der Zellproliferation über die Zeit für die Kontrolle, die einzelne frühe CSE-Exposition, die einzelne späte CSE-Exposition und die doppelte CSE-Exposition, wurden jeweils die Mittelwerte der Gesamtzellzahlen für jeden der 9 Zählungstage errechnet und grafisch dargestellt (Abb. 5). Der zeitliche Verlauf der Gesamtzellzahl zeigte ein Abflachen der Proliferationskurve nach der frühen CSE-Exposition sowie nach der einzelnen späten CSE-Exposition. Sowohl die frühe als auch die späte und die zweimalige Exposition gegenüber CSE hatten einen statistisch signifikanten Einfluss auf den Verlauf der Gesamtzellzahl ($p < 0,05$, multiple Vergleiche nach Duncan). Der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts für jede Versuchsreihe und jeden Zählungstag sind in Tabelle 1 aufgeführt.

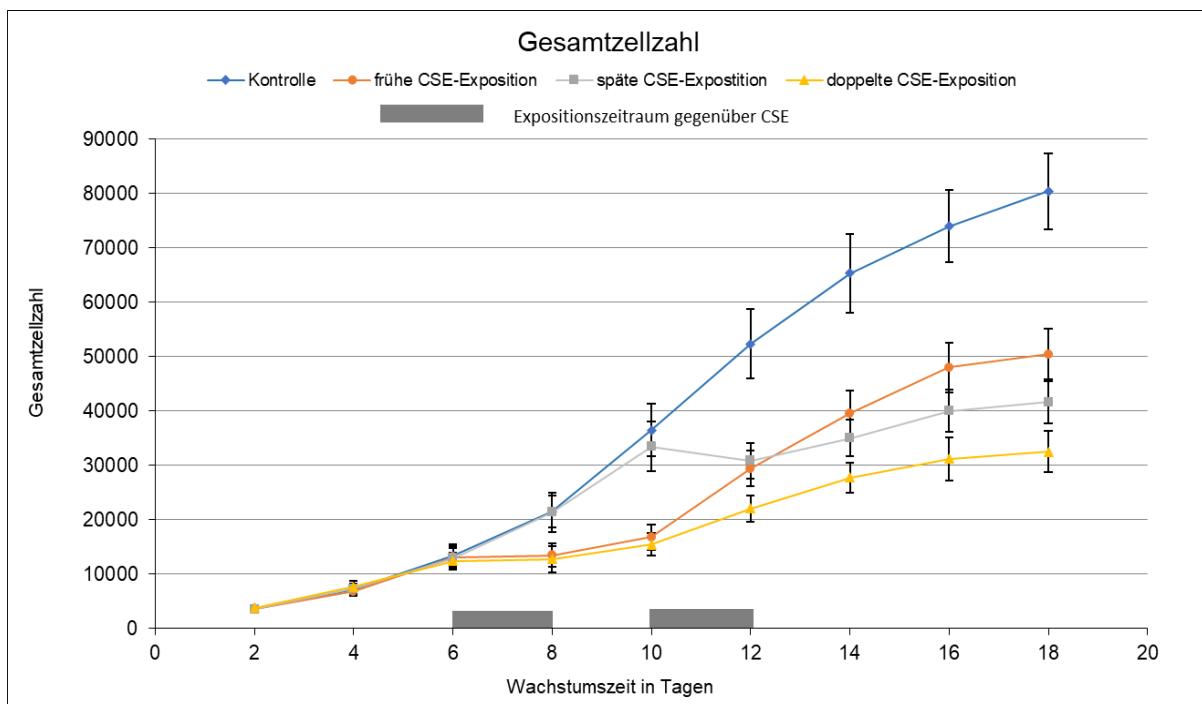


Abbildung 5: Proliferationskurven der Gesamtzellzahlen für die 4 Versuchsreihen

		Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14	Tag 16	Tag 18
Kontrolle	Mittelwert	3572	7228	13339	21461	36486	52339	65278	73928	80361
	Standardfehler	508	1066	2051	2901	4812	6408	7201	6610	6960
Frühe CSE-Exposition	Mittelwert	3622	6800	13100	13461	16789	29400	39561	47956	50400
	Standardfehler	548	866	2073	2207	2310	3278	4122	4516	4641
Späte CSE-Exposition	Mittelwert	3494	7333	12956	21322	33461	30828	34983	39978	41650
	Standardfehler	461	939	1894	3643	4534	3224	3377	3867	3878
Doppelte CSE-Exposition	Mittelwert	3789	7683	12389	12722	15427	22028	27722	31217	32494
	Standardfehler	479	1034	1514	2365	2039	2473	2789	3976	3754

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardfehler der Gesamtzellzahlen für jeden Zählungstag und den 4 Versuchsreihen

Der zeitliche Verlauf der Zahl Trypanblau-negativer Zellen war parallel zum Verlauf der Gesamtzellzahl (Abb. 6), mit den gleichen Ergebnissen bezüglich statistischer Unterschiede (Tab. 2). Die Zahl der Trypanblau-positiven Zellen war zu allen Zeitpunkten niedrig und zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 7 und Tab. 3).

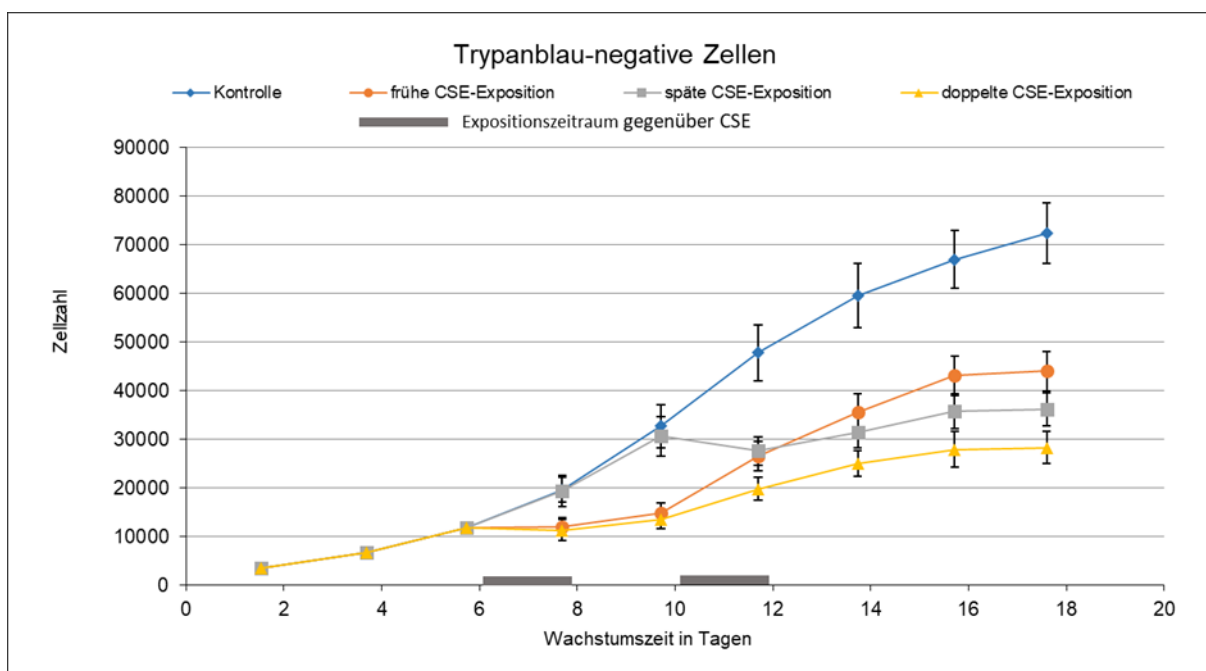


Abbildung 6: Proliferationskurven der Trypanblau-negativen Zellen für die 4 Versuchsreihen

		Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14	Tag 16	Tag 18
Kontrolle	Mittelwert	3311	6667	12144	19589	33108	47783	59639	66978	72406
	Standardfehler	465	957	1853	2541	4325	5825	6635	5931	6307
Frühe CSE-Exposition	Mittelwert	3394	6244	11833	11972	14839	26539	35611	43044	44000
	Standardfehler	501	763	1836	1945	2092	3081	3762	4066	4072
Späte CSE-Exposition	Mittelwert	3278	6656	11739	19317	30628	27567	31389	35800	36189
	Standardfehler	418	835	1642	3200	4089	2954	3156	3591	3434
Doppelte CSE-Exposition	Mittelwert	3578	7100	11211	11256	13637	19750	25028	27883	28272
	Standardfehler	452	932	1299	2160	1792	2366	2623	3661	3251

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardfehler der Trypanblau-negativen Zellen für jeden Zählungstag und den 4 Versuchsreihen

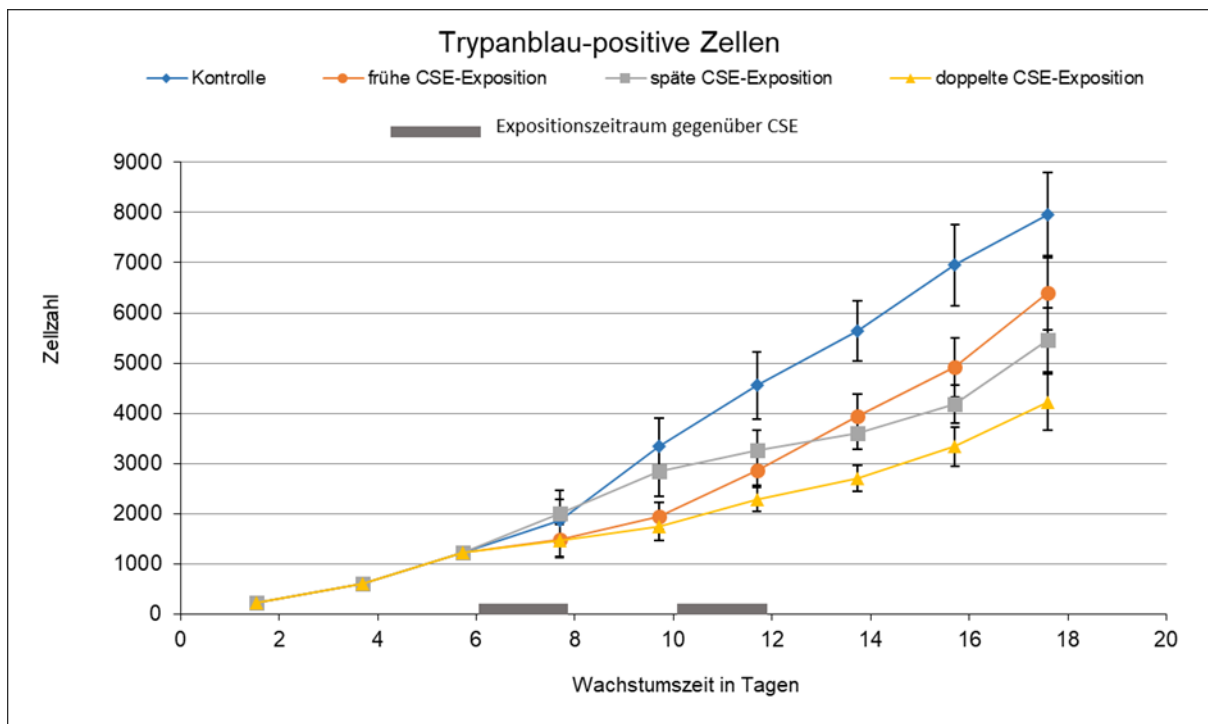


Abbildung 7: Proliferationskurven der Trypanblau-positiven Zellen für die 4 Versuchsreihen

		Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10	Tag 12	Tag 14	Tag 16	Tag 18
Kontrolle	Mittelwert	261	561	1194	1872	3378	4556	5639	6950	7956
	Standardfehler	58	136	262	401	533	672	602	819	846
Frühe CSE-Exposition	Mittelwert	228	556	1267	1489	1950	2861	3950	4911	6400
	Standardfehler	56	147	272	357	270	295	438	581	746
Späte CSE-Exposition	Mittelwert	217	678	1217	2006	2833	3261	3594	4178	5461
	Standardfehler	63	137	296	458	497	397	320	384	643
Doppelte CSE-Exposition	Mittelwert	211	583	1178	1467	1790	2278	2694	3333	4222
	Standardfehler	44	139	235	318	262	237	259	393	560

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardfehler der Trypanblau-positiven Zellen für jeden Zählungstag und den 4 Versuchsreihen

4.2 Relative Änderungen der Zellzahl über 4 Tage

Zur weiteren Analyse wurde die Proliferationsrate als Faktor der Zunahme der Gesamtzellzahl zwischen zwei definierten Zeitpunkten berechnet. Die totale Änderung wurde definiert als Änderung zwischen dem Zeitpunkt unmittelbar vor Exposition und dem Zeitpunkt 2 Tage nach Beendigung der Exposition, d.h. sie umfasste einen Zeitraum von insgesamt 4 Tagen von Beginn der Exposition.

4.2.1 Frühe Exposition

Für die erste CSE-Exposition wurden die Daten der einmaligen frühen und der ersten der doppelten CSE-Exposition zusammengefasst. Analog wurden für die erstmalige Kontroll-Exposition die Daten der Referenz (2x Kontroll-Exposition) und der einmaligen späten CSE-Exposition zusammengefasst.

Die relativen totalen Änderungen (geometrische Mittel und SEM) betragen für die Kontroll-Exposition 2,72 (1,08) und für CSE 1,25 (1,06) (frühe Exposition in Abb. 8). Die Unterschiede zwischen CSE-Exposition und Referenz waren im 4-tägigen Zeitraum ab dem Beginn der ersten Exposition signifikant ($p=0,001$). Relativ zur Kontrolle war mit CSE die Proliferationsrate im geometrischen Mittel (SEM) auf das 0,46-fache (1,06) reduziert, mit einem 95%-Konfidenzintervall von (0,40; 0,52).

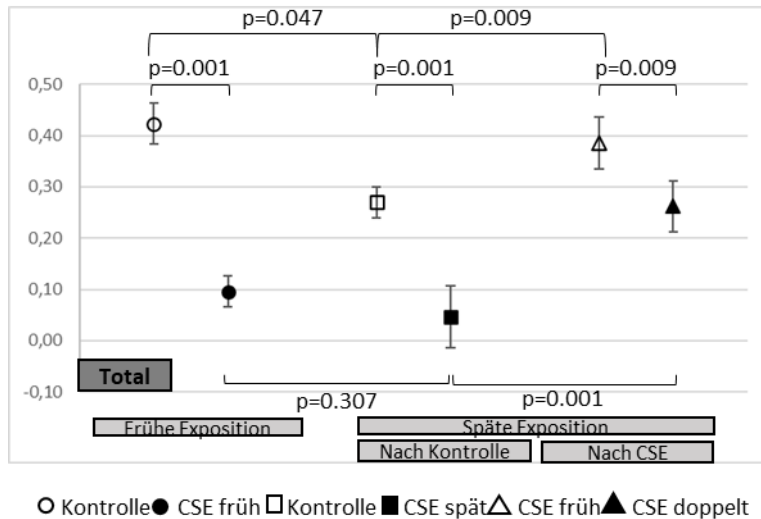


Abbildung 8: Totale relative Änderung der Proliferationsraten im 4-tägigen Intervall zwischen Beginn der Exposition und Ende der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen

4.2.2 Späte Exposition

In den anschließenden Analysen wurde die Auswirkung unterschiedlicher früher Expositionen auf die bei späten Expositionen beobachtete Reaktion ermittelt, um mögliche schützende oder verstärkende Wirkungen einer frühen CSE-Exposition aufzudecken.

4.2.2.1 Frühe Kontroll-Exposition als Vorgeschichte

Die Analyse der späten Exposition zeigte im 4-tägigen Intervall relative Proliferationsraten von 1,86 (1,08) für die zweimalige Kontroll-Exposition (Referenz) sowie von 1,11 (1,14) bei CSE-Gabe (späte Exposition nach Kontrolle in Abb. 8). Die Ergebnisse der einmaligen späten Exposition waren im Vergleich zur Referenz im totalen Intervall signifikant verschieden ($p=0,001$). Entsprechend war mit CSE, relativ zur Referenz, bei solitärer später Exposition die Proliferationsrate auf das 0,60-fache (1,10) erniedrigt, mit einem 95%-Konfidenzintervall (0,49; 0,73).

4.2.2.2 Frühe CSE-Exposition als Vorgeschichte

Für die Analyse der zweiten Exposition der doppelten CSE-Exposition wurde die zweite Exposition (Kontrolle) der einmaligen frühen CSE-Exposition als Bezugsgröße gewählt, da beide Versuche bis zur zweiten Exposition die gleiche Vorgeschichte aufwiesen.

Basierend darauf ergaben sich über 4 Tage relative Proliferationsraten von 2,43 (1,12)

bei Kontroll-Exposition und von 1,83 (1,13) bei CSE-Exposition (späte Exposition nach CSE in Abb. 8). Diese Quotienten waren signifikant verschieden ($p=0,009$), und relativ zur Kontrolle ergab sich mit CSE eine Proliferationsrate von 0,75 (1,08) mit einem 95%-Konfidenzintervall von (0,63; 0,89).

4.2.2.3 Vergleiche bei verschiedener Vorgeschichte

Um den Effekt einer frühen CSE-Exposition zu erfassen, wurde die späte der doppelten CSE-Expositionen mit der späten CSE-Exposition bei vorangegangener Kontrollexposition verglichen. Die Proliferations-Werte waren für den 4-tägigen Zeitraum während und nach Exposition signifikant verschieden ($p=0,001$). Analog fand sich ein Unterschied zwischen den späten Kontroll-Expositionen, wenn in der ersten Exposition entweder Kulturmedium oder CSE gegeben wurde ($p=0,009$) (Abb. 8).

Da sowohl für Kontrolle als auch für CSE die zweiten Expositionen einen Unterschied zeigten, wenn in der ersten Exposition gegenüber Kulturmedium oder CSE exponiert worden war, stellte sich die Frage, ob die Reaktion auf CSE relativ zur Kontrolle zwischen diesen beiden Vorbedingungen verschieden war. Zu diesem Zweck wurden die Quotienten der Proliferationsraten miteinander verglichen, entsprechend der Differenz der logarithmierten Proliferationsraten. Auch diese Quotienten unterschieden sich signifikant voneinander ($p=0,031$) als Indiz dafür, dass auch relativ zur jeweiligen Kontrollexposition die Antwort auf CSE in der zweiten Exposition geringer ausfiel, falls in der ersten Exposition bereits CSE gegeben worden war.

Verglich man die relative Proliferationsrate der zweiten der doppelten Kontroll-Expositionen mit der zweiten der doppelten CSE-Expositionen, so betrug der Quotient über 4 Tage 0,98 (1,10) und das 95%-Konfidenzintervall (0,81; 1,20). Entsprechend bestand zwischen beiden Proliferationsraten kein signifikanter Unterschied ($p=0,691$), wie durch die Tatsache bestätigt wird, dass der genannte Quotient nahe 1 lag. Diese Beobachtung legt nahe, dass sich die Zellen in ihrem relativen Wachstum ähnlich verhielten, wenngleich die absolute Zellzahl bei CSE-Exposition aufgrund des Effektes der ersten Exposition niedriger lag.

4.3 Aufschlüsselung in Effekte während und nach Exposition

Führte man analoge Analysen wie für das 4-tägige Beobachtungsintervall für die 2-tägige Periode der Exposition durch, um akute Reaktionen zu erfassen, so ergab sich ein sehr ähnliches Bild wie für die 4-tägige Periode, jedoch lagen naturgemäß die Proliferationsraten niedriger und waren teilweise nicht signifikant voneinander

verschieden (Abb. 9). Wählte man als Analyseperiode das 2-tägige Intervall nach Exposition, so ergab sich im Prinzip ein ähnliches Bild (Abb. 10), jedoch waren in diesem Intervall die Proliferationsraten sehr niedrig und kaum voneinander signifikant verschieden. Diese Beobachtungen zeigen, dass der dominierende Effekt auf die Reaktion innerhalb des 4-tägigen Intervalls auf die Akutreaktion während Exposition zurückzuführen war.

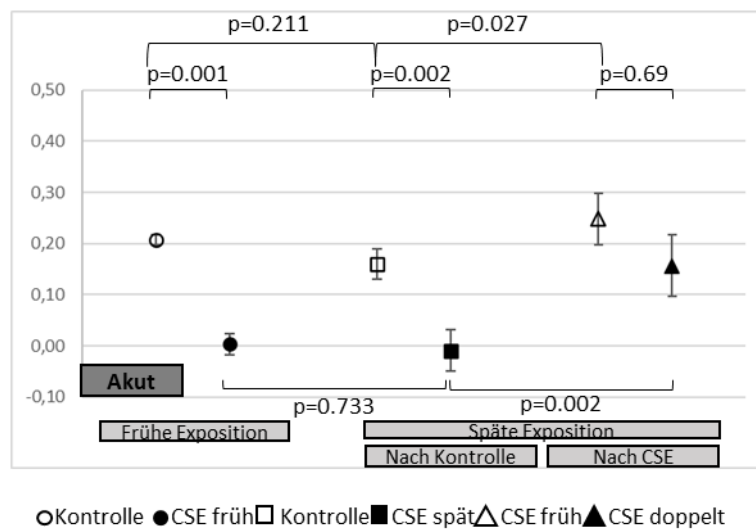


Abbildung 9: Akute relative Änderung der Proliferationsraten während der 2-tägigen Exposition unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen

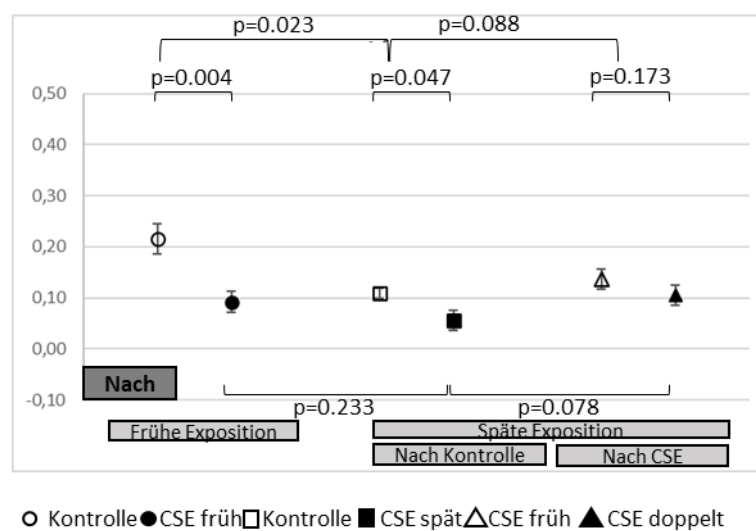


Abbildung 10: Relative Änderung der Proliferationsraten während der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen

4.4 Unterschiede der absoluten Zellzahlen

Um zu prüfen, ob die voranstehenden Ergebnisse, die als relative Proliferationsraten ausgewertet wurden, möglicherweise ein irreführendes Bild lieferten, wurden auch die Differenzen (statt Quotienten) der absoluten Zellzahlen ausgewertet. Für das 4-tägige Intervall (Abb. 11) ergab sich ein ähnliches Bild wie für die Quotienten (Abb. 8), wengleich sich bemerkbar machte, dass bei doppelter Kontroll-Exposition, d.h. ohne Intervention im Sinne der CSE-Gabe, naturgemäß die Zellzahl und ihre Änderung groß waren. Wichtig ist, dass sich auch in den absoluten Zellzahlen für eine späte CSE-Exposition der Unterschied zwischen Vorexposition mit Kulturmedium versus CSE klar zeigte. Die Analysen der 2-tägigen Expositionsperiode (Abb. 12) sowie des 2-tägigen Intervalls nach Exposition (Abb. 13) ergaben ebenfalls ein ähnliches Bild wie für die Quotienten (Abb. 9 und Abb. 10).

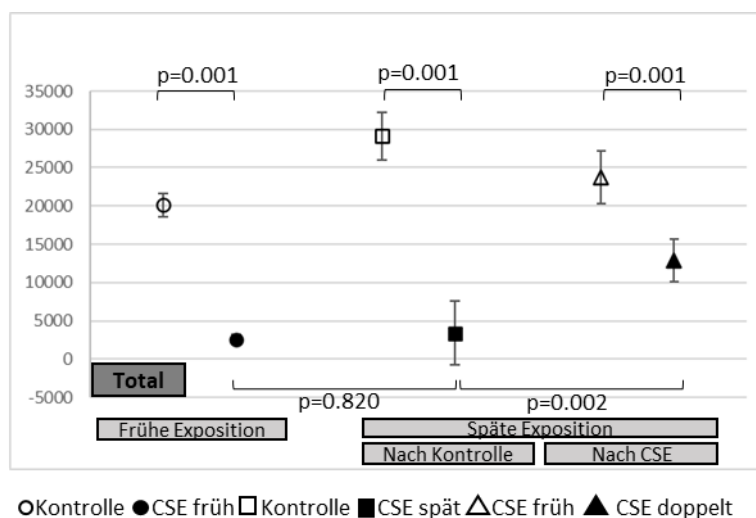


Abbildung 11: Veränderungen der absoluten Zellzahlen im 4-tägigen Intervall zwischen Beginn der Exposition und Ende der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Expositionsbedingungen

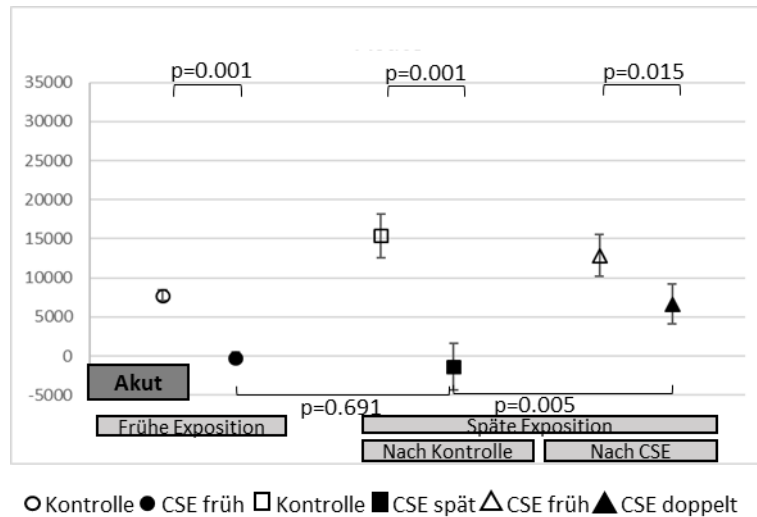


Abbildung 12: Veränderungen der absoluten Zellzahlen während der 2-tägigen Exposition unter unterschiedlichen Bedingungen

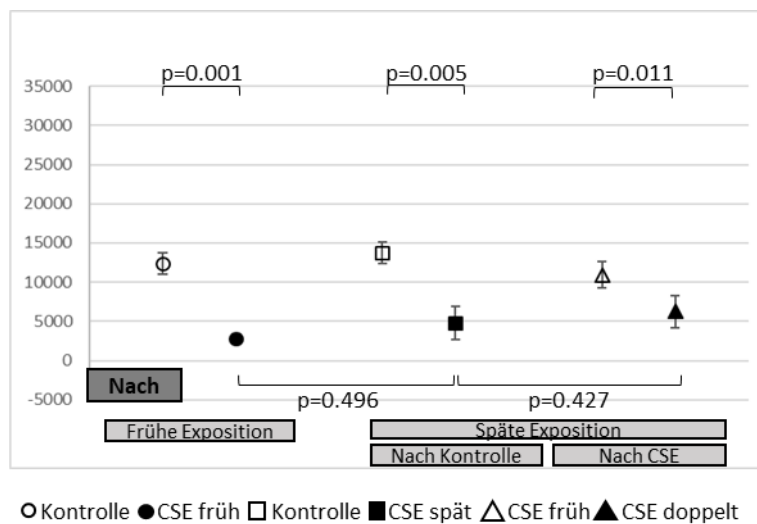


Abbildung 13: Veränderungen der absoluten Zellzahlen während der 2-tägigen Nachbeobachtung unter unterschiedlichen Bedingungen

4.5 Korrelationsanalysen

Um die Reaktionen auf der Ebene einzelner Zellkulturen zu analysieren, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Dies diente dazu, die Reaktionen der einzelnen Zelllinien miteinander zu vergleichen und eventuelle systematische Unterschiede in der Reaktion auf CSE-Exposition zu eruieren. Alle dargestellten Vergleiche beziehen sich auf den 4-tägigen Zeitraum zwischen dem Beginn der Exposition und dem Messzeitpunkt 2 Tage nach Beendigung der Exposition.

4.5.1 Früher Expositionszeitpunkt

Die erste Frage war, inwieweit sich die Reaktionen der unterschiedlichen Zelllinien unter Medium-Exposition voneinander unterschieden, ferner, ob die beiden Reaktionen miteinander korrelierten, d.h. ob die Versuche reproduzierbar waren. Hierfür wurden die Kontrollzellen sowie die Zellen der einzelnen späten CSE-Exposition zum frühen Zeitpunkt miteinander verglichen. Die Proliferationsraten unter Medium-Exposition zum frühen Zeitpunkt sind in Abbildung 14 illustriert und zeigen eine Korrelation der Wachstumsraten miteinander (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,724$, $p=0,002$), mit einer Streuung der Punkte um die Identitätsgrade. Entsprechend ergaben sich im Mittel keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Expositionen ($p=0,733$).

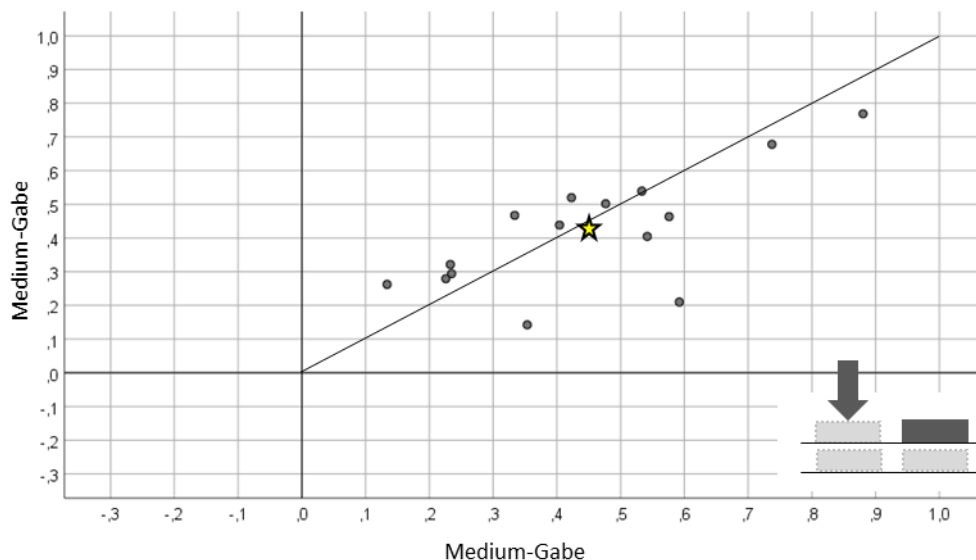


Abbildung 14: Korrelationsanalyse zwischen den Medium-Gaben zum frühen Expositionszeitpunkt

■ CSE-Exposition ▨ Medium-Gabe ↓ Zeitpunkt der Korrelationsanalyse

Analog wurden die Daten für die Proliferation der unterschiedlichen Zelllinien bei CSE-Exposition zum frühen Zeitpunkt miteinander verglichen und in Abbildung 15 dargestellt. Hier zeigte sich keine Korrelation zwischen den Versuchen (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,372$, $p=0,172$), und es ergaben sich im Mittel keine signifikanten Unterschiede ($p=0,307$).

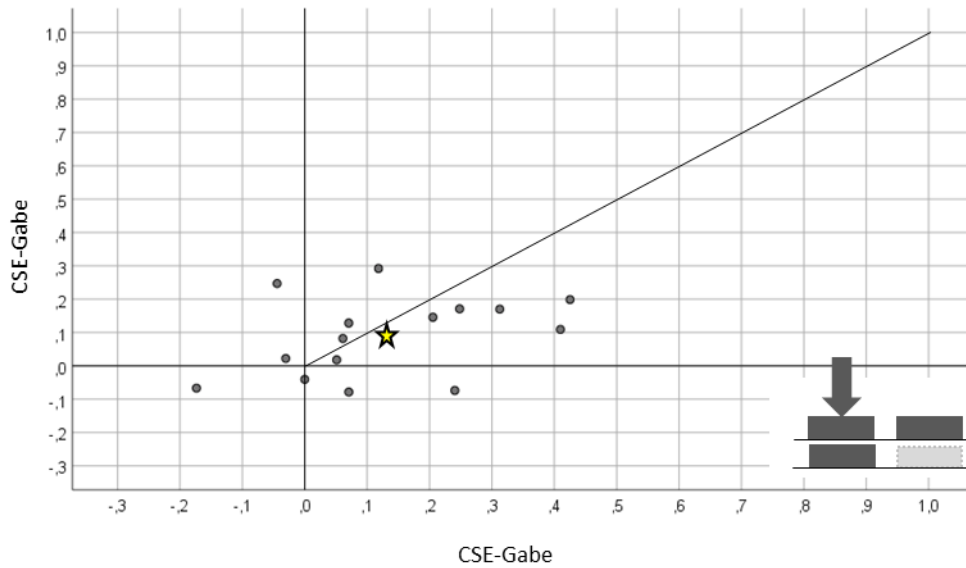


Abbildung 15: Korrelationsanalyse zwischen den CSE-Gaben zum frühen Expositionszeitpunkt

Des Weiteren wurden für den frühen Expositionszeitpunkt die Daten der CSE-Exposition mit denen der Medium-Exposition verglichen, um herauszufinden, ob Zellen mit starker Proliferation bei Medium-Gabe auch eine relativ starke Proliferation unter CSE-Gabe zeigten. Die Analyse ergab eine positive Korrelation zwischen den Änderungen der Wachstumsraten (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,684$, $p=0,005$) (Abb. 16). Zugleich bestanden im Mittel signifikante Unterschiede zwischen den Expositionen ($p=0,001$), entsprechend der Reaktion der Zellen auf CSE.

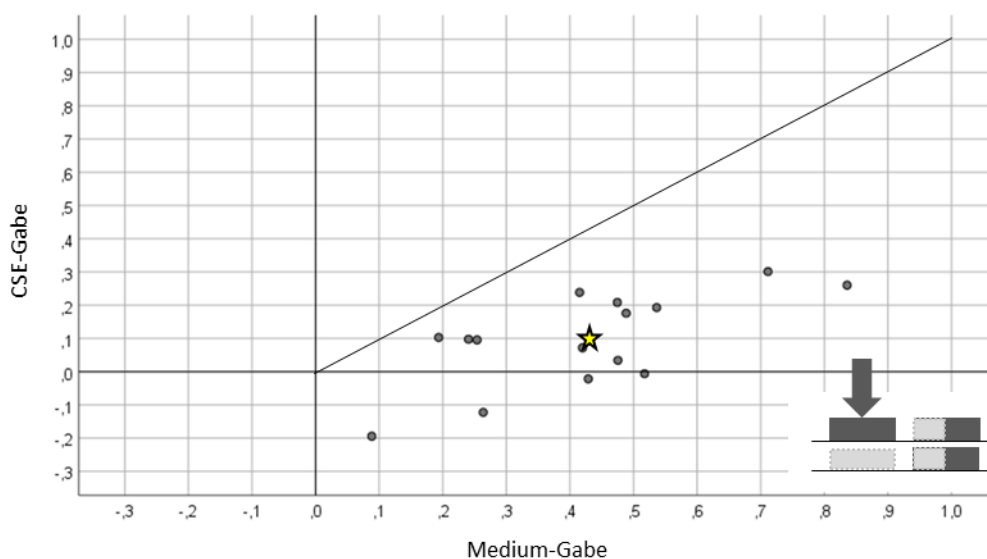


Abbildung 16: Korrelationsanalyse zwischen den CSE-Gaben und den Medium-Gaben zum frühen Expositionszeitpunkt. Die Mittelwerte der Antworten aus zwei Expositionen wurden ausgewertet

4.5.2 Später Expositionszeitpunkt

Im nächsten Schritt wurde in Abbildung 17 die einzelne späte CSE-Exposition mit der entsprechenden Exposition der doppelten Medium-Exposition verglichen, wobei beide die gleiche Vorgeschichte aufwiesen, nämlich Medium-Exposition zum ersten Zeitpunkt. Die Proliferationen korrelierten miteinander (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,725$, $p=0,002$), d.h. Zelllinien, die bei Medium-Gabe stark proliferierten, proliferierten auch bei CSE-Gabe überproportional. Im Mittel waren die Reaktionen signifikant unterschiedlich ($p=0,001$), entsprechend der Antwort der Zellen auf eine zweite, isolierte CSE-Exposition, wenn vorher keine andere CSE-Exposition erfolgt war.

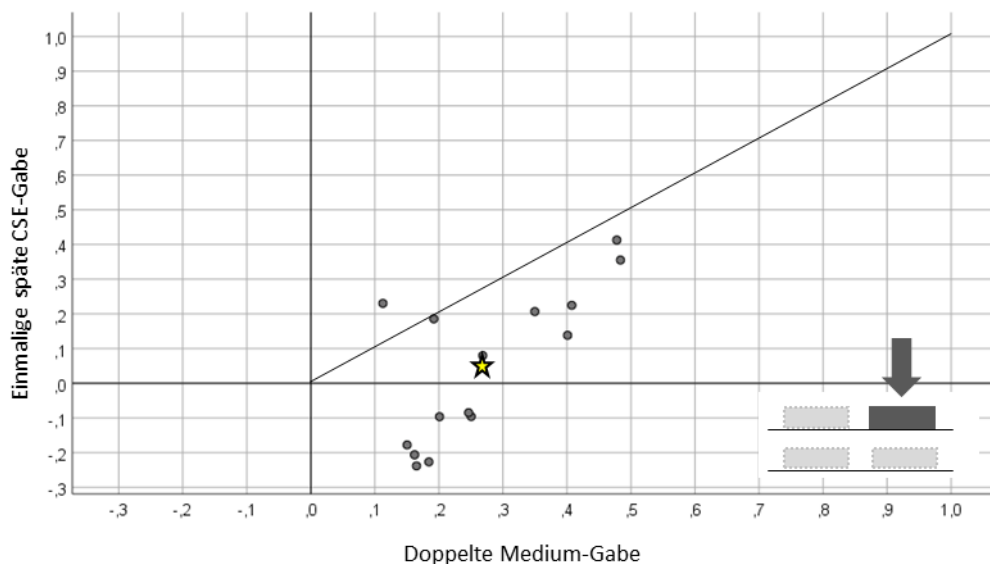


Abbildung 17: Korrelationsanalyse zwischen der einmaligen späten CSE-Gabe und der doppelten Medium-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt

Wenn die Vorgeschichte eine frühe CSE-Exposition umfasste, korrelierte die Reaktion auf CSE zum späten Zeitpunkt mit der Reaktion auf Medium-Gabe (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,773$, $p=0,001$; Abb. 18). Es gab einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Mittelwerte ($p=0,009$), was auf niedrigere Proliferationsraten für die CSE-Exposition zum späten Zeitpunkt hindeutet.

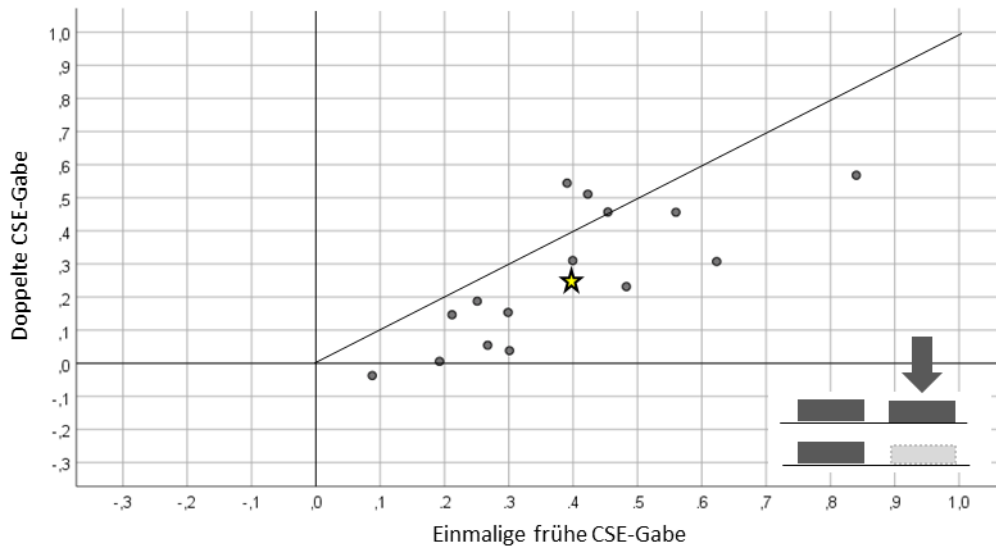


Abbildung 18: Korrelationsanalyse zwischen der einmaligen frühen CSE-Gabe und der doppelten CSE-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt

Um die Reaktionen auf CSE bei unterschiedlicher Vorgeschichte miteinander zu vergleichen, wurden ebenfalls zum Zeitpunkt der späten Exposition die einzelne späte und die doppelte CSE-Exposition miteinander verglichen (Abb. 19). Die Ergebnisse zeigten erneut eine positive Korrelation (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,882$, $p<0,001$), als Zeichen der Tatsache, dass die Zellen systematisch unterschiedlich reagierten. Die Proliferationsraten waren im Mittel signifikant verschieden ($p<0,001$); darin äußerte sich der protektive Effekt einer vorherigen CSE-Exposition, zumindest dann, wenn dieser in Form relativer Änderungen ausgewertet wurde.

Wenn beide späten Expositionen die Verabreichung von Medium beinhalteten, korrelierten die Reaktionen signifikant miteinander (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,686$, $p=0,005$; Abb. 20) und die Mittelwerte unterschieden sich signifikant ($p=0,009$).

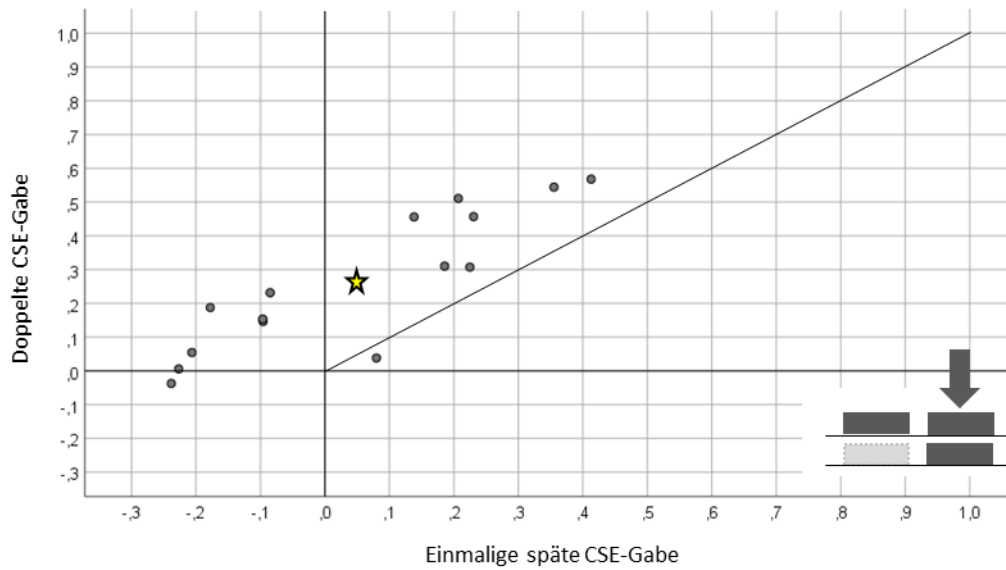


Abbildung 19: Korrelationsanalyse zwischen der doppelten und der einmaligen späten CSE-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt

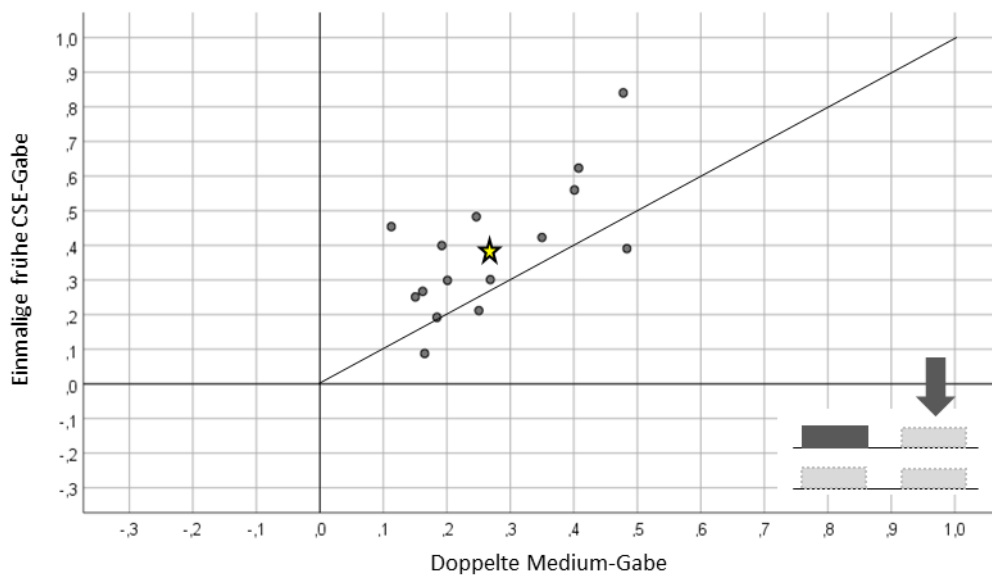


Abbildung 20: Korrelationsanalyse zwischen der doppelten Medium-Gabe und der einmaligen frühen CSE-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt

Darüber hinaus wurden für den zweiten Zeitpunkt die Referenz mit ausschließlicher Medium-Gabe und die zweifache CSE-Exposition einander gegenübergestellt (Abb. 21). Die Ergebnisse wiesen erneut eine positive Korrelation auf (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,665$, $p=0,007$) und bestätigten damit die systematischen Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die Proliferationsraten waren im Mittel nicht

signifikant voneinander verschieden ($p=0,691$); darin äußerte sich die Tatsache, dass bei einer zweiten CSE-Exposition die relative Antwort derjenigen gleich war, die sich zum zweiten Zeitpunkt unter Kontrollbedingungen einstellte. Bezüglich der relativen Antworten lässt sich somit feststellen, dass die zweite CSE-Exposition keinen signifikanten Effekt mehr ausübte, wenn vorher bereits eine CSE-Exposition stattgefunden hatte.

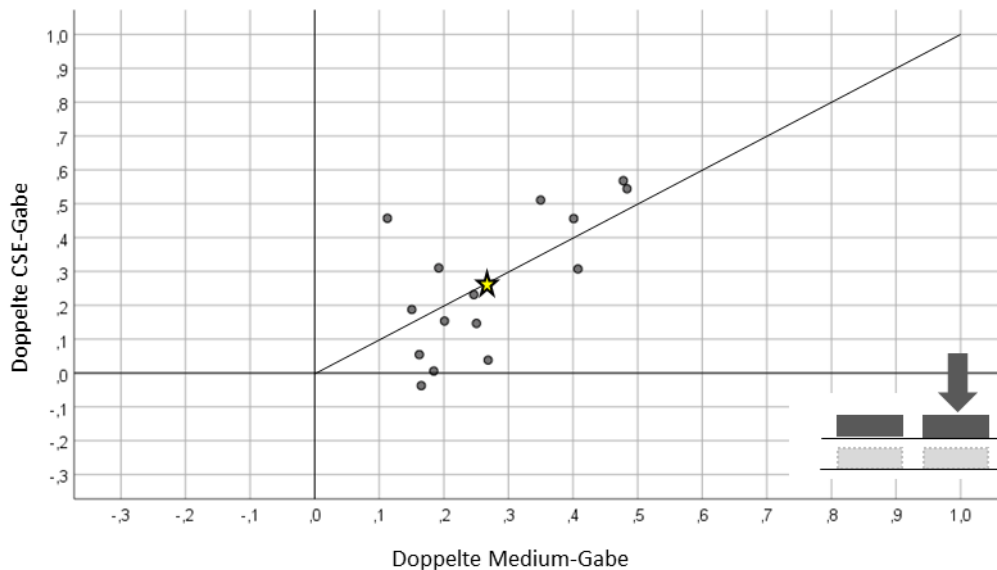


Abbildung 21: Korrelationsanalyse zwischen der doppelten CSE-Gabe und der doppelten Medium-Gabe zum späten Expositionszeitpunkt

4.5.3 Unterschiedliche Expositionszeitpunkte

Um die Unterschiede der Reaktion auf CSE-Gabe zwischen den beiden Zeitpunkten zu eruieren, wurden bei der doppelten CSE-Exposition die Reaktionen der Zellen zum frühen Zeitpunkt mit den Reaktionen zum späten Zeitpunkt verglichen. Bei diesem (in Abbildung 22 dargestellten) Vergleich fand sich keine Korrelation zwischen den Proliferationsraten (Pearson-Korrelationskoeffizient $r=0,089$, $p=0,753$), jedoch waren die Resultate im Mittel signifikant verschieden ($p=0,011$).

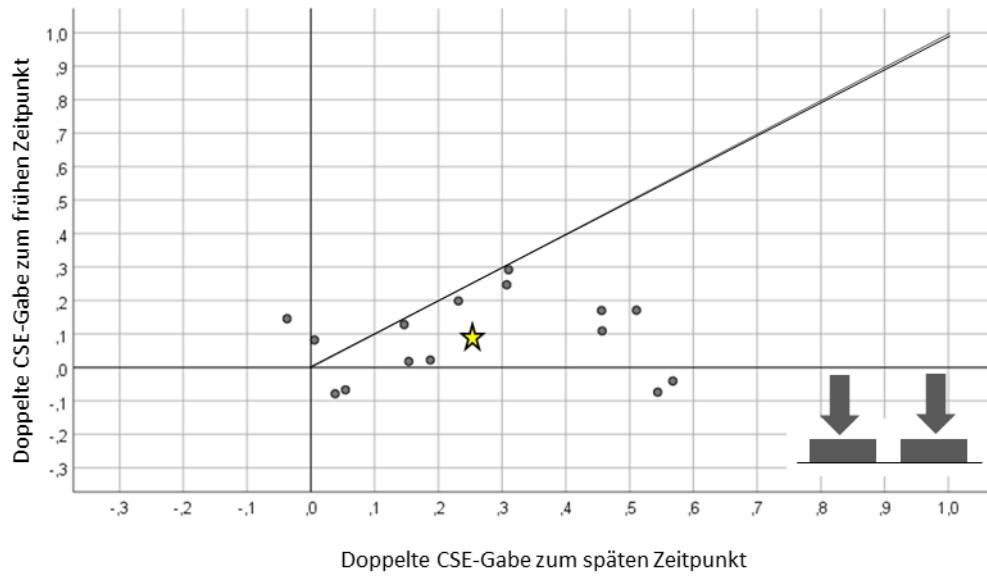


Abbildung 22: Korrelationsanalyse zwischen dem frühen und dem späten Expositionszeitpunkt der doppelten CSE-Gabe

5. DISKUSSION

5.1 Hauptergebnis

Die Versuche ergaben, dass eine Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt (CSE) zu einer Reduktion der Proliferationsrate primärer menschlicher Lungenfibroblasten führte, wenn diese Exposition entweder zu einem früheren oder einem späteren Zeitpunkt innerhalb des Zeitraums der natürlichen replikativen Seneszenz erfolgte. Ferner schwächte eine zweifache CSE-Exposition die Proliferation stärker ab als eine einzelne frühe oder späte Exposition. Gleichwohl zeigte sich, dass die frühe CSE-Exposition einen relativen, wenn auch keinen absoluten Schutz vor dem proliferationsmindernden Effekt einer zweiten CSE-Exposition bot. Dies deutet auf eine Aktivierung von Schutzmechanismen durch die erste Exposition hin. Diese Beobachtung ist von Interesse für die Anlage und Interpretation von Zellkulturexperimenten, die erfolgen, um die Mechanismen der Entstehung eines Lungenemphysems anhand des CSE-Modells zu verstehen. Im Folgenden wird versucht, die Ergebnisse im Detail zu interpretieren und zu den Daten der Literatur in Beziehung zu setzen.

5.2 Beziehung zwischen Zigarettenrauch und Seneszenz

Die Verbindung zwischen der Exposition von Patienten gegenüber Zigarettenrauch, dem Auftreten eines Lungenemphysems und der zellulären Seneszenz verschiedener Zelltypen wurde bereits vor geraumer Zeit nachgewiesen. So fanden sich Zeichen von zellulärer Seneszenz in Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem [Holz *et al.*, 2004], die sich eindringlich sowohl in einer verminderten Proliferationsrate als auch einer verminderten Proliferationskapazität der Zellen zeigten. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit anderen Daten, die bei Patienten mit COPD erhalten wurden [Müller *et al.*, 2006; Tsuji *et al.*, 2006]. Ähnliche Befunde fanden sich für Endothelzellen [Amsellem *et al.*, 2011]. Diese Beobachtungen stammten von Zellen, die aus Operationsresektaten angezogen worden waren und sozusagen *in vivo* im Rahmen der Rauchhistorie der Patienten mit Zigarettenrauch belastet worden waren.

Zu ungefähr der gleichen Zeit wurde versucht, Zellkulturmodelle einer derartigen Belastung zu etablieren. Zu diesem Zweck wurden durch Abrauchen von Zigaretten unter kontrollierten Bedingungen Extrakte gewonnen, die dann in unterschiedlichen Verdünnungen auf Zellkulturen verschiedener Art gegeben werden konnten, um mögliche Effekte zu studieren. Dies war auch in dem Labor der Fall, dem die

vorliegenden Daten entstammen, wobei die Daten entweder an primären menschlichen Lungenfibroblasten [de Ritis, 2009; Schindler, 2015] oder an Präadipozyten der Maus [Machata, 2010; Heyne, 2011] gewonnen wurden. Andere Autoren verwendeten Fibroblastenzelllinien [Nyunoya *et al.*, 2006]. Übereinstimmend fanden sich eine dosisabhängige Reduktion der Proliferationsrate der Zellen sowie eine verstärkte Expression des Stress- und Seneszenz-Markers β -Galaktosidase nach Exposition der Zellen gegenüber Zigarettenrauchextrakt, wie dies auch *in vivo* beobachtet worden war [Müller *et al.*, 2006]. Diese Ergebnisse legten nahe, das CSE-Modell als informativ für das Verständnis der Entwicklung einer COPD und speziell eines Lungenemphysems zu erachten. Gleichwohl waren sie durch die zumeist nur kurzzeitigen und einmaligen Expositionen eingeschränkt. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit, den Effekt einer wiederholten CSE-Belastung auf primäre menschliche Lungenfibroblasten zu untersuchen und dabei gleichzeitig zu eruieren, inwieweit der Effekt vom Zeitpunkt der CSE-Exposition innerhalb des natürlichen Proliferationsverlaufs abhängt.

5.3 Unterschiede in den Effekten der Einzelexpositionen

Bemerkenswerterweise trat beim Vergleich der Proliferationsraten der Lungenfibroblasten nach Einzelexposition eine stärkere Reduktion nach der späten verglichen mit der frühen CSE-Exposition auf, wenn keine vorherige CSE-Belastung erfolgt war. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die Kombination einer durch die applizierte Noxe induzierten Seneszenz mit der natürlichen replikativen Seneszenz der Zellen erklären. Die fast unmittelbare Stagnation der Zellzahlen nach der einzelnen späten CSE-Exposition, die bei der einzelnen frühen CSE-Exposition nicht eintrat, ist analog mit einer Verstärkung der Seneszenz in Einklang zu bringen. Bei der frühen Exposition hingegen stiegen die Proliferationsraten etwa 3-5 Tage nach der CSE-Exposition erneut leicht an, allerdings erreichten die Fibroblasten nicht mehr das Proliferationspotenzial der Kontrollzellen. Als mögliche Erklärung für ein derartiges Verhalten postulierten Kanaji *et al.* die Koexistenz einer Fibroblasten-Subpopulation, die gegenüber CSE-induzierter Seneszenz resistent geworden sei und somit die gesamte Zellproliferation fördere [Kanaji *et al.*, 2014].

5.4 Vergleich mit den Effekten der wiederholten CSE-Exposition

Beim Vergleich der Expositionen gegenüber CSE zeigte sich die stärkste Verringerung der Proliferationsrate bei der doppelten CSE-Exposition. Diese Ergebnisse stimmen

mit früheren Ergebnissen an einer immortalisierten Fibroblastenzelllinie [Nyunoya *et al.*, 2006] überein und deuten darauf hin, dass wiederholte CSE-Expositionen die Zellproliferationsraten dauerhaft beeinträchtigen können und die zelluläre Seneszenz im Sinne irreversibler Veränderungen des Zellverhaltens mit Zellstillstand verstärken, wohingegen eine einmalige CSE-Exposition die Proliferation teils nur vorübergehend hemmte. Frühere Experimente konnten anhaltende Wirkungen von CSE auf Lungenfibroblasten nach kurzzeitiger Exposition nachweisen; hierbei wurde die Seneszenz durch die Verwendung von β -Galaktosidase als Marker bestätigt [Dimri *et al.*, 1995; Schindler, 2015]. Kanaji *et al.* führten wiederholte CSE-Expositionen an einer Zelllinie von Lungenfibroblasten sowie an primären menschlichen Lungenfibroblasten durch und zeigten, dass die mehrfachen Expositionen gegenüber CSE zwei Fibroblasten-Phänotypen induzierten konnten, einmal im Sinne seneszenten Fibroblasten, welche die Proliferation nach den CSE-Expositionen einstellten, zum anderen im Sinne profibrotischer Fibroblasten, die eine verstärkte Proliferation aufwiesen.

Beide Fibroblasten-Phänotypen tragen möglicherweise zu den morphopathologischen Veränderungen der Lunge beim Emphysem bzw. der COPD bei [Kanaji *et al.*, 2014]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit diesen Ergebnissen überein, indem sie nahezu konstant niedrige Zellproliferationsraten während der gesamten Zeit der Zellkultur zeigten, was darauf hindeutet, dass die durch CSE induzierte Zellschädigung irreversibel war. Die Tatsache, dass bereits eine singuläre CSE-Exposition ausreichte, um eine signifikante Absenkung der Proliferationsraten bei primären menschlichen Lungenfibroblasten zu induzieren, und eine, wenn auch unterschiedliche, Hemmung der Zellproliferation zu jedem Expositionszeitpunkt auftrat, steht im Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien an Zelllinien [Nyunoya *et al.*, 2006].

5.5 Dynamik des zeitlichen Verlaufs

Die Proliferationsraten wurden über jeweils 4-tägige Zeitspannen ausgewertet. Diese bestanden aus einer 2-tägigen „akuten“ Phase während der CSE-Exposition, sowie einer direkt anschließenden, ebenfalls 2-tägigen Nachbeobachtungsphase. Beim Vergleich der Ergebnisse der 4-Tage-Zeiträume während und nach CSE-Exposition mit denen der 2-Tage-Zeiträume während Exposition wurden die niedrigsten Proliferationsraten unmittelbar nach der 2-tägigen CSE-Exposition verzeichnet. Somit ist

anzunehmen, dass innerhalb des 4-Tage Zeitraums der dominierende Effekt auf die akute Reaktion während Exposition zurückzuführen war.

Wurden die Proliferationsraten nach der zweiten der doppelten CSE-Exposition mit denen der einzelnen späten CSE-Exposition verglichen, ergab sich, dass die relative Hemmung der Zellproliferation nach einer vorangegangenen CSE-Exposition niedriger ausfiel. Diese Beobachtung weist möglicherweise auf eine „Schutzfunktion“ der ersten gegenüber der nachfolgenden CSE-Exposition hin und könnte das Auftreten des von Kanaji *et al.* vermuteten profibrotischen Phänotypus widerspiegeln. Die Mechanismen, die diesem Schutz zugrunde liegen, wurden in dieser Arbeit nicht analysiert, könnten aber mit einer hochregulierten oxidativen Abwehr zusammenhängen, da ein Zusammenhang zwischen Oxidantien-Antioxidantien-Status und COPD nachgewiesen werden konnte [Rahman *et al.*, 2000]. Die Beziehung zwischen Oxidantien und der Reaktion von Zellen auf CSE wurde in einer früheren Arbeit mit menschlichen Lungenfibroblasten gezeigt [de Ritis, 2009]. Diese Beobachtungen könnten von klinischem Interesse sein. So schlugen Kanaji *et al.* vor, dass die widerstandsfähige Fibroblasten-Subpopulation, die nach der CSE-Exposition eine verstärkte Proliferation aufwies und einem profibrotischen Phänotyp entsprach, diejenige sein könnte, welche die Entstehung einer peribronchialen Fibrose bei der COPD fördert [Kanaji *et al.*, 2014].

5.6 Heterogenität primärer Zellen

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, wie stark unterschiedlich und zugleich konsistent die primären Lungenfibroblasten verschiedener Spender reagierten. Diese Variabilität ist u.a. wichtig, um die Übertragbarkeit von Daten zu prüfen, die in der Literatur an den vergleichsweise homogenen Zelllinien gewonnen wurden und werden. Die Heterogenität primärer Lungenfibroblasten [Kotaru *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012; Valenzi *et al.*, 2019] selbst innerhalb eines Spenders lässt sich unter anderem durch regional unterschiedliche Fibroblasten-Populationen [Kotaru *et al.*, 2006] sowie durch die individuelle Patientengeschichte erklären, die zu Selektionsprozessen führen könnte. Diese Heterogenität könnte die in der vorliegenden Arbeit deutlich zu erkennenden Unterschiede der Proliferationsraten hinsichtlich der Reaktion gegenüber CSE zwischen Zellkulturen verschiedener Spender erklären.

Zudem können die Umstände, unter denen primäre Zellen gewonnen und kultiviert werden, die anschließenden Experimente beeinflussen. So zeigte sich in dieser Arbeit

wie bereits bei früheren Versuchen, dass auswärtig angezüchtete und anschließend auf dem Postweg versandte Zelllinien im Vergleich zu Zellen, die in Form von Gewebestücken versandt und anschließend vor Ort herangezüchtet worden waren, oft nicht so gut wuchsen. Außerdem wurde beobachtet, dass Zellen niedriger Passagen im Vergleich zu denen höherer Passagen bessere Proliferationsraten aufwiesen [siehe auch Schindler, 2015].

Zu Beginn der Versuche gab es ferner Hinweise darauf, dass sehr häufige Wechsel zwischen Inkubator und Arbeitsbank, vermutlich aufgrund der Veränderungen von Temperatur und CO₂-Konzentration, den Zellen Schaden zufügen konnten. Aus diesem Grund wurden die 24-Well-Platten so bestückt, dass pro Zählung eine ganze Platte verwendet wurde. Damit konnten die Zellen unter vergleichbaren Bedingungen mit minimalen Störeffekten gezüchtet werden. Überdies wurden mehrere Versuche der gleichen Zelllinie und Passage parallel verarbeitet. Auf diese Weise konnte die mit verschiedenen Kulturbedingungen einhergehende Streubreite ermittelt werden.

Auch wenn kommerziell erhältliche, immortalisierte Zelllinien Vorteile wie homogene Zellpopulationen, Kosteneffizienz und einfache Handhabung aufweisen, so sind im Vergleich zu den arbeits- und zeitaufwendigeren Primärkulturen auch Nachteile bekannt. Zum Beispiel zeigten immortalisierte Linien von konjunktivalen Epithelzellen deutlichere genetische Unterschiede gegenüber konjunktivalem Gewebe aus Biopsien als kultivierte, primäre, humane konjunktivale Epithelzellen mit niedriger Passagezahl [Tong *et al.*, 2009]. Beim Vergleich zwischen primären und immortalisierten menschlichen Pterygium-Fibroblasten waren ebenfalls genetische Unterschiede nachweisbar, und diese betrafen ausschließlich Gene zur Regulierung des Zellzyklus [Hou *et al.*, 2013], also Gene, die gerade für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Antwort relevant waren.

Vor allem scheinen die Unterschiede vom Zelltyp abzuhängen. Während primäre humane Fibroblasten der Haut im Vergleich zu einer Zelllinie mit ähnlicher Sensitivität auf Natriumlaurylsulfat reagierten, bestand bei primären Keratinozyten eine dreifach höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Tensid als bei einer immortalisierten Zelllinie [Olschläger *et al.*, 2009]. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass Primärzellen die *in vivo*-Verhältnisse im Vergleich zu Zelllinien offenbar besser nachstellen. Gleichwohl können unter Berücksichtigung der Fragestellung Zelllinien, trotz der bestehenden Unterschiede, für Versuche genutzt werden, da sie die Verhältnisse im Gewebe

zumindest im Prinzip reproduzieren können.

5.7 Konsistenz der Ergebnisse

Auf die Feststellung der Heterogenität primärer Zellen folgt unweigerlich die Frage nach der Konsistenz und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beim Vergleich der Antwort in verschiedenen Versuchen. Dies galt vor allem in der vorliegenden, mit primären menschlichen Lungenfibroblasten durchgeführten Arbeit. Zu diesem Zweck wurden Korrelationsanalysen durchgeführt und entsprechende Diagramme erstellt. Diese zeigten zum Zeitpunkt der frühen Exposition eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Proliferation nach CSE-Gabe und dem Ausmaß der Proliferation von Kontrollen des gleichen Spenders ohne CSE-Exposition.

Zum späten Expositionszeitpunkt wiesen die während dieser Phase unterschiedlich behandelten Zellen ebenfalls eine Korrelation der Proliferationsraten auf; hierbei bestand die Korrelation sowohl dann, wenn in der ersten Exposition Medium gegeben worden war, als auch dann, wenn CSE gegeben worden war. Sogar dann, wenn unterschiedliche Vorgeschichten im Sinne der Gabe von Medium oder CSE vorlagen, korrelierten die Antworten auf die späte CSE-Exposition oder auf die Applikation von Medium und wiesen damit auf eine systematisch unterschiedliche Reaktionsbereitschaft der Zellen hin. Ebenfalls zum späten Expositionszeitpunkt erwiesen sich die Ergebnisse als konsistent beim Vergleich der Kontrolle ohne jede CSE-Gabe mit der doppelten CSE-Gabe.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Korrelationsanalysen sowohl zum frühen als auch zum späten Expositionszeitpunkt eine Konsistenz der Reaktion der Zellen verschiedener Spender zeigten. Somit ist von einer intrinsisch unterschiedlichen Antwortbereitschaft der Zellen verschiedener Spender auszugehen und nicht von einer rein zufällig von Versuch zu Versuch auftretenden Variation. Diese Beobachtung unterstreicht, dass selbst dann, wenn im Mittel die Antworten einer Zelllinie denen von Primärzellen gleich sein sollten, die Streubreite der biologischen Antwort vermutlich nur über Primärzellen adäquat abgeschätzt werden kann. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten einer Publikation zu den Effekten von IFN- α auf primäre humane Fibroblasten und Endothelzellen, bei denen ebenfalls eine zellspezifische Konsistenz der Reaktionen nachgewiesen wurde [Moll *et al.*, 2011]. Ebenfalls fand sich sogar ohne Exposition bei der Analyse des Proteoms primärer humaner Keratinozyten eine erstaunliche Konsistenz der Befunde [Sprenger *et al.*, 2013].

5.8 Zellproliferation als Marker der Seneszenz

Die Fähigkeit zur Zellteilung spiegelt das Wachstumspotential der Zellen und vermutlich das Regenerationspotential des Gewebes direkt wider. Hierfür ist - neben einer ausreichend geringen Zelldichte, um eine Kontaktinhibition zu vermeiden - auch ein suffizientes Angebot an Wachstumsfaktoren notwendig, zum Beispiel durch das zugegebene fötale Kälberserum. Werden die Ressourcen der Zellen beispielsweise durch zellulären Stress vermehrt in Anspruch genommen, reduzieren sie normalerweise ihre Proliferation oder stellen diese völlig ein. Falls die Veränderungen auch nach Beendigung der Stress-Situation persistieren, lässt dies erkennen, dass ein signifikanter Anteil der Ressourcen in Anspruch genommen wurde; alternativ kommt als Ursache die Induktion einer permanenten Veränderung im Sinne einer zellulären Seneszenz in Frage, die auch durch Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht umkehrbar ist.

Die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase ist ein geläufiger Marker der Seneszenz [Dimri *et al.*, 1995] und charakterisiert einen Aspekt der damit einhergehenden biochemischen Veränderungen. Allerdings ist umstritten, ob es sich um einen spezifischen Marker der zellulären Seneszenz handelt oder ob dieses Enzym nicht ganz allgemein zellulären Stress nachweist [Severino *et al.*, 2000]. Die Situation wird dadurch komplex und unübersichtlich, dass es zahlreiche Mechanismen und Aspekte der zellulären Seneszenz bei der COPD gibt, wie bereits seit geraumer Zeit bekannt ist [Karrasch *et al.*, 2008] und in neueren Arbeiten, welche auch mögliche therapeutische Ansätze adressieren, noch deutlicher wird [De Luca & Vlahos, 2024].

Gut belegt ist die Rolle der für die Steuerung des Zellzyklus zuständigen Proteine p16^{INK4a} oder p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} [MacNee, 2009]. Diese Proteine werden durch senescente Fibroblasten der Haut und der Lunge vermehrt produziert und sind vermutlich an dem irreversiblen Wachstumsstopp der Zellen beteiligt [Stein *et al.*, 1999; Collins & Sedyv, 2003; Brookes *et al.*, 2004]. Entsprechend führte in einer Arbeit mit einer menschlichen Fibroblasten-Linie CSE zu einer vermehrten Expression dieser Proteine [Nyunoya *et al.*, 2006]. Jedoch werden noch eine Vielzahl weiterer Proteine mit der zellulären Seneszenz in Verbindung gebracht, und auch epigenetische Mechanismen scheinen von Bedeutung zu sein [z.B. Karrasch *et al.*, 2008; Hernandez-Segura *et al.*, 2018; Crouch *et al.*, 2022]. Hieraus ergeben sich vielfältige Signalwege für die Induktion und Aufrechterhaltung einer zellulären Seneszenz. Dies verdeutlicht, dass

es sich bei der Seneszenz um ein komplexes, über viele Wege vermitteltes Phänomen handelt, das gerade deshalb gut durch summarische Marker wie die Proliferationsbereitschaft charakterisiert werden kann.

Entsprechend war die vorliegende Arbeit auf Erfassung der Proliferation als phänomenologischen Marker der zellulären Seneszenz fokussiert. Die Fähigkeit zur Proliferation – und damit vermutlich auch Regeneration – stellt nämlich nicht alleine einen wichtigen und in seiner Erfassung etablierten zellulären Endpunkt dar, sondern beschreibt das Ergebnis multipler Prozesse. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen schien dieser kumulative Charakter zur Erhebung persistierender Veränderungen geeigneter als spezielle molekularbiologische oder immunologische Marker, unter denen keiner so sicher mit zellulärer Seneszenz assoziiert werden kann wie der Verlust an Proliferationsfähigkeit.

Überdies erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit die im Vorfeld zu lösenden experimentellen Probleme, die bei der Identifikation des optimalen Versuchsablaufs innerhalb des begrenzten Zeitfensters des natürlichen Proliferationsverlaufs auftraten, als so umfangreich, dass eine zusätzliche Analyse avancierter biochemischer Marker, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht bzw. nur ansatzweise zur Verfügung stand, den zeitlichen Rahmen der Arbeit gesprengt hätte. Folglich erlaubt diese Arbeit keine Aussagen über Veränderungen auf molekularer Ebene. Gleichwohl sei noch einmal betont, dass, auch basierend auf früheren Ergebnissen [Holz *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006], eine Verringerung der Proliferationsrate und des Proliferationspotentials als essentieller, empfindlicher und aussagekräftiger Marker für die Seneszenz von Zellen betrachtet werden kann.

5.9 Mögliche Limitationen der Versuche

Die vorliegende Arbeit weist eine Reihe von Einschränkungen auf, die unter anderem darauf basieren, dass es sich bei Zellkulturen grundsätzlich um eine Vereinfachung der *in vivo*-Verhältnisse handelt, in der die komplexen Interaktionen innerhalb der Zellverbände und zwischen verschiedenen Zelltypen sowie die räumlichen Strukturen fehlen. Im Folgenden werden die prinzipiell möglichen Limitationen der Versuche aufgezählt.

Da es sich bei den für diese Arbeit verwendeten Zellen um primäre menschliche Lungenfibroblasten handelte, ist eine im Rahmen der Anzucht und der anschließenden Kultivierung entstandene, nicht detailliert erfassbare und kontrollierbare Selektion zu

vermuten. Hier ist anzunehmen, dass besonders proliferationsstarke Zellen aus der Explant-Kultur bevorzugt in die nachfolgenden Passagen gelangten, während weniger wuchsstarke Zellen vergleichsweise unterrepräsentiert waren. Gleichwohl kann dies nicht zur Selektion einer einheitlich maximal proliferativen Subpopulation geführt haben, denn in diesem Fall wären die deutlichen Unterschiede zwischen den Zellen verschiedener Spender nicht zutage getreten.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die Gewebeproben fast ausschließlich von Rauchern ohne klinisch relevantes Lungenemphysem stammten und somit im Prinzip eine verstärkte Resistenz gegenüber einer durch Zigarettenrauch induzierten Seneszenz denkbar ist. Schließlich ist anzumerken, dass die Proliferationsraten von Lungenfibroblasten *in vivo* im Vergleich zu denen von *in vitro*-Zellkulturen vermutlich sehr gering sind, da *in vitro* die Proliferation durch die zugegebenen Wachstumsfaktoren angetrieben wird. Daher wäre im Prinzip denkbar, wenngleich nicht wahrscheinlich, dass sich die Sensitivität der Zellen gegenüber Noxen in beiden Situationen voneinander unterscheidet.

In Vorversuchen fand sich kein Wirkungsunterschied zwischen frischem und eingefrorenem Zigarettenrauchextrakt [Schindler, 2015]. Aus diesem Grund kam bei den Experimenten dieser Arbeit ausschließlich eingefrorener, jedoch frisch aufgetauter CSE zum Einsatz. Auch wenn es durch das Einfrieren und Auftauen des CSE möglicherweise zum Verlust flüchtiger Bestandteile kam, so ist bei der frischen Herstellung von Zigarettenrauchextrakt für jeden Versuch von einer deutlich größeren Variabilität und Unbeständigkeit auszugehen. Außerdem ist spätestens auf dem Weg zur Zellkultur sowie in der Kultur selbst mit einem Verlust von flüchtigen Komponenten aus dem CSE zu rechnen.

Durch den Einsatz von Primärzellen bestand überdies bereits eine Ursache für Variabilität zellulärer Antworten, die zu bestimmen zum Ziel der Arbeit gehörte. Um diese Unterschiede möglichst genau zu erfassen, wurde durch die Verwendung von Portionen aus der gleichen CSE-Lösung eine weitere mögliche Ursache für Variabilität minimiert. Auch stellt sich die Frage, inwiefern Lungenfibroblasten *in vivo* den flüchtigen Komponenten im Zigarettenrauch überhaupt ausgesetzt sind und ob es nicht vielmehr die wasserlöslichen Anteile des Zigarettenrauchs sind, die auch im CSE enthalten sind, sich in der Lunge ausbreiten können und somit nicht nur die Zellen des Epithels treffen, sondern auch für Fibroblasten von Bedeutung sind.

Bourgeois *et al.* zeigten, dass bei der CSE-Exposition gegenüber Zellkulturen nicht nur die CSE-Konzentration einen Einfluss auf die Zellreaktion hatte; auch die Zellzahl zu Beginn des Experiments und die applizierte CSE-Menge spielten eine Rolle [Bourgeois *et al.*, 2016]. Somit scheint auch das Verhältnis der wasserlöslichen Toxine zur Zellzahl im Sinne einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit der Noxe eine zu berücksichtigende Variable darzustellen, was die Vergleichbarkeit von Studien untereinander limitieren kann. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse kritisch von dieser Möglichkeit abhängen.

Jede Exposition wurde durch Waschen der Zellen mit D-MEM gestoppt. Trotz wiederholter Waschschritte könnte eine (sehr) geringe Menge CSE auf den Zellen verblieben sein. Dies könnte im Prinzip eine chronische CSE-Exposition mit niedriger Dosis nachahmen, doch sollte eine derartige Restexposition so niedrig gewesen sein, dass sie in Anbetracht der anderen Quellen der Variabilität einer Antwort bedeutungslos war. Da die Exposition gegenüber Zigarettenrauch beim Raucher einen über längere Zeit andauernden, quasi-kontinuierlichen, Prozess darstellt, könnten über Monate durchgeführte Expositionen in Durchfluss-Systemen eine geeignetere Methode zur Nachahmung einer chronischen CSE-Exposition darstellen. Derartige Versuche wurden in der Tat im Anschluss an die vorliegende Arbeit im Labor erprobt; hierbei wurde, da es sich um geschlossene Zellrasen handelte, die mögliche Beeinträchtigung der Proliferation durch CSE als proliferative Antwort auf eine Verwundung des Zellrasens geprüft. Im Falle von Epithelzellkulturen mit air-liquid-interface wäre darüber hinaus an Verneblungssysteme für CSE zu denken.

Als Parameter für die Auswertung wurde die durch Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmte Zellzahl genutzt; auf diese Art und Weise konnten die Zellen zugleich anhand der Trypanblau-Färbung beurteilt werden. Zur Verbesserung der Zuverlässigkeit und Erkennung von Ausreißern wurden bei dieser Arbeit alle Zählungen dreifach an unabhängigen Proben wiederholt. Die Genauigkeit von Trypanblau als Parameter der Zellvitalität wird angezweifelt, weil die durch die Färbung erhaltenen Informationen zur Vitalität der Zellen begrenzt ist [Strober, 2015]. Aus diesem Grund wurde die Trypanblau-Färbung in dieser Arbeit als Parameter der Zellintegrität anstatt der -vitalität gewertet. Für die zentrale Größe der Zellzahl als Outcome-Parameter der Experimente spielte diese Einschränkung keine Rolle.

5.10 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit hatte mehrere Fragestellungen hinsichtlich der Wirkungen von Zigarettenrauchextrakt (CSE) auf die Proliferationsrate primärer menschlicher Lungenfibroblasten zum Gegenstand. Als erstes wurde gezeigt, dass CSE zu jedem Zeitpunkt der Exposition während der Kulturphase eine irreversible Reduktion der Proliferationsrate verursachte. Hierbei fiel die Wirkung der Exposition zu einem späten Zeitpunkt des natürlichen Proliferationsverlaufs im Vergleich zu einem frühen Zeitpunkt deutlicher aus. Dies lässt eine Interaktion der Reaktionsmechanismen auf CSE mit einem intrinsischen Seneszenz-Prozess vermuten. Darüber hinaus zeigte eine zweite CSE-Exposition nach einer vorangegangenen CSE-Exposition zwar einen relativ schwächeren Effekt als eine isolierte späte CSE-Exposition, gleichwohl trat der größte Effekt auf die absolute Zellzahl bei der doppelten Exposition auf. Dies deutete auf einen partiellen protektiven Effekt der vorangegangenen CSE-Gabe hin. Die Zellen reagierten zu einem späteren Zeitpunkt schwächer, wenn sie sozusagen vorgewarnt waren, und stärker, wenn sie nicht vorgewarnt waren.

Ein zentrales Resultat ergab sich darüber hinaus aus der Verwendung von primären Lungenfibroblasten, die von verschiedenen Spendern stammten. Dies erlaubte nicht nur eine realitätsnähere Aussage im Vergleich zur Verwendung von Zelllinien, sondern zeigte vor allem beim Vergleich der Reaktionen der einzelnen Spender zwischen den verschiedenen Versuchen eine Korrelation der Antworten und somit konsistente Reaktionen von Zellen verschiedener Spender. Diese Heterogenität könnte für das Verständnis der Unterschiede der Entwicklung einer COPD bzw. eines Lungenemphysems bei Rauchern mit ähnlicher Zigarettenrauchbelastung hilfreich sein. Sie zeigt überdies die Überlegenheit der Verwendung primärer Zellen, wenn man die Variabilität zellulärer Antworten erfassen will.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adeloye, D., Song, P., Zhu, Y., Campbell, H., Sheikh, A., Rudan, I., & NIHR RESPIRE Global Respiratory Health Unit (2022). Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. *The Lancet. Respiratory medicine*, 10(5), 447–458.
- Agustí, A., & Hogg, J. C. (2019). Update on the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England journal of medicine*, 381(13), 1248–1256.
- Amsellem, V., Gary-Bobo, G., Marcos, E., Maitre, B., Char, V., Validire, P., Stern, J. B., Nouredine, H., Sapin, E., Rideau, D., Hue, S., Le Corvoisier, P., Le Gouvello, S., Dubois-Randé, J. L., Boczkowski, J., & Adnot, S. (2011). Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184(12), 1358–1366.
- Anderson, J. A., Dunnill, M. S., & Ryder, R. C. (1972). Dependence of the incidence of emphysema on smoking history, age, and sex. *Thorax*, 27(5), 547–551.
- Anderson, A. E., Jr, & Foraker, A. G. (1973). Centrilobular emphysema and panlobular emphysema: two different diseases. *Thorax*, 28(5), 547–550.
- Andreotti, L., Bussotti, A., Cammelli, D., Aiello, E., & Sampognaro, S. (1983). Connective tissue in aging lung. *Gerontology*, 29(6), 377–387.
- Anthonisen, N. R., Connett, J. E., & Murray, R. P. (2002). Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 166(5), 675–679.
- Anzueto A. (2006). Clinical course of chronic obstructive pulmonary disease: review of therapeutic interventions. *The American journal of medicine*, 119(10 Suppl 1), 46–53.
- Aoshiba, K., Yokohori, N., & Nagai, A. (2003). Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 28(5), 555–562.

- Appleton, S., Jones, T., Poole, P., Pilotto, L., Adams, R., Lasserson, T. J., Smith, B., & Muhammad, J. (2006). Ipratropium bromide versus short acting beta-2 agonists for stable chronic obstructive pulmonary disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2006(2), CD001387.
- Barnes, P. J., Baker, J., & Donnelly, L. E. (2019). Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 200(5), 556–564.
- Bhatt, S. P., Kim, Y. I., Harrington, K. F., Hokanson, J. E., Lutz, S. M., Cho, M. H., DeMeo, D. L., Wells, J. M., Make, B. J., Rennard, S. I., Washko, G. R., Foreman, M. G., Tashkin, D. P., Wise, R. A., Dransfield, M. T., Bailey, W. C., & COPDGene Investigators (2018). Smoking duration alone provides stronger risk estimates of chronic obstructive pulmonary disease than pack-years. *Thorax*, 73(5), 414–421.
- Bhatt, S. P., Washko, G. R., Hoffman, E. A., Newell, J. D., Jr, Bodduluri, S., Diaz, A. A., Galban, C. J., Silverman, E. K., San José Estépar, R., & Lynch, D. A. (2019). Imaging Advances in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Insights from the Genetic Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPDGene) Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 199(3), 286–301.
- Bird, J., Ostler, E. L., & Faragher, R. G. (2003). Can we say that senescent cells cause ageing?. *Experimental gerontology*, 38(11-12), 1319–1326.
- Blanc, P. D., Annesi-Maesano, I., Balmes, J. R., Cummings, K. J., Fishwick, D., Miedinger, D., Murgia, N., Naidoo, R. N., Reynolds, C. J., Sigsgaard, T., Torén, K., Vinnikov, D., & Redlich, C. A. (2019). The Occupational Burden of Nonmalignant Respiratory Diseases. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Statement. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 199(11), 1312–1334.
- Bourgeois, J. S., Jacob, J., Garewal, A., Ndahayo, R., & Paxson, J. (2016). The Bioavailability of Soluble Cigarette Smoke Extract Is Reduced through Interactions with Cells and Affects the Cellular Response to CSE Exposure. *PloS one*, 11(9), e0163182.
- Brookes, S., Rowe, J., Gutierrez Del Arroyo, A., Bond, J., & Peters, G. (2004). Contribution of p16(INK4a) to replicative senescence of human fibroblasts. *Experimental cell research*, 298(2), 549–559.

- Budweiser, S., Heinemann, F., Meyer, K., Wild, P. J., & Pfeifer, M. (2006). Weight gain in cachectic COPD patients receiving noninvasive positive-pressure ventilation. *Respiratory care*, 51(2), 126–132.
- Buist, A. S., McBurnie, M. A., Vollmer, W. M., Gillespie, S., Burney, P., Mannino, D. M., Menezes, A. M., Sullivan, S. D., Lee, T. A., Weiss, K. B., Jensen, R. L., Marks, G. B., Gulsvik, A., Nizankowska-Mogilnicka, E., & BOLD Collaborative Research Group (2007). International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet (London, England)*, 370(9589), 741–750.
- Campbell, E. J., & Lefrak, S. S. (1978). How aging affects the structure and function of the respiratory system. *Geriatrics*, 33(6), 68–74.
- Caramori, G., Casolari, P., Barczyk, A., Durham, A. L., Di Stefano, A., & Adcock, I. (2016). COPD immunopathology. *Seminars in immunopathology*, 38(4), 497–515.
- Celli, B. R. (2006). Chronic obstructive pulmonary disease: from unjustified nihilism to evidence-based optimism. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(1), 58–65.
- Celli, B., Fabbri, L., Criner, G., Martinez, F. J., Mannino, D., Vogelmeier, C., Montes de Oca, M., Papi, A., Sin, D. D., Han, M. K., & Agusti, A. (2022). Definition and Nomenclature of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Time for Its Revision. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 206(11), 1317–1325.
- Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S., & Linskens, M. H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Experimental cell research*, 265(2), 294–303.
- Chong, J., Leung, B., & Poole, P. (2017). Phosphodiesterase 4 inhibitors for chronic obstructive pulmonary disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 9(9), CD002309.
- Cockcroft, A., Seal, R. M., Wagner, J. C., Lyons, J. P., Ryder, R., & Andersson, N. (1982). Post-mortem study of emphysema in coalworkers and non-coalworkers. *Lancet (London, England)*, 2(8298), 600–603.
- Collins, C. J., & Sedivy, J. M. (2003). Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging cell*, 2(3), 145–150.

- Crouch, J., Shvedova, M., Thanapaul, R. J. R. S., Botchkarev, V., & Roh, D. (2022). Epigenetic Regulation of Cellular Senescence. *Cells*, 11(4), 672.
- De Luca, S. N., & Vlahos, R. (2024). Targeting accelerated pulmonary ageing to treat chronic obstructive pulmonary disease-induced neuropathological comorbidities. *British journal of pharmacology*, 181(1), 3–20.
- De Magalhães J. P. (2004). From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing. *Experimental cell research*, 300(1), 1–10.
- de Ritis S. (2009). Wirkung von Zigarettenrauchextrakt auf die Proliferation menschlicher Lungenfibroblasten. Beitrag von Nikotin und Oxidantien. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.
- Di Stefano, A., Caramori, G., Ricciardolo, F. L., Capelli, A., Adcock, I. M., & Donner, C. F. (2004). Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(8), 1156–1167.
- Eisner, M. D., Anthonisen, N., Coultas, D., Kuenzli, N., Perez-Padilla, R., Postma, D., Romieu, I., Silverman, E. K., Balmes, J. R., & Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly (2010). An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(5), 693–718.
- Erusalimsky, J. D., & Kurz, D. J. (2005). Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Experimental gerontology*, 40(8-9), 634–642.
- Erusalimsky, J. D., & Kurz, D. J. (2006). Endothelial cell senescence. *Handbook of experimental pharmacology*, (176 Pt 2), 213–248.
- Famulski, K. S., & Halloran, P. F. (2005). Molecular events in kidney ageing. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 14(3), 243–248.

- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., & Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of dermatology*, 138(11), 1462–1470.
- Fletcher, C., & Peto, R. (1977). The natural history of chronic airflow obstruction. *British medical journal*, 1(6077), 1645–1648.
- Freiman, A., Bird, G., Metelitsa, A. I., Barankin, B., & Lauzon, G. J. (2004). Cutaneous effects of smoking. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 8(6), 415–423.
- Fukuchi, Y., Nishimura, M., Ichinose, M., Adachi, M., Nagai, A., Kuriyama, T., Takahashi, K., Nishimura, K., Ishioka, S., Aizawa, H., & Zaher, C. (2004). COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 9(4), 458–465.
- Fukuchi Y. (2009). The aging lung and chronic obstructive pulmonary disease: similarity and difference. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(7), 570–572.
- GOLD. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2024 Report) – Zugänglich unter: <http://www.goldcopd.com>.
- Graf V. (2020). Marker der biologischen Alterung bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD). Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Halbert, R. J., Natoli, J. L., Gano, A., Badamgarav, E., Buist, A. S., & Mannino, D. M. (2006). Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *The European respiratory journal*, 28(3), 523–532.
- Hansell D. M. (2010). Thin-section CT of the lungs: the Hinterland of normal. *Radiology*, 256(3), 695–711.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, 585–621.
- Hayflick L. (2004). The not-so-close relationship between biological aging and age-associated pathologies in humans. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 59(6), B547–553.

- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in cell biology*, 28(6), 436–453.
- Heyne C. (2011). Wirkung von Zigarettenrauch, Nikotin und N-Acetylcystein auf die Differenzierung und Funktion von Präadipozyten. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hogg J. C. (2004). Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet (London, England)*, 364(9435), 709–721.
- Holz, O., Zühlke, I., Jaksztat, E., Müller, K. C., Welker, L., Nakashima, M., Diemel, K. D., Branscheid, D., Magnussen, H., & Jörres, R. A. (2004). Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *The European respiratory journal*, 24(4), 575–579.
- Hou, A., Voorhoeve, P. M., Lan, W., Tin, M., & Tong, L. (2013). Comparison of gene expression profiles in primary and immortalized human pterygium fibroblast cells. *Experimental cell research*, 319(18), 2781–2789.
- Ito, K., & Barnes, P. J. (2009). COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*, 135(1), 173–180.
- Janssens J. P. (2005). Aging of the respiratory system: impact on pulmonary function tests and adaptation to exertion. *Clinics in chest medicine*, 26(3), 469–vii.
- Jinno, S., Kida, K., & Ootsubo, K. (1994). Epidemiology of emphysema: analysis by autopsy in a series of elderly patients *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai zasshi*, 32 Suppl, 193–199.
- Kahnert, K., Andreas, S., Kellerer, C., Lutter, J. I., Lucke, T., Yildirim, Ö., Lehmann, M., Seissler, J., Behr, J., Frankenberger, M., Bals, R., Watz, H., Welte, T., Trudzinski, F. C., Vogelmeier, C. F., Alter, P., Jörres, R. A., & COSYCONET Study Group (2022). Reduced decline of lung diffusing capacity in COPD patients with diabetes and metformin treatment. *Scientific reports*, 12(1), 1435.
- Kanaji, N., Basma, H., Nelson, A., Farid, M., Sato, T., Nakanishi, M., Wang, X., Michalski, J., Li, Y., Gunji, Y., Feghali-Bostwick, C., Liu, X., & Rennard, S. I. (2014). Fibroblasts that resist cigarette smoke-induced senescence acquire profibrotic phenotypes. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 307(5), L364–L373.

- Karrasch, S., Holz, O., & Jörres, R. A. (2008). Aging and induced senescence as factors in the pathogenesis of lung emphysema. *Respiratory medicine*, *102*(9), 1215–1230.
- Kasahara, Y., Tuder, R. M., Cool, C. D., Lynch, D. A., Flores, S. C., & Voelkel, N. F. (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *163*(3 Pt 1), 737–744.
- Kim, S. Y., Lee, J. H., Kim, H. J., Park, M. K., Huh, J. W., Ro, J. Y., Oh, Y. M., Lee, S. D., & Lee, Y. S. (2012). Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, *302*(9), L891–L908.
- Kohansal, R., Martinez-Cambor, P., Agustí, A., Buist, A. S., Mannino, D. M., & Soriano, J. B. (2009). The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *180*(1), 3–10.
- Kotaru, C., Schoonover, K. J., Trudeau, J. B., Huynh, M. L., Zhou, X., Hu, H., & Wenzel, S. E. (2006). Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *173*(11), 1208–1215.
- Ladislav R. (2000). Cellular and molecular mechanisms of aging and age related diseases. *Pathology oncology research : POR*, *6*(1), 3–9.
- Leung, W. C., & Harvey, I. (2002). Is skin ageing in the elderly caused by sun exposure or smoking?. *The British journal of dermatology*, *147*(6), 1187–1191.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194–1217.
- Lucke T. (2015). Vergleichende Analyse biologischer Alterungsmarker bei Patienten mit chronisch-obstruktiver Lungenerkrankung (COPD). Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Lynch, D. A., Austin, J. H., Hogg, J. C., Grenier, P. A., Kauczor, H. U., Bankier, A. A., Barr, R. G., Colby, T. V., Galvin, J. R., Gevenois, P. A., Coxson, H. O., Hoffman, E. A., Newell, J. D., Jr, Pistolesi, M., Silverman, E. K., & Crapo, J. D. (2015). CT-Definable Subtypes of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Statement of the Fleischner Society. *Radiology*, *277*(1), 192–205.
- Lynch, D. A., Moore, C. M., Wilson, C., Nevrekar, D., Jennermann, T., Humphries, S. M., Austin, J. H. M., Grenier, P. A., Kauczor, H. U., Han, M. K., Regan, E. A., Make, B. J., Bowler, R. P., Beaty, T. H., Curran-Everett, D., Hokanson, J. E., Curtis, J. L., Silverman, E. K., Crapo, J. D., & Genetic Epidemiology of COPD (COPDGene) Investigators (2018). CT-based Visual Classification of Emphysema: Association with Mortality in the COPDGene Study. *Radiology*, *288*(3), 859–866.
- Machata B. (2010). Wirkung von Zigarettenrauch auf Präadipozyten als potentielle systemische Modifikatoren einer COPD. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- MacNee W. (2005). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *2*(4), 258–291.
- MacNee W. (2009). Accelerated lung aging: a novel pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Biochemical Society transactions*, *37*(Pt 4), 819–823.
- MacNee W. (2016). Is Chronic Obstructive Pulmonary Disease an Accelerated Aging Disease?. *Annals of the American Thoracic Society*, *13 Suppl 5*, S429–S437.
- Massaro, G. D., Radaeva, S., Clerch, L. B., & Massaro, D. (2002). Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, *283*(2), L305–L309.
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*, *3*(11), e442.
- Miravittles, M., Soler-Cataluña, J. J., Calle, M., & Soriano, J. B. (2013). Treatment of COPD by clinical phenotypes: putting old evidence into clinical practice. *The European respiratory journal*, *41*(6), 1252–1256.
- Moll, H. P., Maier, T., Zommer, A., Lavoie, T., & Brostjan, C. (2011). The differential activity of interferon- α subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine*, *53*(1), 52–59.

- Mondello, C., Petropoulou, C., Monti, D., Gonos, E. S., Franceschi, C., & Nuzzo, F. (1999). Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Experimental cell research*, 248(1), 234–242.
- Müller, K. C., Welker, L., Paasch, K., Feindt, B., Erpenbeck, V. J., Hohlfeld, J. M., Krug, N., Nakashima, M., Branscheid, D., Magnussen, H., Jörres, R. A., & Holz, O. (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respiratory research*, 7(1), 32.
- Müller, K. C., Paasch, K., Feindt, B., Welker, L., Watz, H., Branscheid, D., ... & Holz, O. (2007). Lungenfibroblasten von Patienten mit Emphysem und Kontrollen unterscheiden sich in der Proliferation nach Inkubation mit Insulin, IGF-1 und IGF-2. *Pneumologie*, 61(01), A16.
- Nakajima, C., Kijimoto, C., Yokoyama, Y., Miyakawa, T., Tsuchiya, Y., Kuroda, T., Nakano, M., & Saeki, M. (1998). Longitudinal follow-up of pulmonary function after lobectomy in childhood - factors affecting lung growth. *Pediatric surgery international*, 13(5-6), 341–345.
- Ni, H., Soe, Z., & Moe, S. (2014). Acclidinium bromide for stable chronic obstructive pulmonary disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2014(9), CD010509.
- Noordhoek, J. A., Postma, D. S., Chong, L. L., Vos, J. T., Kauffman, H. F., Timens, W., & van Straaten, J. F. (2003). Different proliferative capacity of lung fibroblasts obtained from control subjects and patients with emphysema. *Experimental lung research*, 29(5), 291–302.
- Nyunoya, T., Monick, M. M., Klingelhutz, A., Yarovinsky, T. O., Cagley, J. R., & Hunninghake, G. W. (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 35(6), 681–688.
- Oelsner, E. C., Balte, P. P., Bhatt, S. P., Cassano, P. A., Couper, D., Folsom, A. R., Freedman, N. D., Jacobs, D. R., Jr, Kalhan, R., Mathew, A. R., Kronmal, R. A., Loehr, L. R., London, S. J., Newman, A. B., O'Connor, G. T., Schwartz, J. E., Smith, L. J., White, W. B., & Yende, S. (2020). Lung function decline in former smokers and low-intensity current smokers: a secondary data analysis of the NHLBI Pooled Cohorts Study. *The Lancet. Respiratory medicine*, 8(1), 34–44.

- Olschläger, V., Schrader, A., & Hockertz, S. (2009). Comparison of primary human fibroblasts and keratinocytes with immortalized cell lines regarding their sensitivity to sodium dodecyl sulfate in a neutral red uptake cytotoxicity assay. *Arzneimittel-Forschung*, 59(3), 146–152.
- Paliogiannis, P., Fois, A. G., Sotgia, S., Mangoni, A. A., Zinellu, E., Pirina, P., Negri, S., Carru, C., & Zinellu, A. (2018). Neutrophil to lymphocyte ratio and clinical outcomes in COPD: recent evidence and future perspectives. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 27(147), 170113.
- Paschalaki, K. E., Starke, R. D., Hu, Y., Mercado, N., Margariti, A., Gorgoulis, V. G., Randi, A. M., & Barnes, P. J. (2013). Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 31(12), 2813–2826.
- Pauwels, R. A., & Rabe, K. F. (2004). Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet (London, England)*, 364(9434), 613–620.
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, 184(15), 3852–3872.
- Prescott, E., Lange, P., & Vestbo, J. (1999). Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *The European respiratory journal*, 13(5), 1109–1114.
- Pryor, W. A., Prier, D. G., & Church, D. F. (1983). Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environmental health perspectives*, 47, 345–355.
- Rahman, I., Swarska, E., Henry, M., Stolk, J., & MacNee, W. (2000). Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease?. *Thorax*, 55(3), 189–193.
- Richards D. W. (1956). The aging lung. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 32(6), 407–417.
- Rivas, M., Gupta, G., Costanzo, L., Ahmed, H., Wyman, A. E., & Geraghty, P. (2022). Senescence: Pathogenic Driver in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(6), 817.

- Rossi, A., Ganassini, A., Tantucci, C., & Grassi, V. (1996). Aging and the respiratory system. *Aging (Milan, Italy)*, 8(3), 143–161.
- Rubin H. (2002a). Promise and problems in relating cellular senescence in vitro to aging in vivo. *Archives of gerontology and geriatrics*, 34(3), 275–286.
- Rubin H. (2002b). The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nature biotechnology*, 20(7), 675–681.
- Saetta, M., Kim, W. D., Izquierdo, J. L., Ghezzo, H., & Cosio, M. G. (1994). Extent of centrilobular and panacinar emphysema in smokers' lungs: pathological and mechanical implications. *The European respiratory journal*, 7(4), 664–671.
- Sato, T., Liu, X., Nelson, A., Nakanishi, M., Kanaji, N., Wang, X., Kim, M., Li, Y., Sun, J., Michalski, J., Patil, A., Basma, H., Holz, O., Magnussen, H., & Rennard, S. I. (2010). Reduced miR-146a increases prostaglandin E₂ in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182(8), 1020–1029.
- Satoh, M., Ishikawa, Y., Takahashi, Y., Itoh, T., Minami, Y., & Nakamura, M. (2008). Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 198(2), 347–353.
- Savale, L., Chaouat, A., Bastuji-Garin, S., Marcos, E., Boyer, L., Maitre, B., Sarni, M., Housset, B., Weitzenblum, E., Matrat, M., Le Corvoisier, P., Rideau, D., Boczkowski, J., Dubois-Randé, J. L., Chouaid, C., & Adnot, S. (2009). Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 179(7), 566–571.
- Schindler S. (2015). Wirkung von Zigarettenrauchextrakt und Wasserstoffperoxid auf das Wachstumsverhalten menschlicher Lungenfibroblasten. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Severino, J., Allen, R. G., Balin, S., Balin, A., & Cristofalo, V. J. (2000). Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?. *Experimental cell research*, 257(1), 162–171.
- Shimizu, I., & Minamino, T. (2019). Cellular senescence in cardiac diseases. *Journal of cardiology*, 74(4), 313–319.

- Smith, B. M., Austin, J. H., Newell, J. D., Jr, D'Souza, B. M., Rozenshtein, A., Hoffman, E. A., Ahmed, F., & Barr, R. G. (2014). Pulmonary emphysema subtypes on computed tomography: the MESA COPD study. *The American journal of medicine*, 127(1), 10.1016/j.amjmed.2013.09.020.
- Soriano, J. B., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abera, S. F., Agrawal, A., Ahmed, M. B., ... & Vos, T. (2017). Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Respiratory Medicine*, 5(9), 691-706.
- Sprenger, A., Weber, S., Zarai, M., Engelke, R., Nascimento, J. M., Gretzmeier, C., Hilpert, M., Boerries, M., Has, C., Busch, H., Bruckner-Tuderman, L., & Dengjel, J. (2013). Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 12(9), 2509–2521.
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A., & Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 2109–2117.
- Strober W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 111, A3.B.1–A3.B.3.
- Sullivan, S. D., Ramsey, S. D., & Lee, T. A. (2000). The economic burden of COPD. *Chest*, 117(2 Suppl), 5S–9S.
- Tong, L., Diebold, Y., Calonge, M., Gao, J., Stern, M. E., & Beuerman, R. W. (2009). Comparison of gene expression profiles of conjunctival cell lines with primary cultured conjunctival epithelial cells and human conjunctival tissue. *Gene expression*, 14(5), 265–278.
- Tsuji, T., Aoshiba, K., & Nagai, A. (2004). Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(6), 643–649.
- Tsuji, T., Aoshiba, K., & Nagai, A. (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 174(8), 886–893.

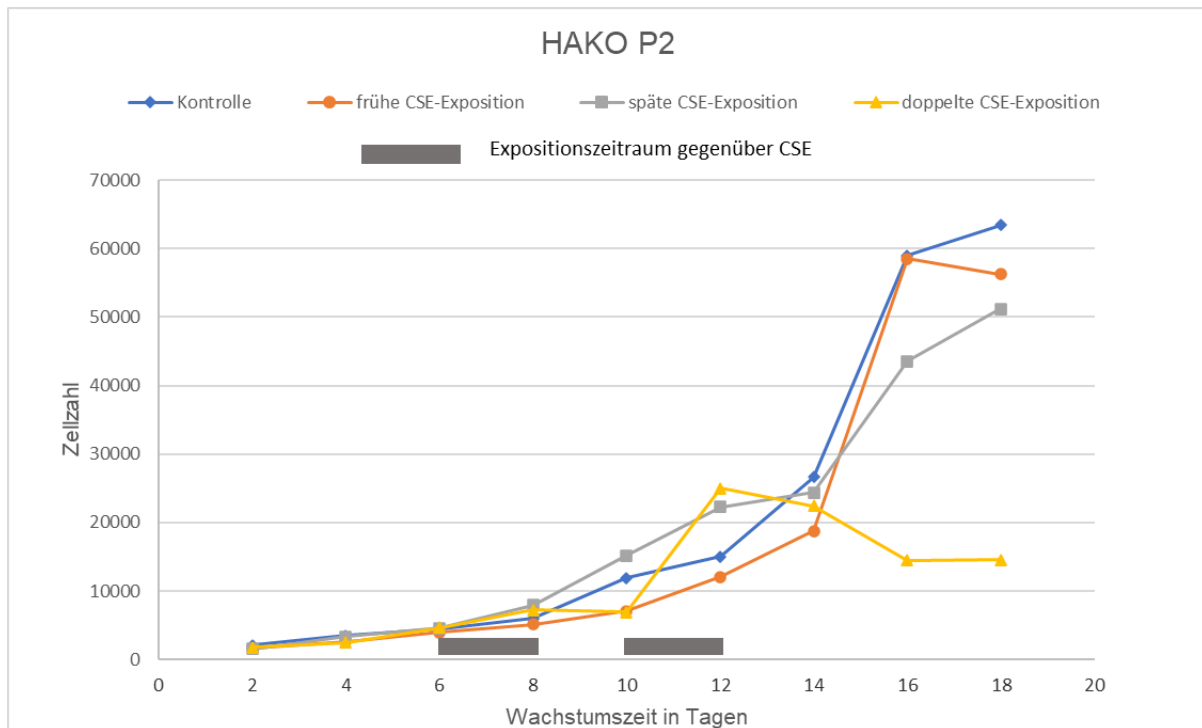
- Tuder, R. M., Petrache, I., Elias, J. A., Voelkel, N. F., & Henson, P. M. (2003). Apoptosis and emphysema: the missing link. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 28(5), 551–554.
- Valenzi, E., Bulik, M., Tabib, T., Morse, C., Sembrat, J., Trejo Bittar, H., Rojas, M., & Lafyatis, R. (2019). Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myofibroblasts in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Annals of the rheumatic diseases*, 78(10), 1379–1387.
- Verbeken, E. K., Cauberghs, M., Mertens, I., Clement, J., Lauweryns, J. M., & Van de Woestijne, K. P. (1992). The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 1. Structural aspects. *Chest*, 101(3), 793–799.
- Weibel E.R., Gehr P., Haies D., & Gil J. (1975). The cell population of the normal lung. In Lung cells in disease. Ed. Bonhuys A, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 3-16.
- WHO. (1961). WHO report of an expert committee: Definition and diagnosis of pulmonary disease with special reference to chronic bronchitis and emphysema. *WHO Techn Rep Ser*, 213, 14-9.
- WHO (2023). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))
- Willemse, B. W., ten Hacken, N. H., Rutgers, B., Lesman-Leegte, I. G., Timens, W., & Postma, D. S. (2004). Smoking cessation improves both direct and indirect airway hyperresponsiveness in COPD. *The European respiratory journal*, 24(3), 391–396.
- Willemse, B. W., ten Hacken, N. H., Rutgers, B., Lesman-Leegte, I. G., Postma, D. S., & Timens, W. (2005). Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *The European respiratory journal*, 26(5), 835–845.
- Zafari, Z., Li, S., Eakin, M. N., Bellanger, M., & Reed, R. M. (2021). Projecting Long-term Health and Economic Burden of COPD in the United States. *Chest*, 159(4), 1400–1410.

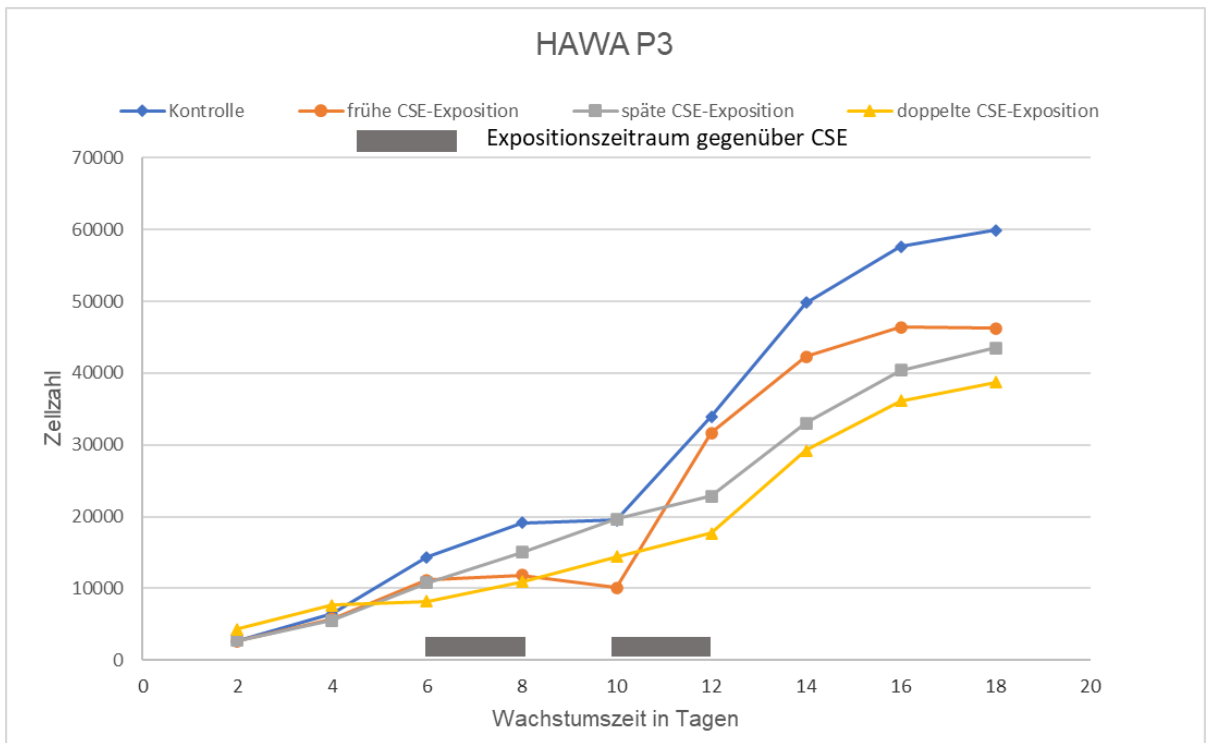
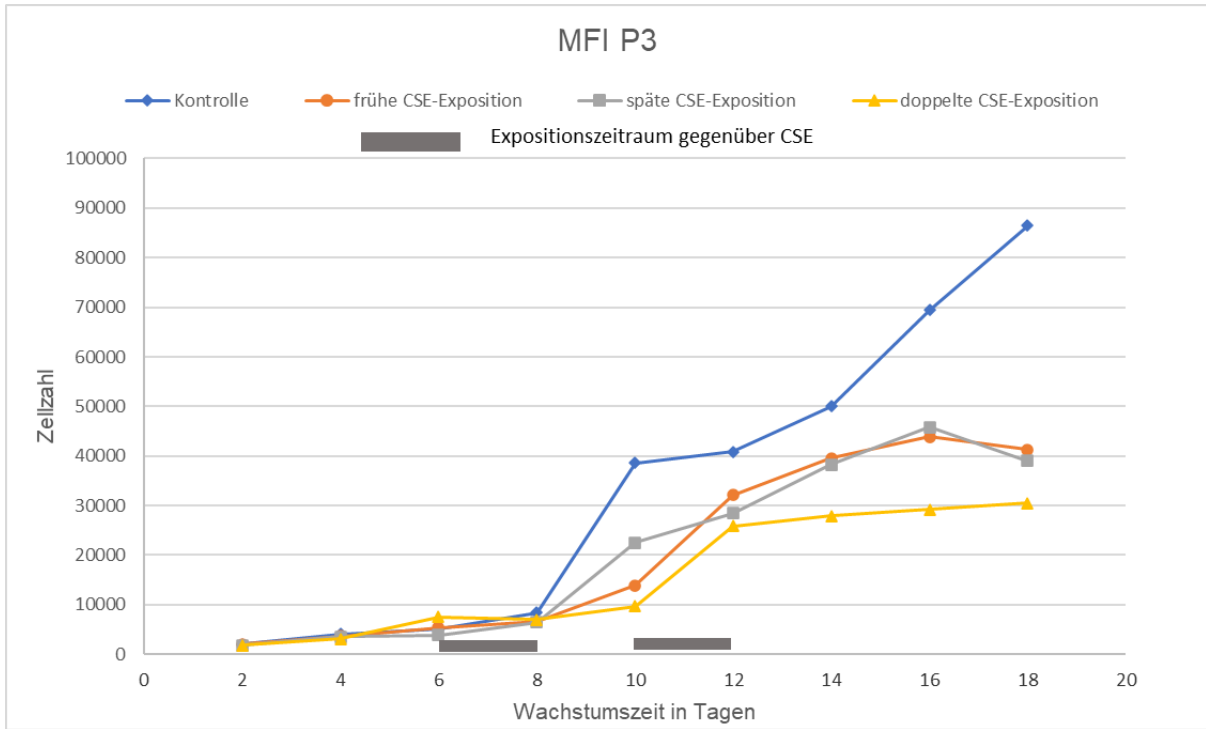
Anhang A

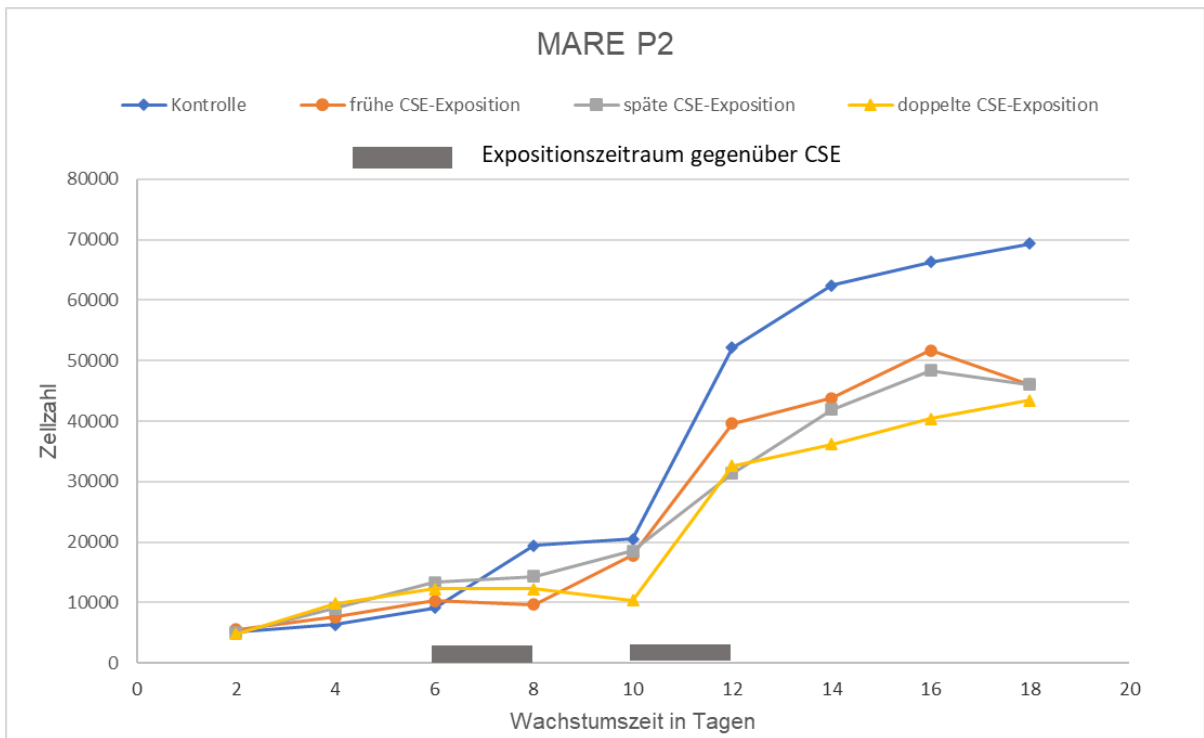
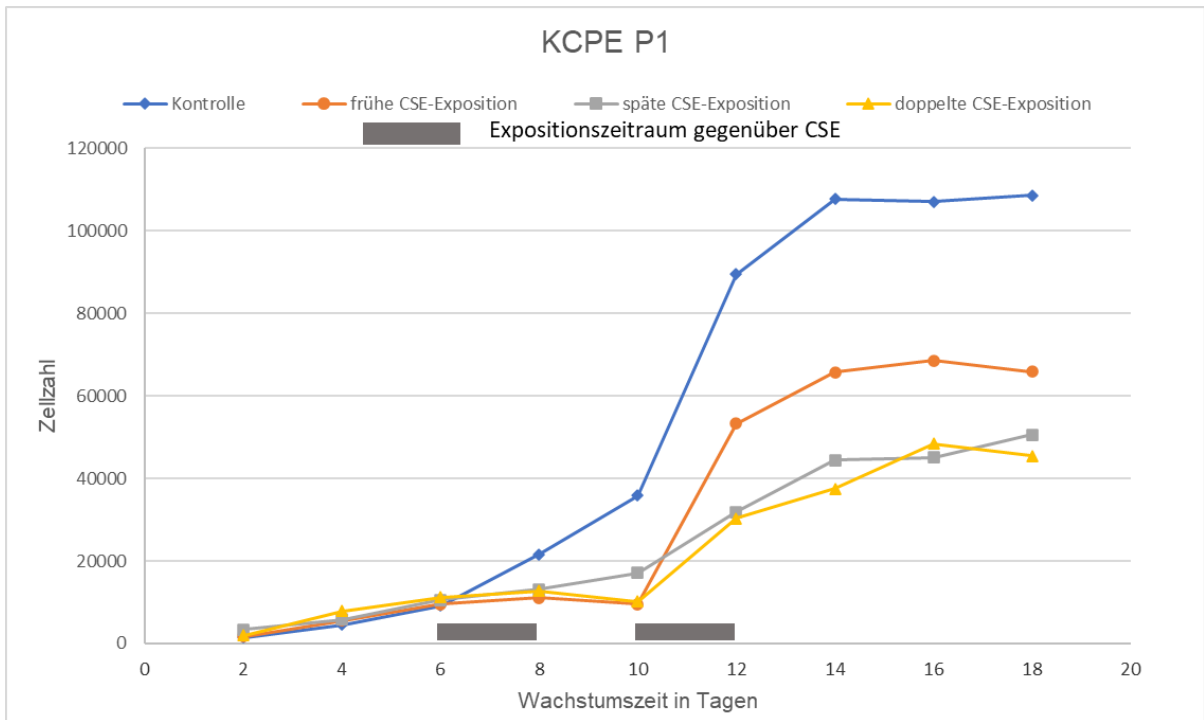
Diagramme der Einzelversuche

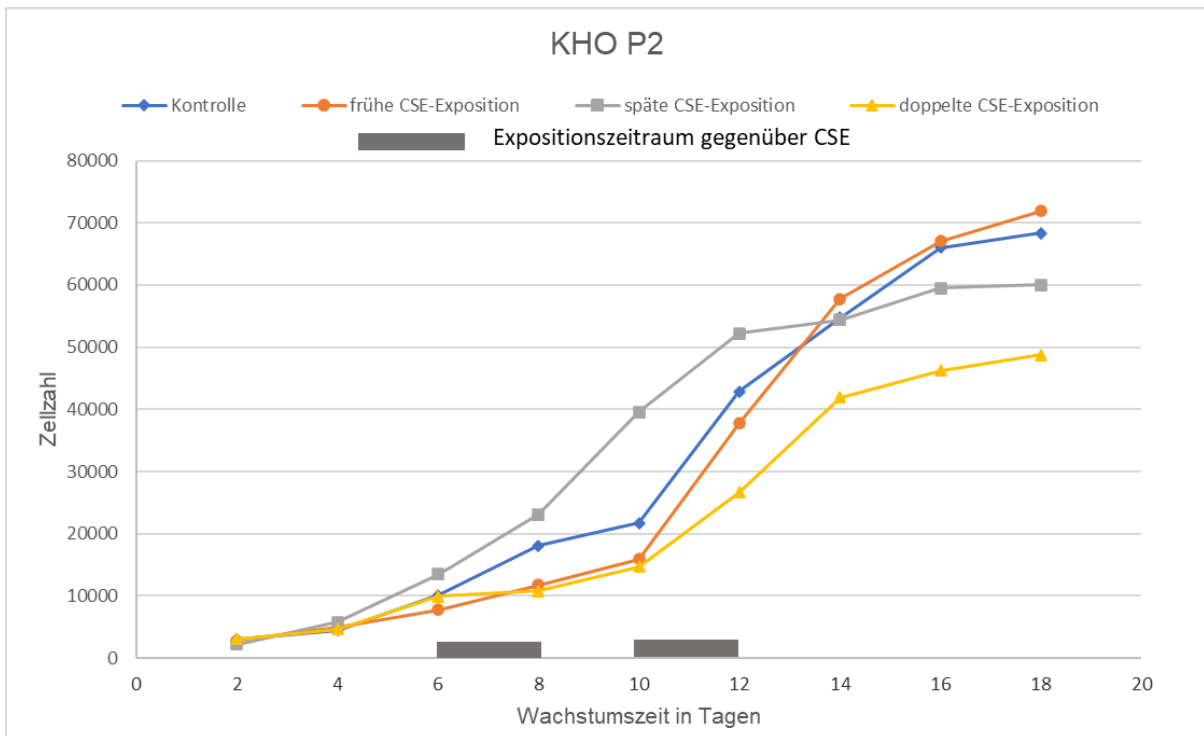
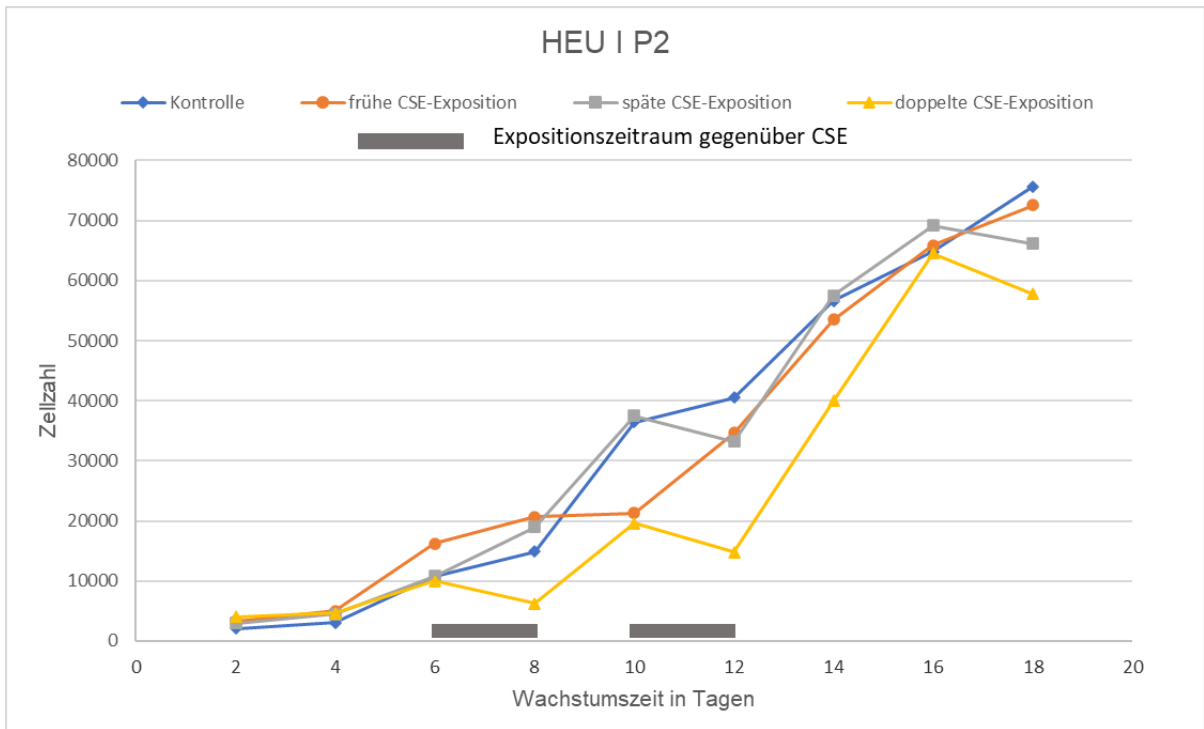
Zur Dokumentation der Einzelwerte und der Variabilität der Ergebnisse werden im Folgenden die Daten der erfolgreichen, d.h. interpretierbaren und nicht durch Kontamination gestörten Versuche gezeigt. Bei den Kürzeln handelt es sich um interne Label des Versuchs und der verwendeten Zellen, die keine Verwandtschaft mit den Namen der Gewebespender aufweisen. Wegen der unterschiedlichen Zellzahlen der verschiedenen Proben war es nicht möglich eine einheitliche Skalierung zu wählen, was beim Vergleich der Diagramme zu beachten ist.

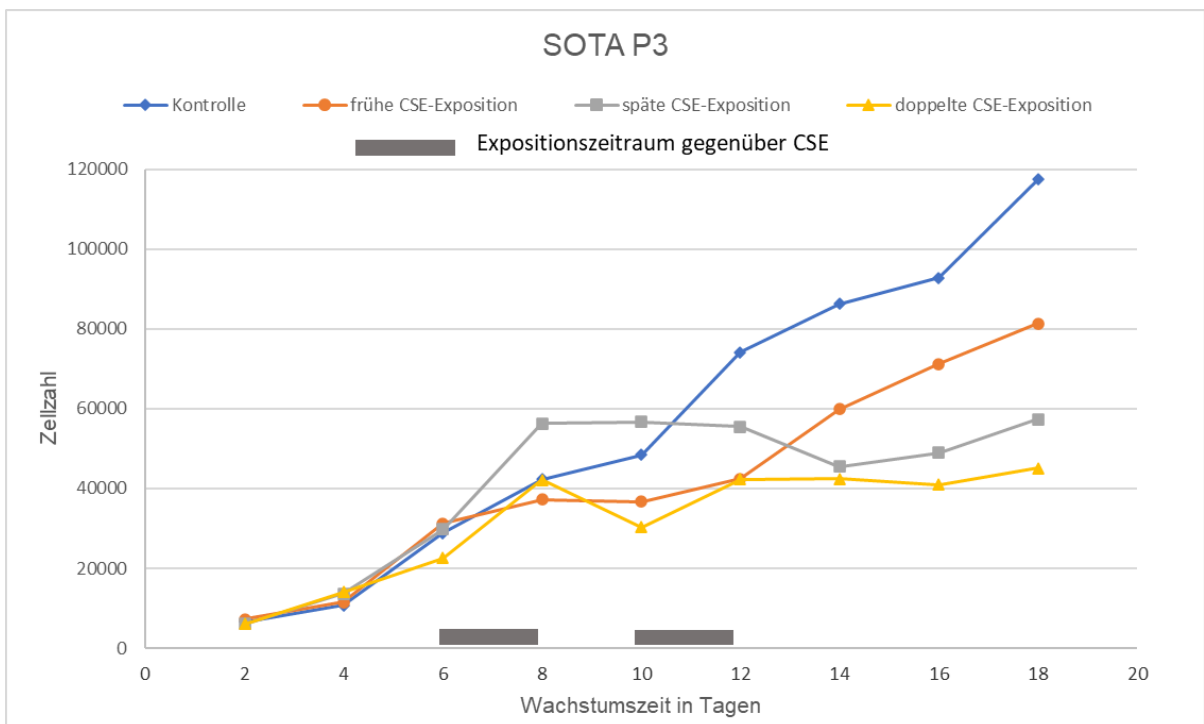
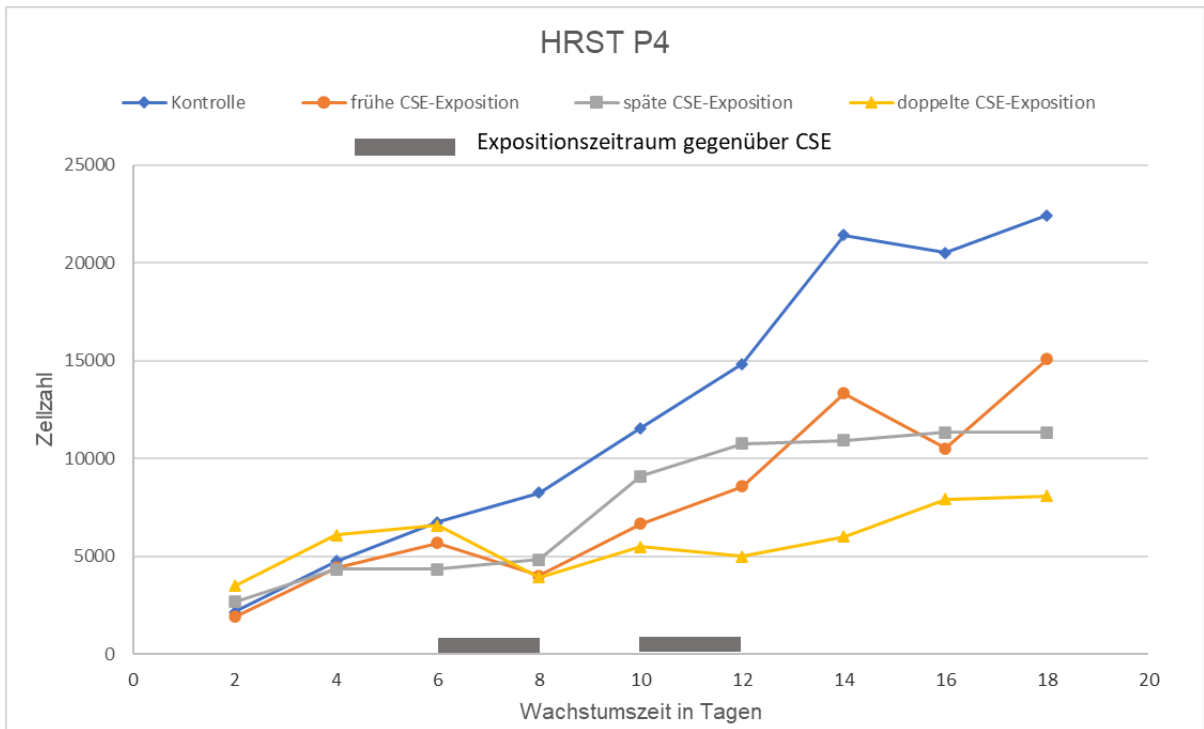
Gesamtzellzahlen

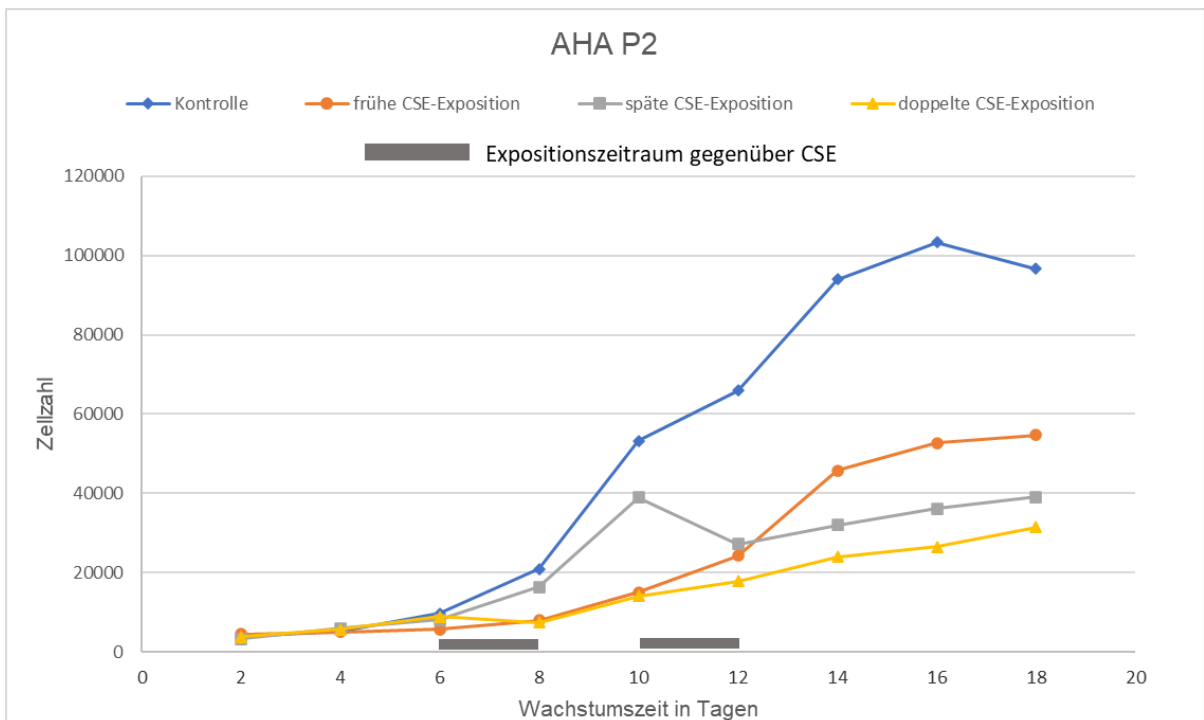
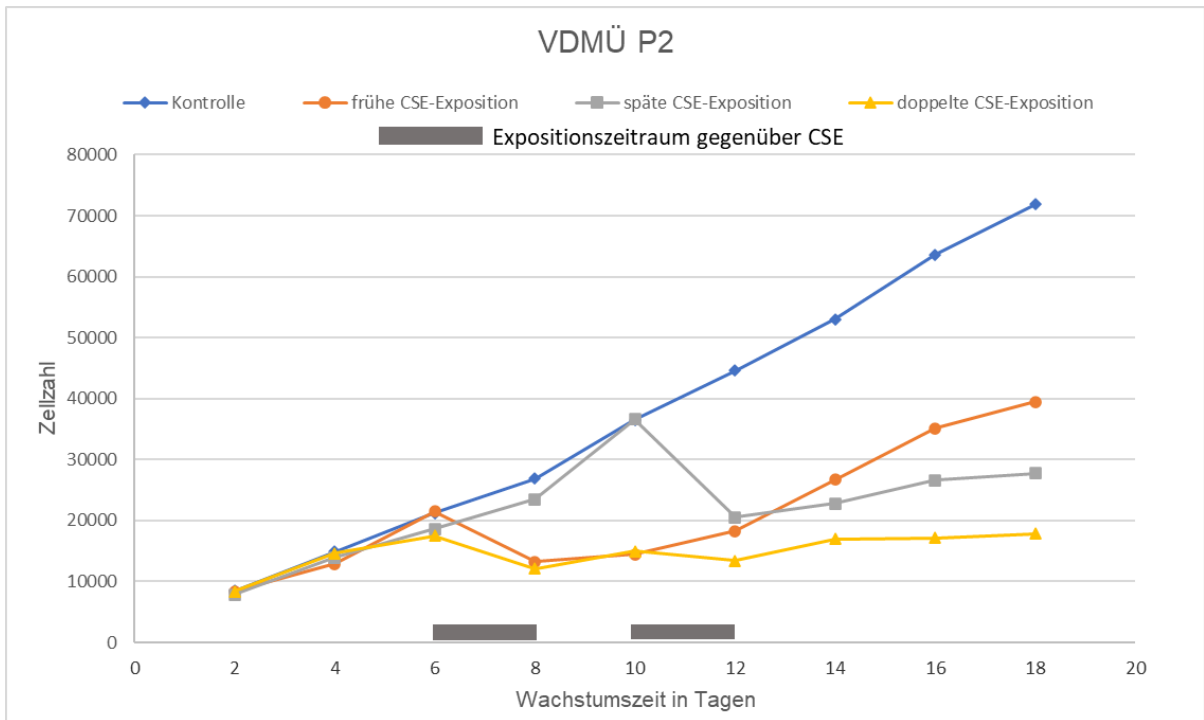


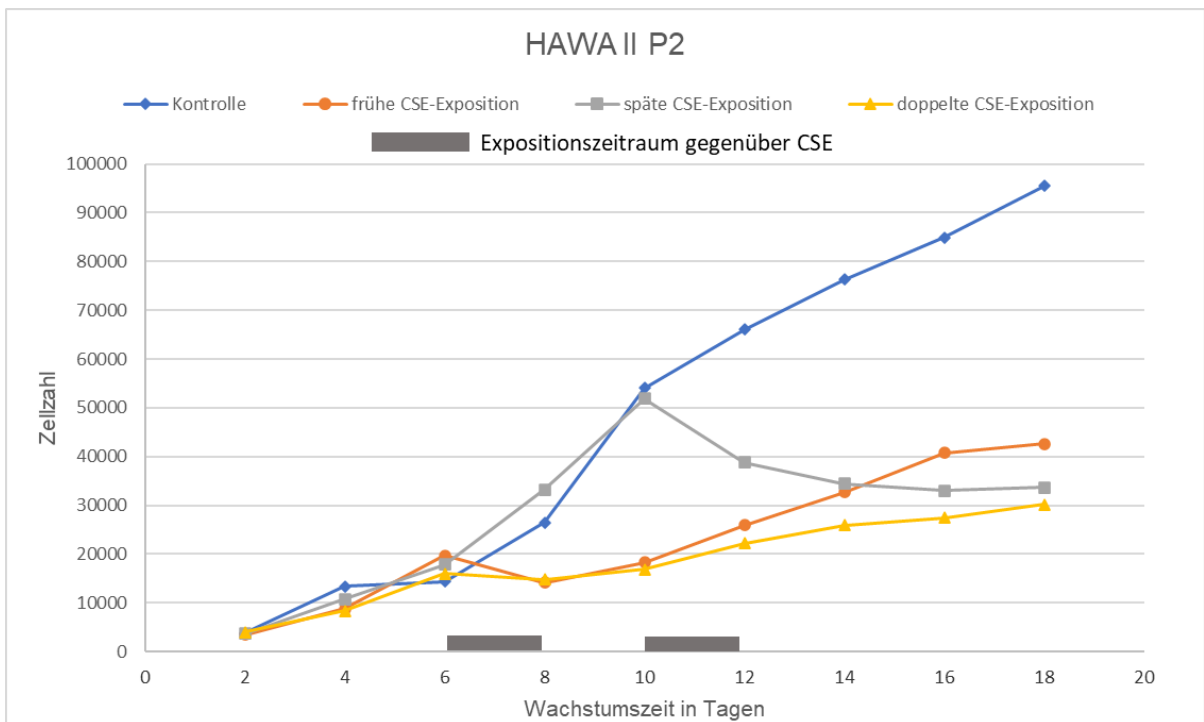
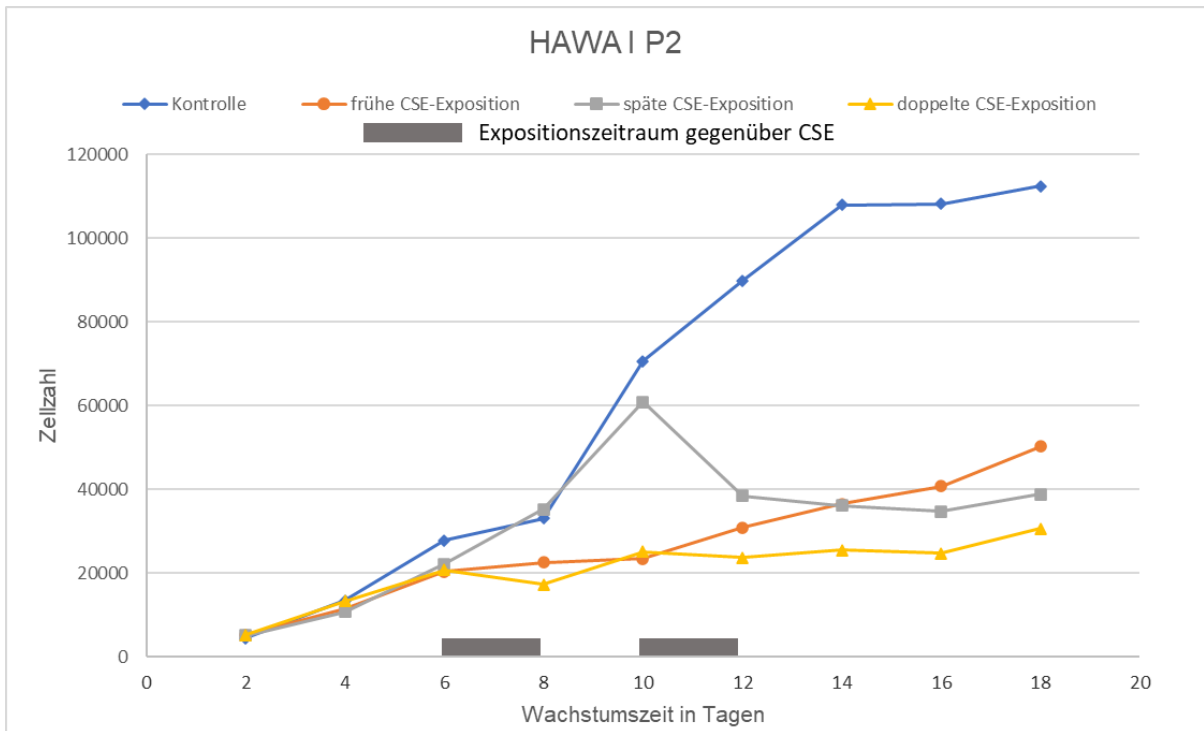


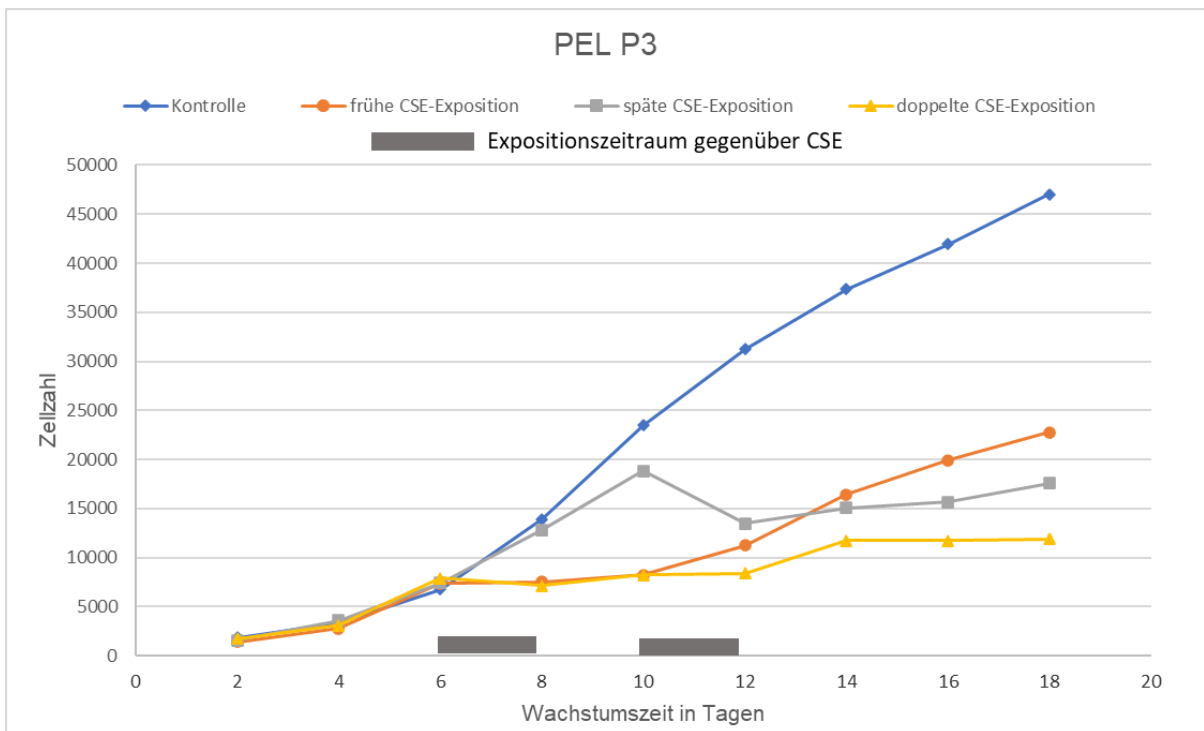
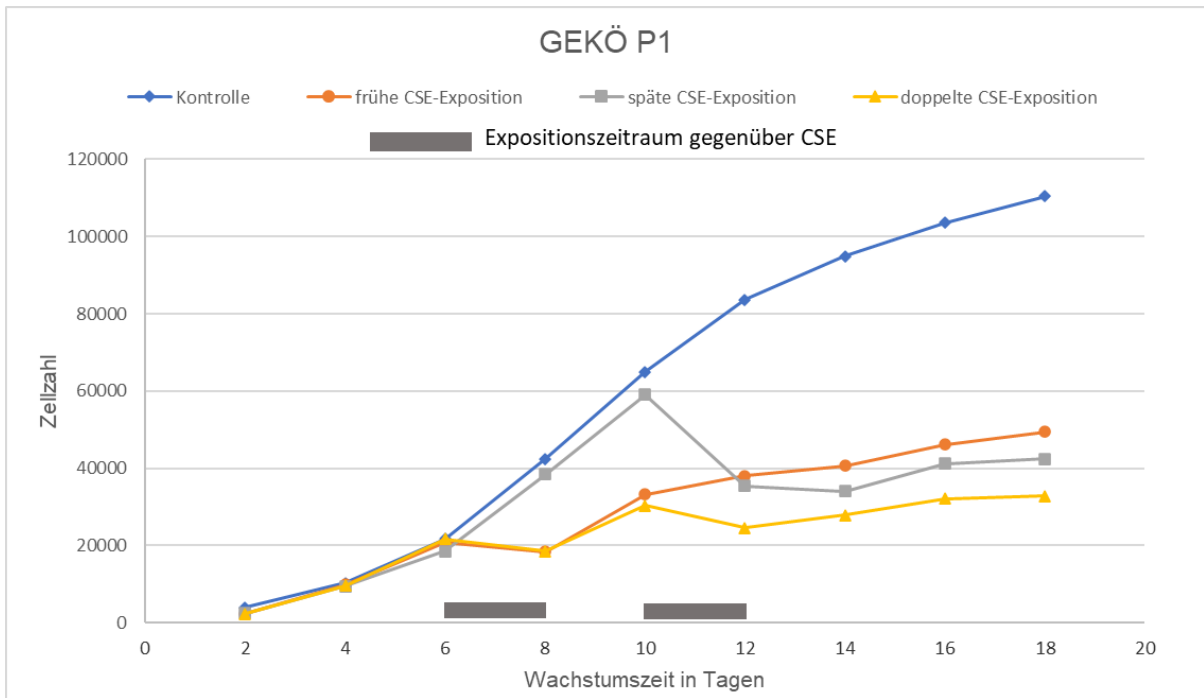




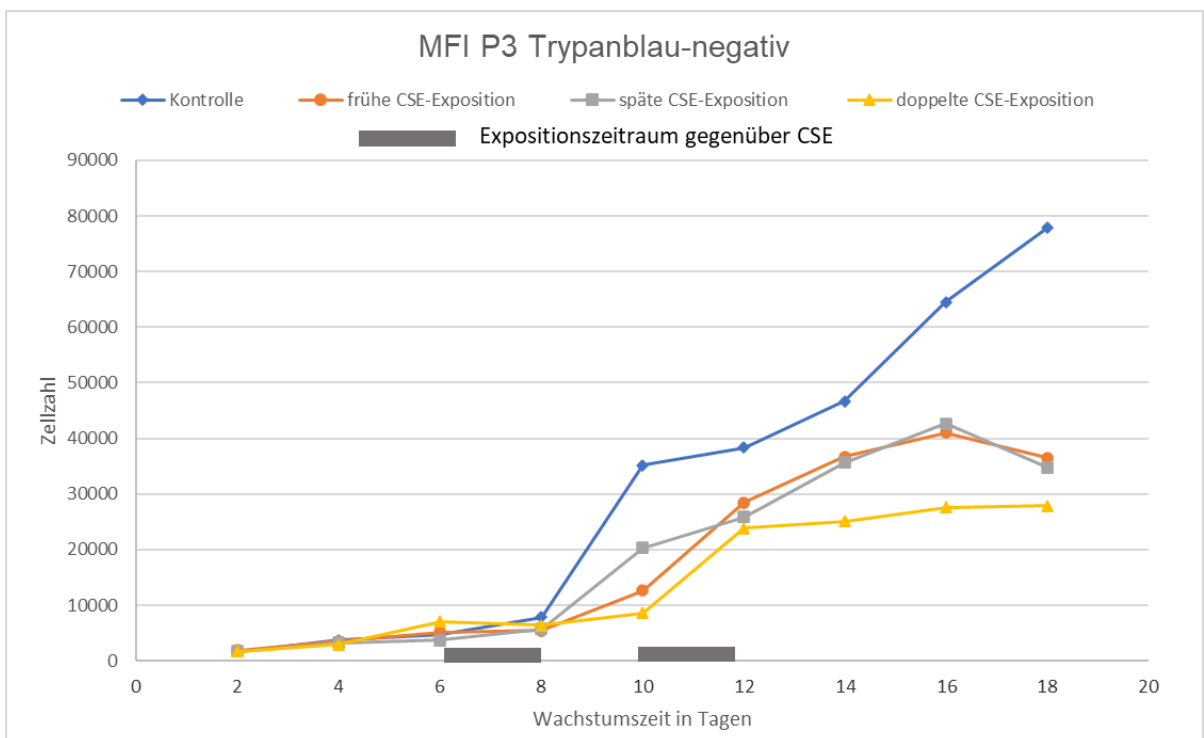
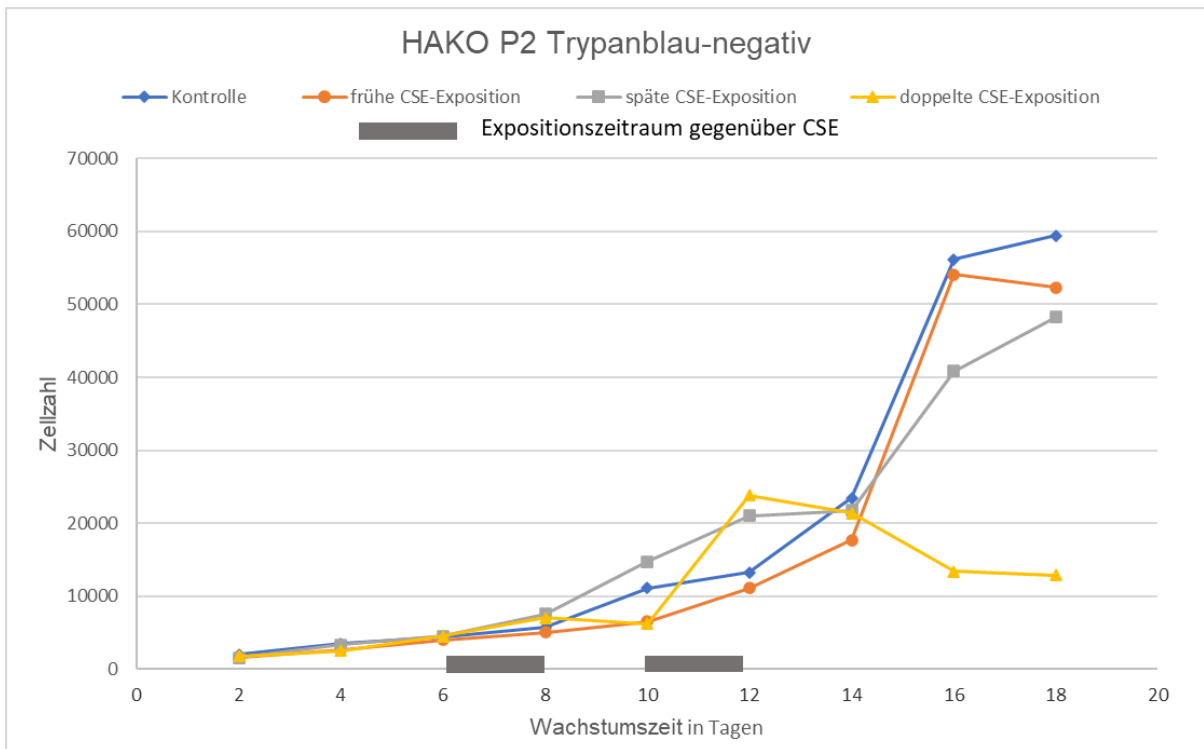


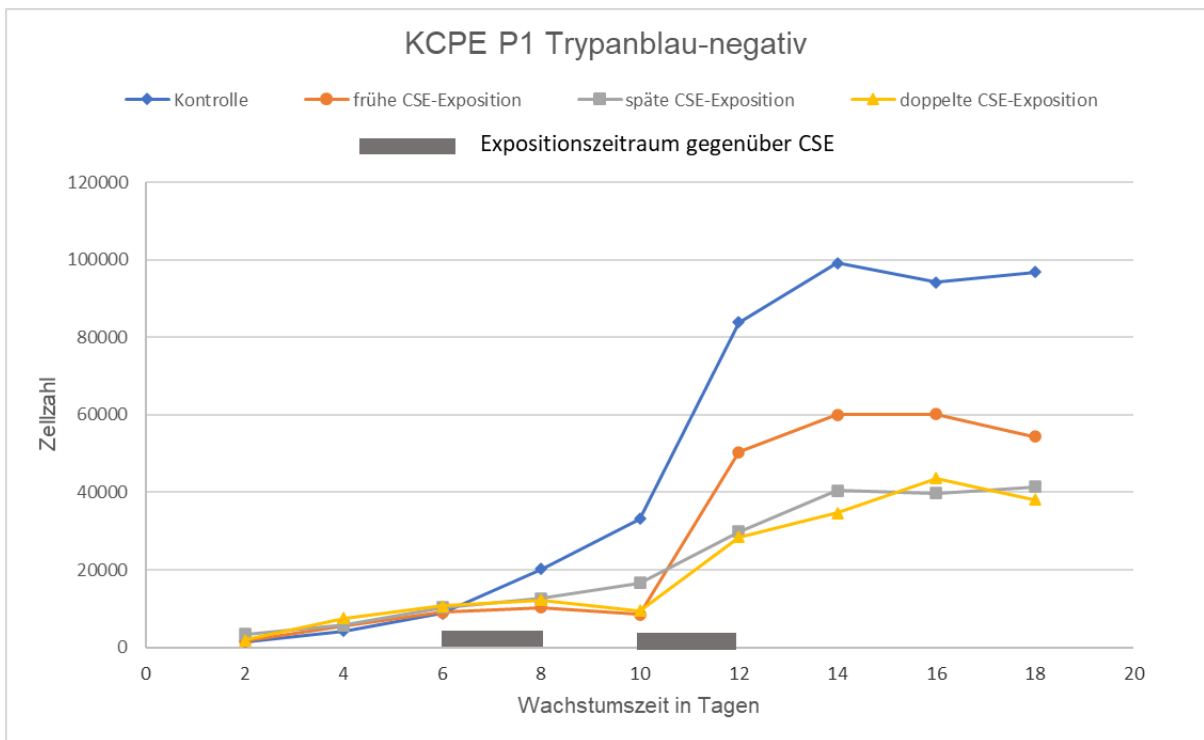
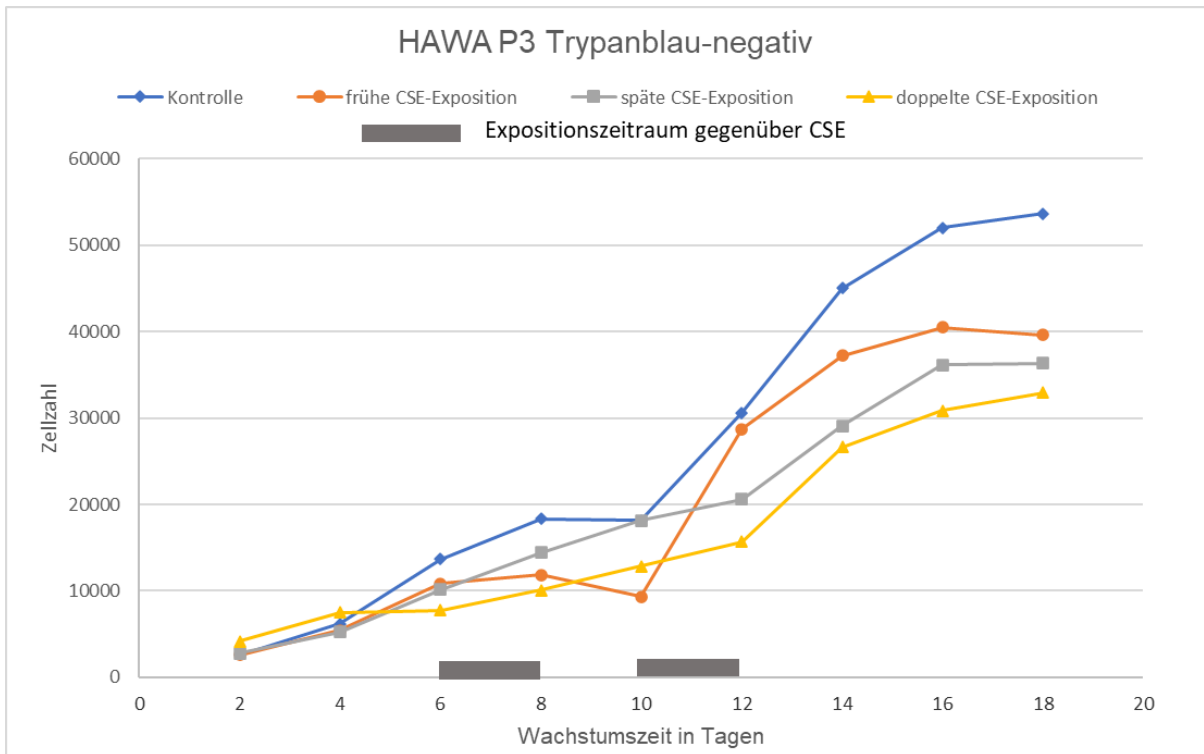


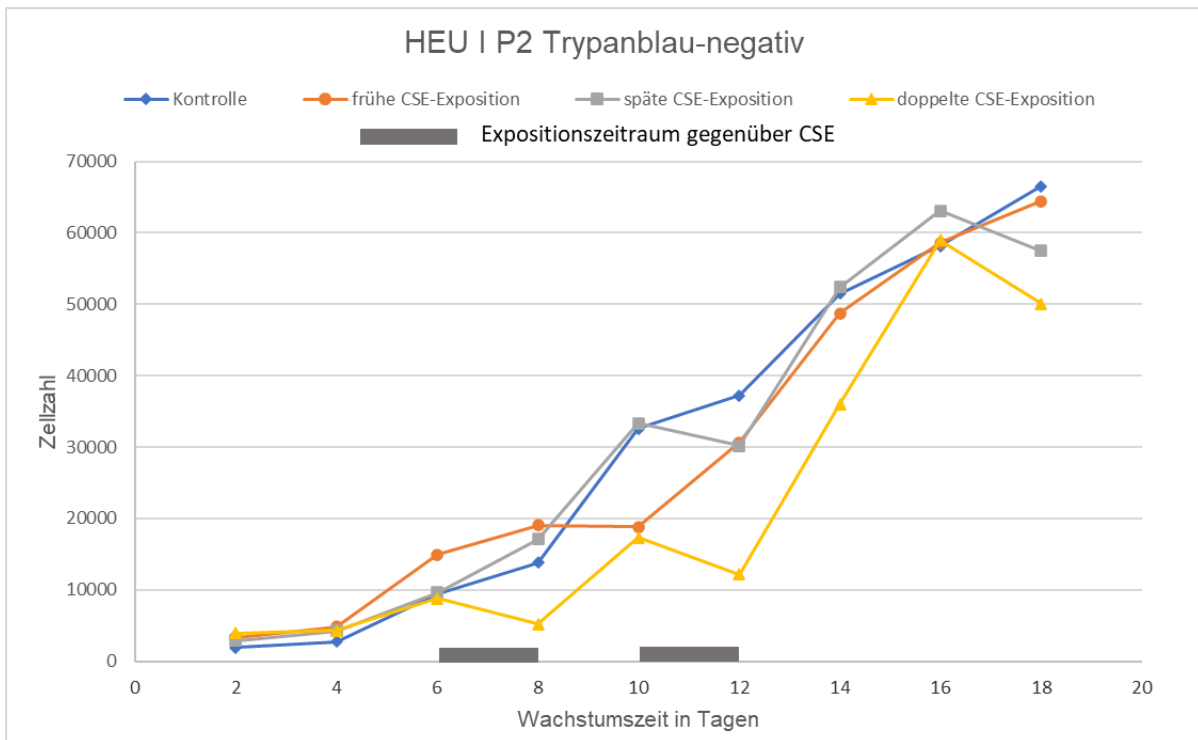
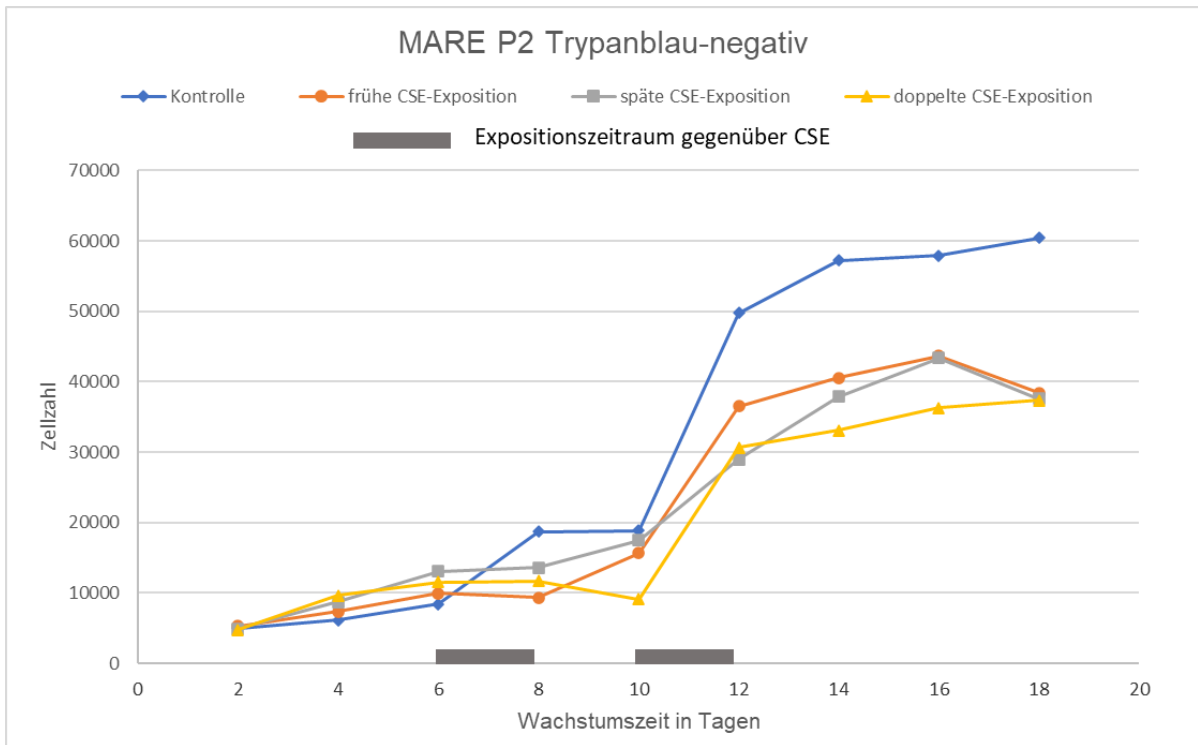


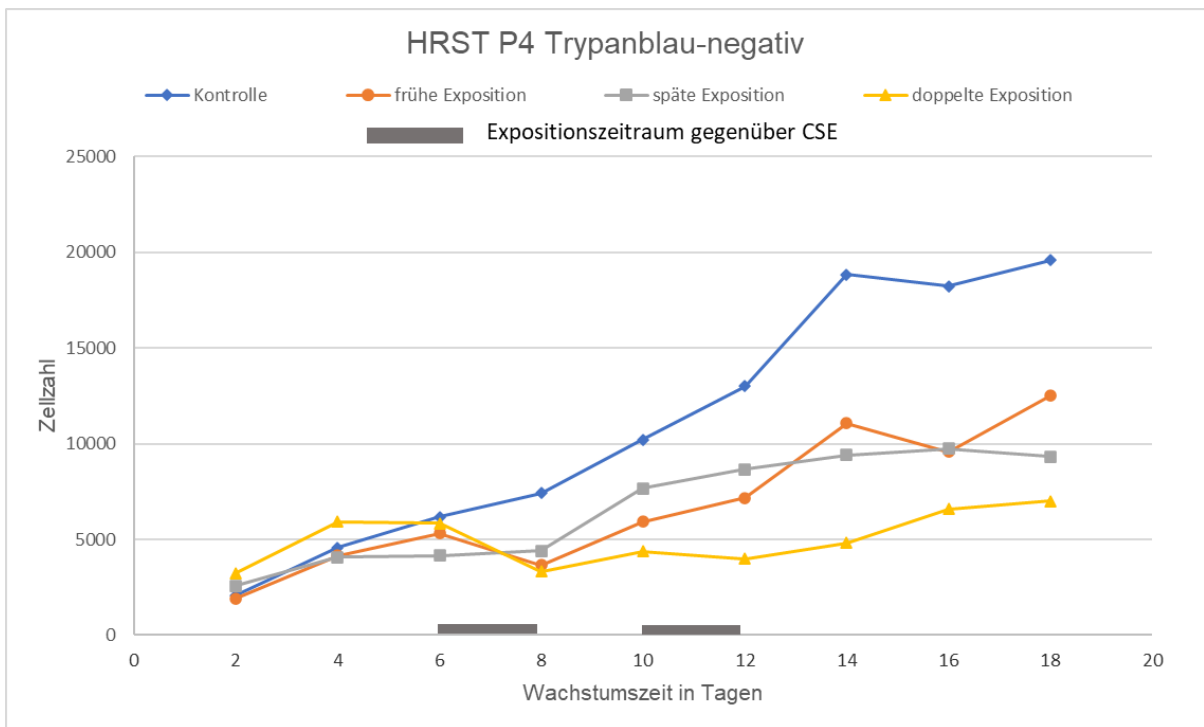
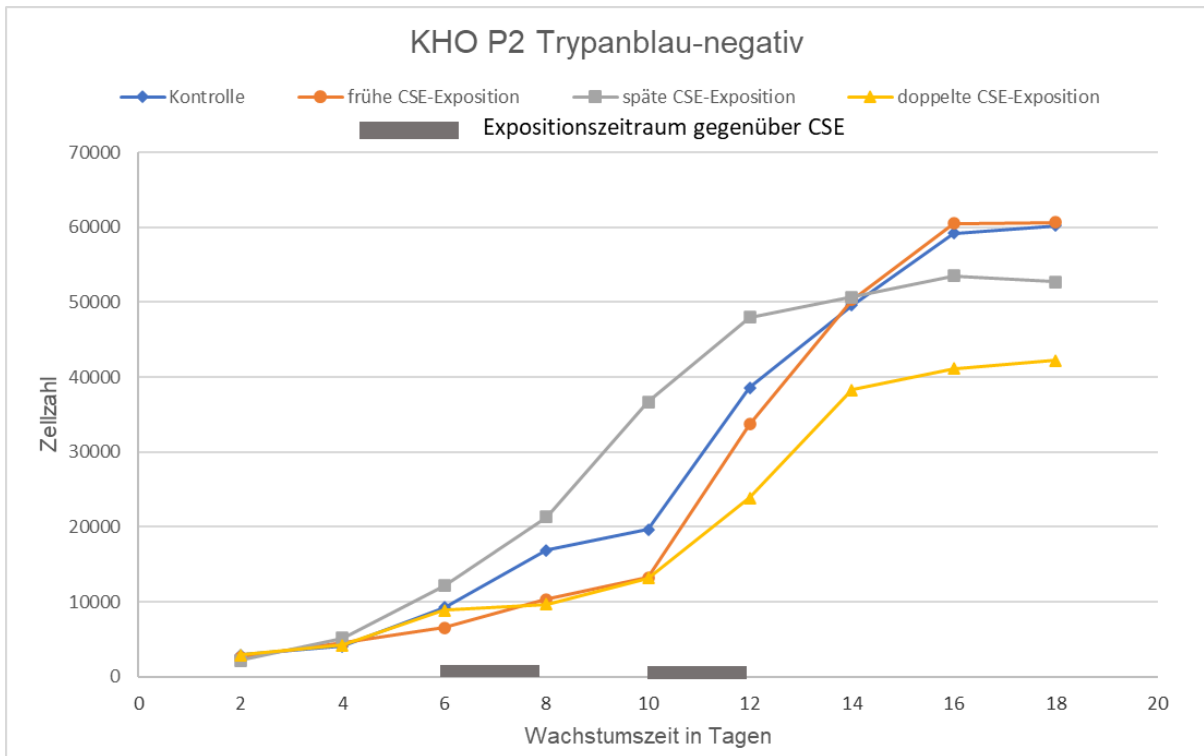


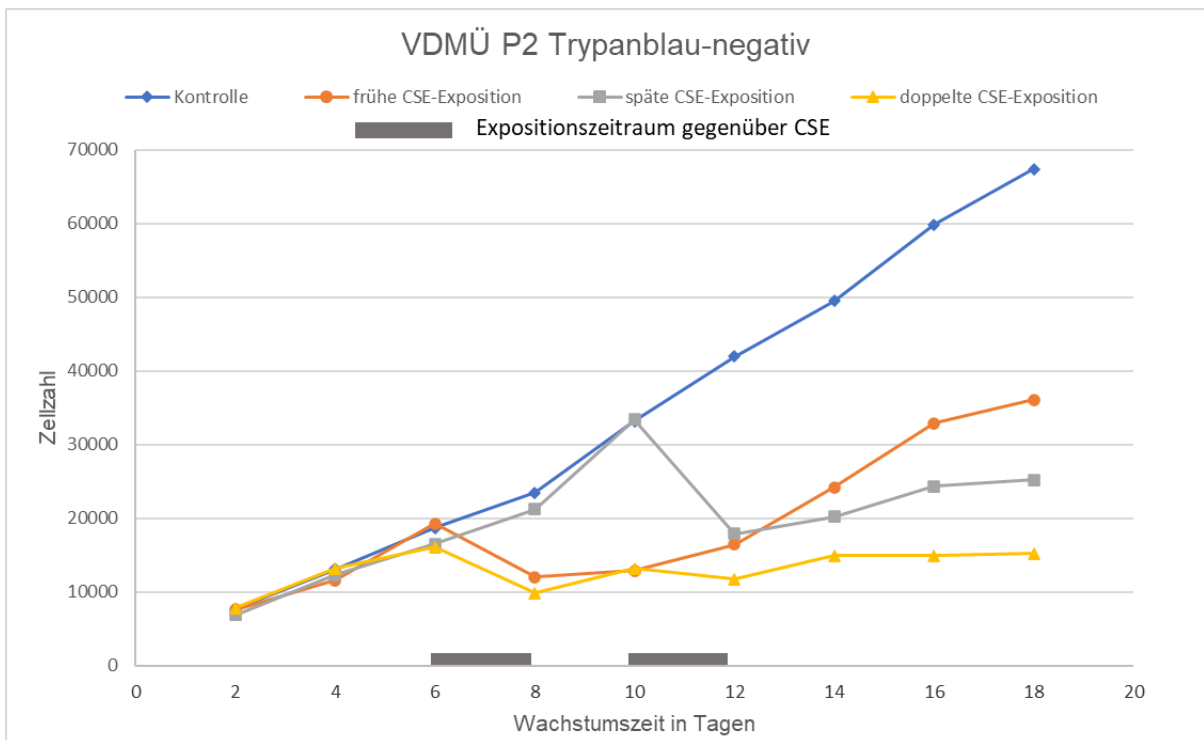
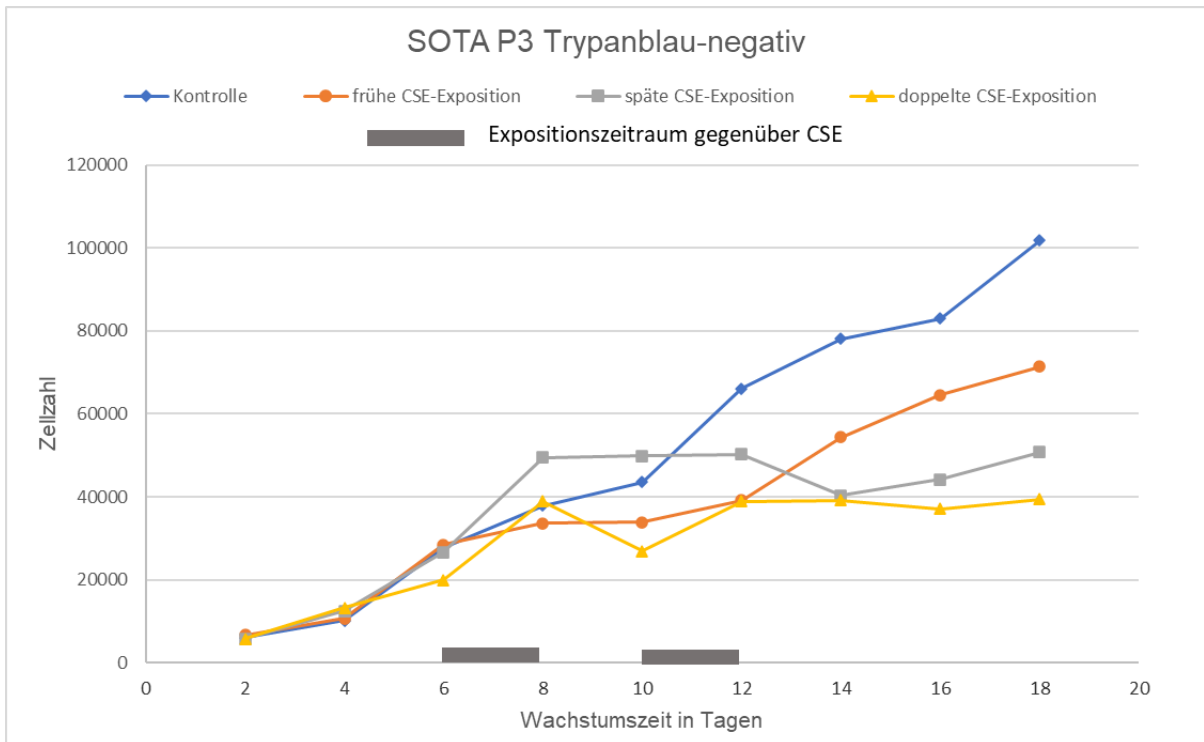
Trypanblau-negative Zellen

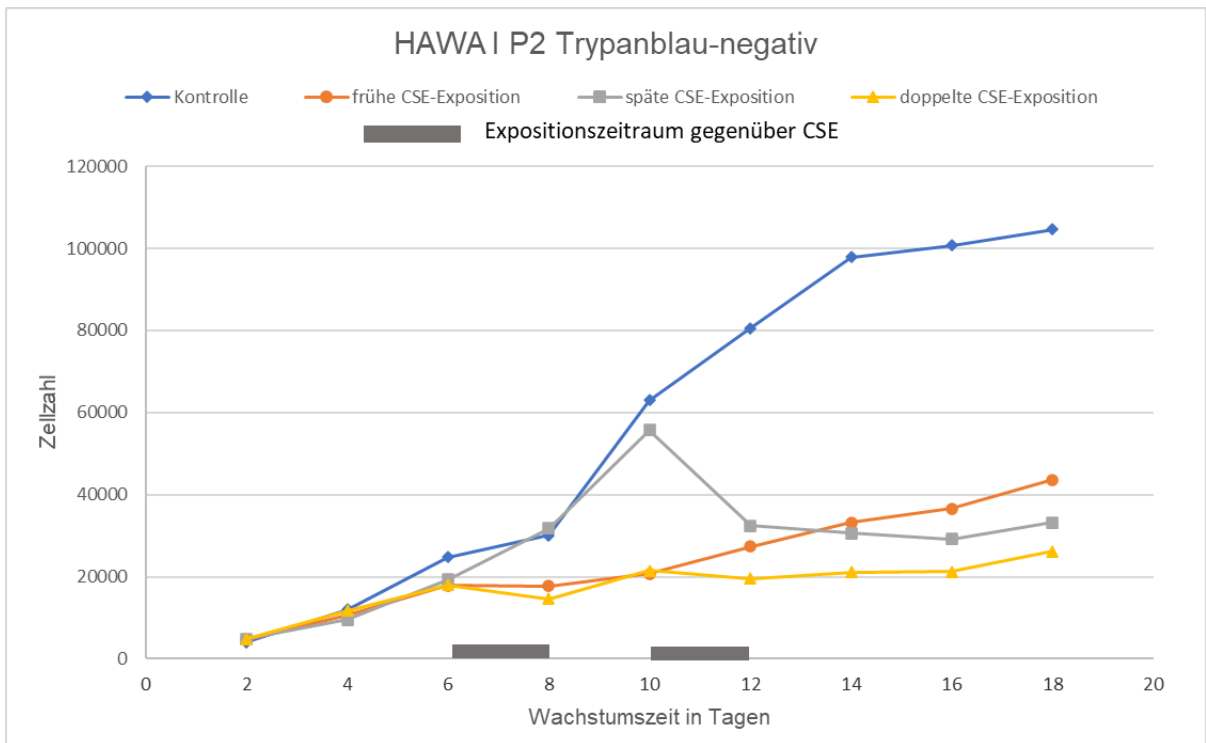
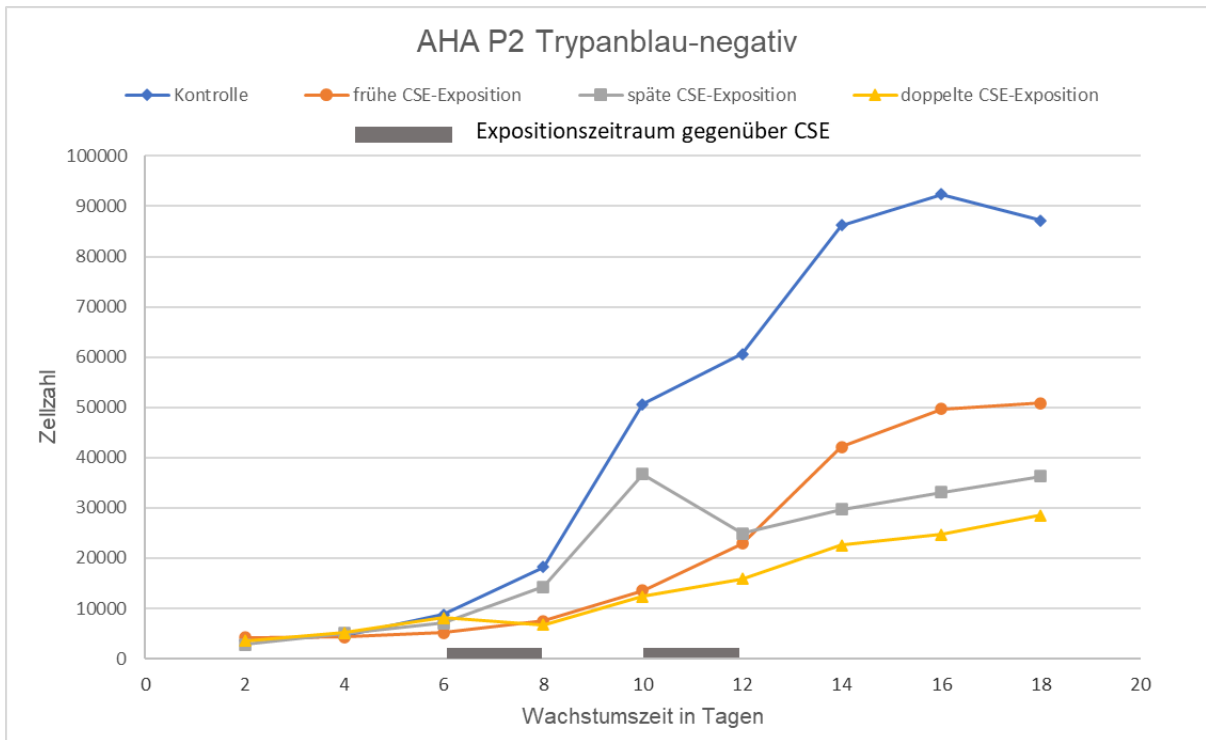


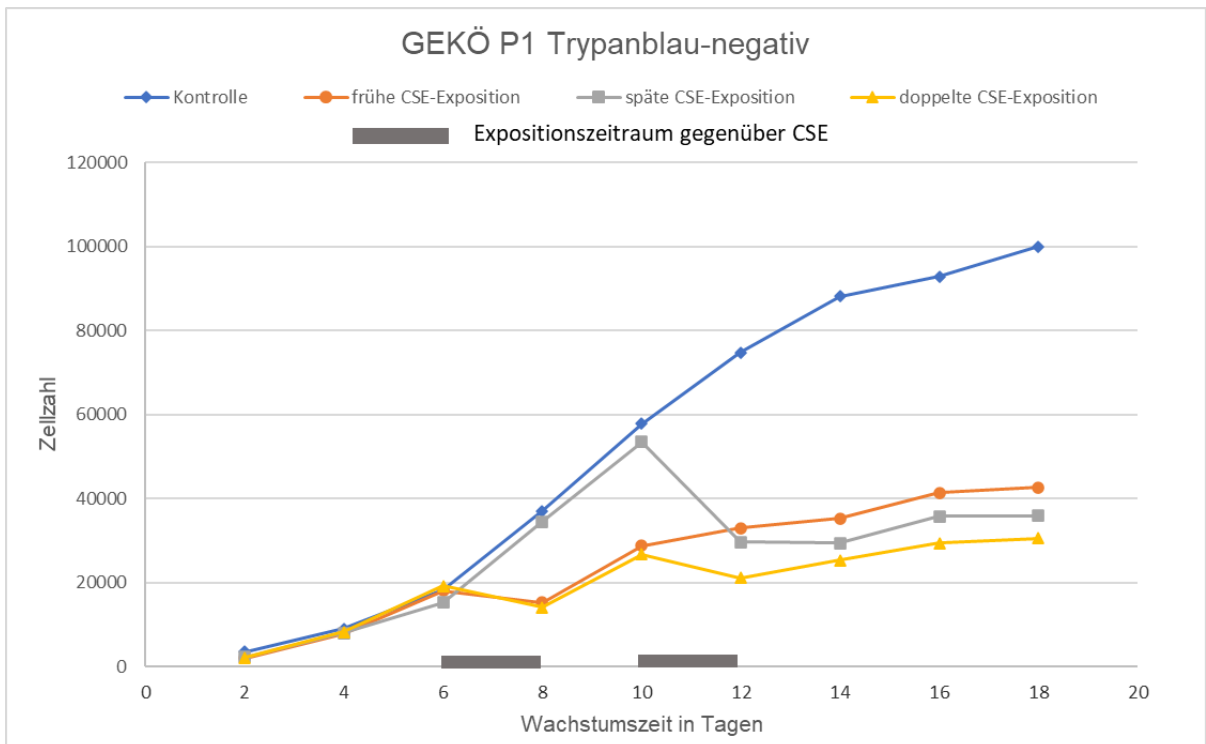
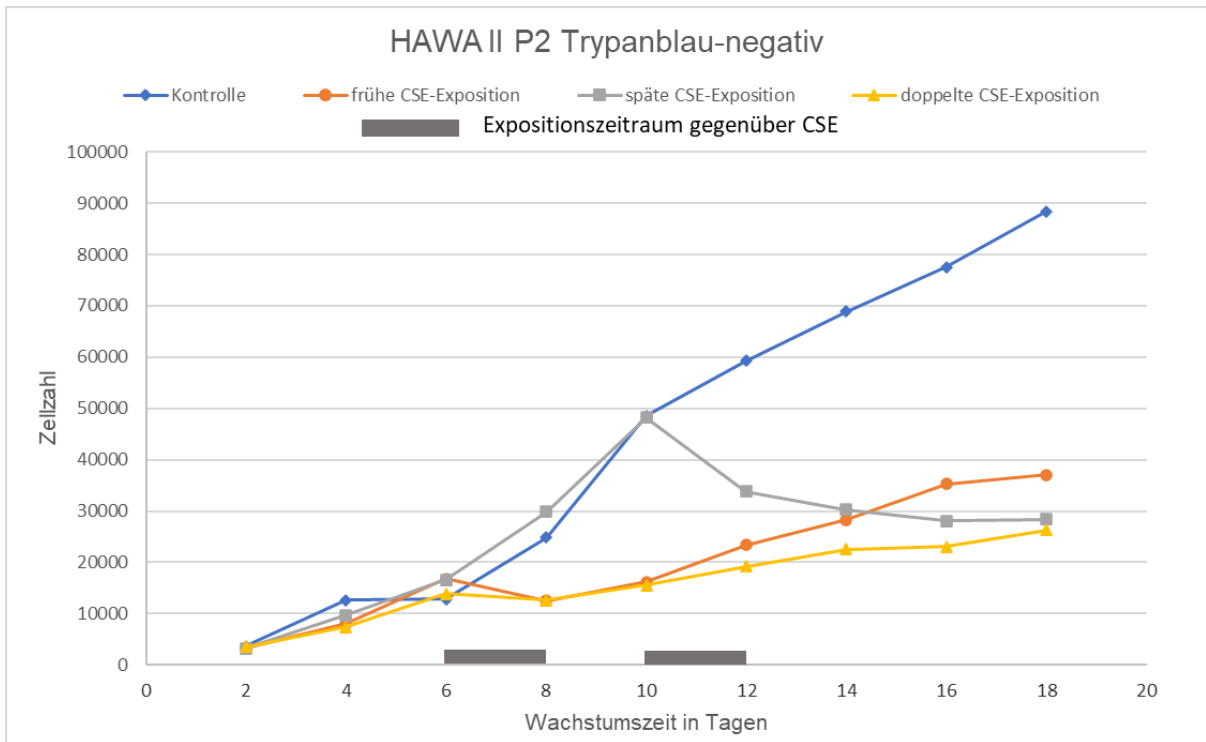


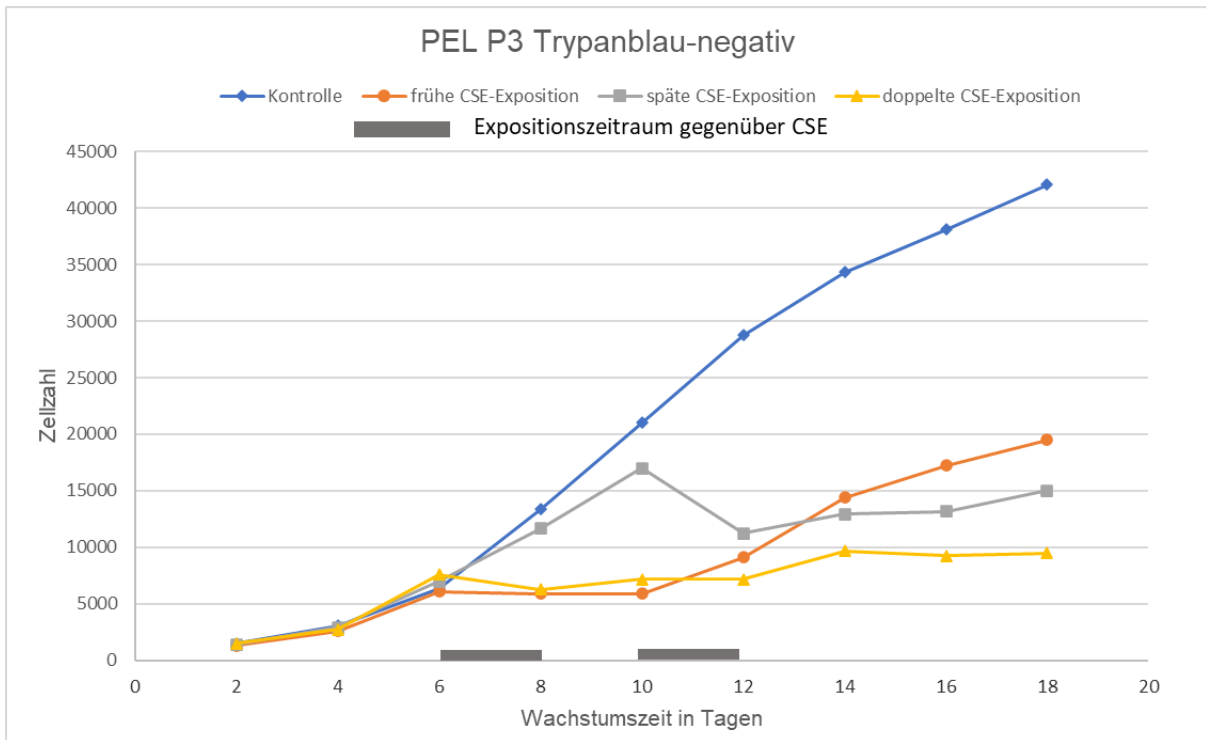




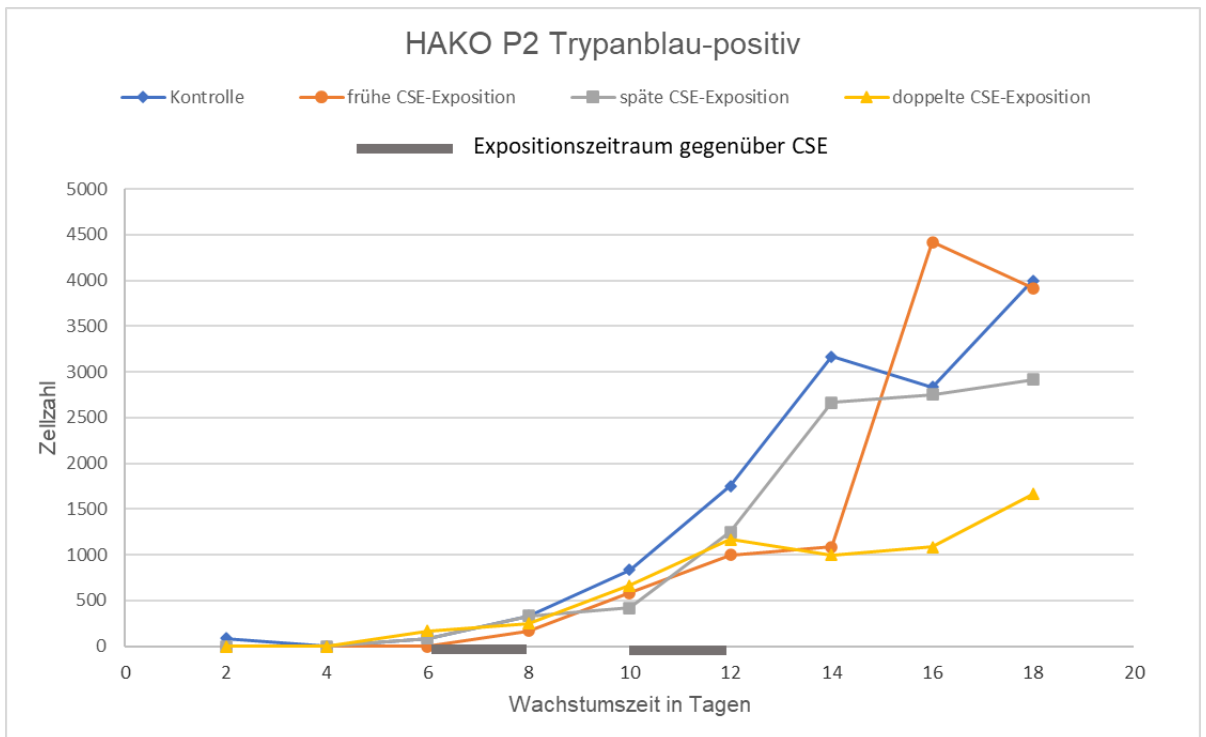


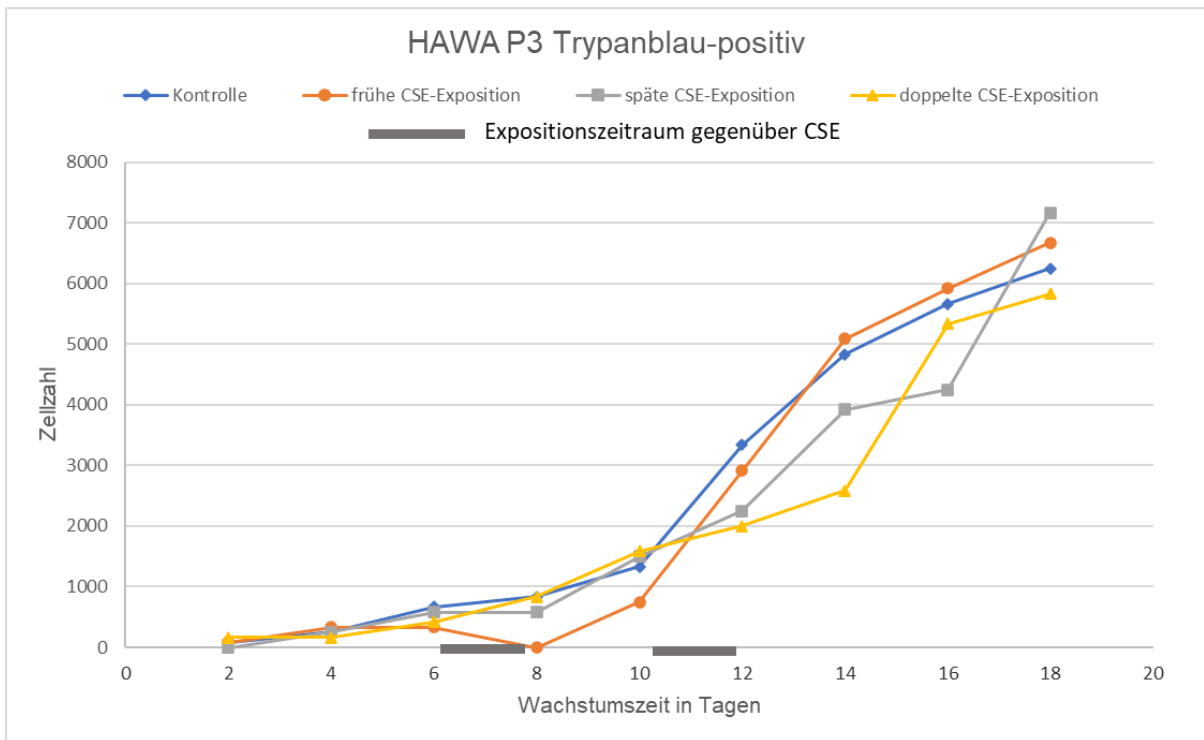
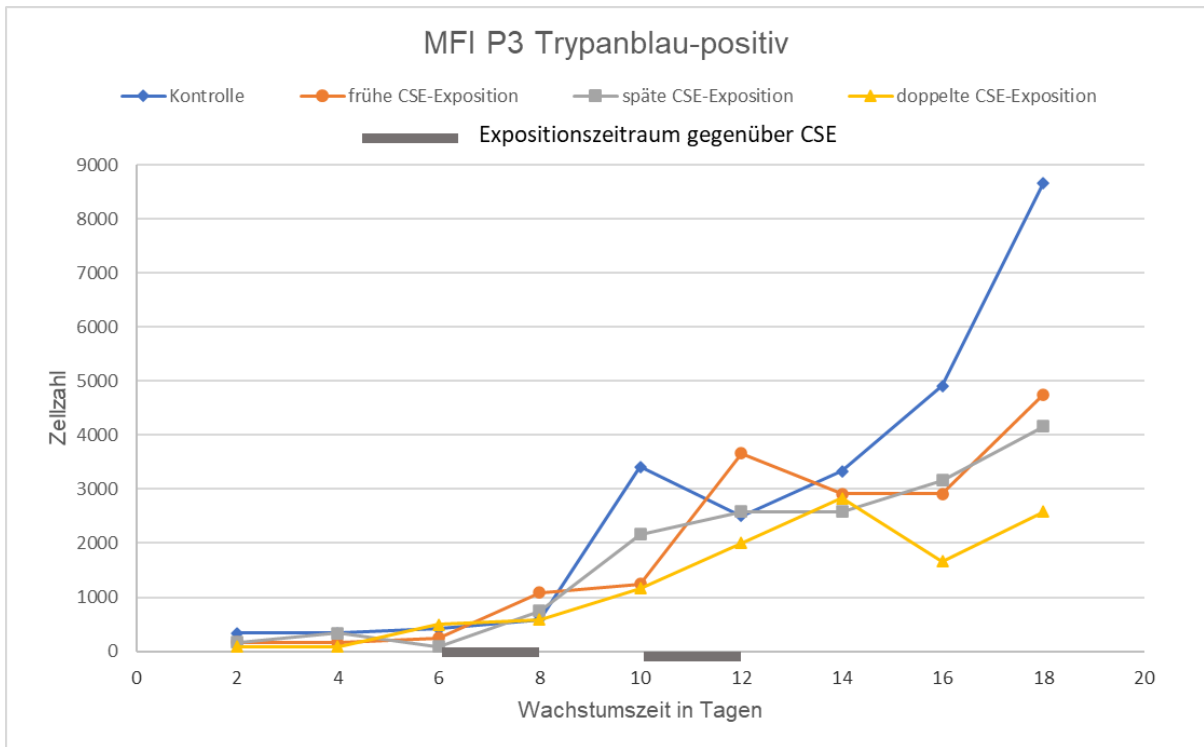


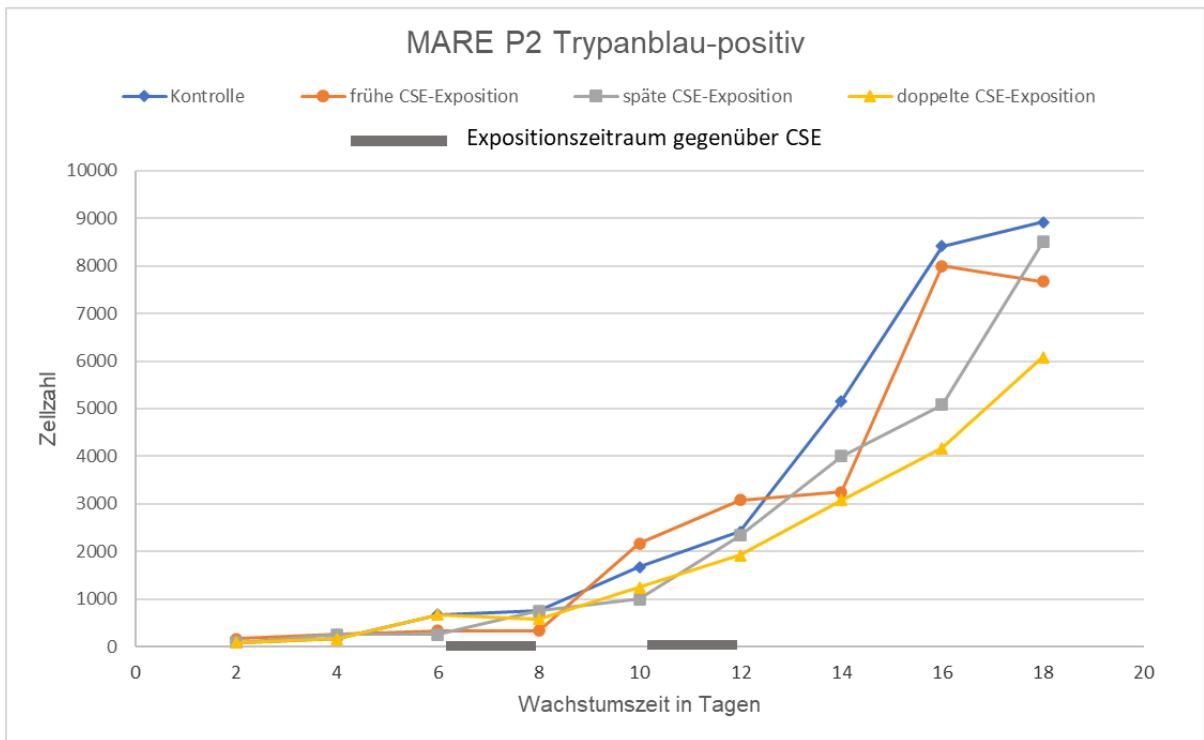
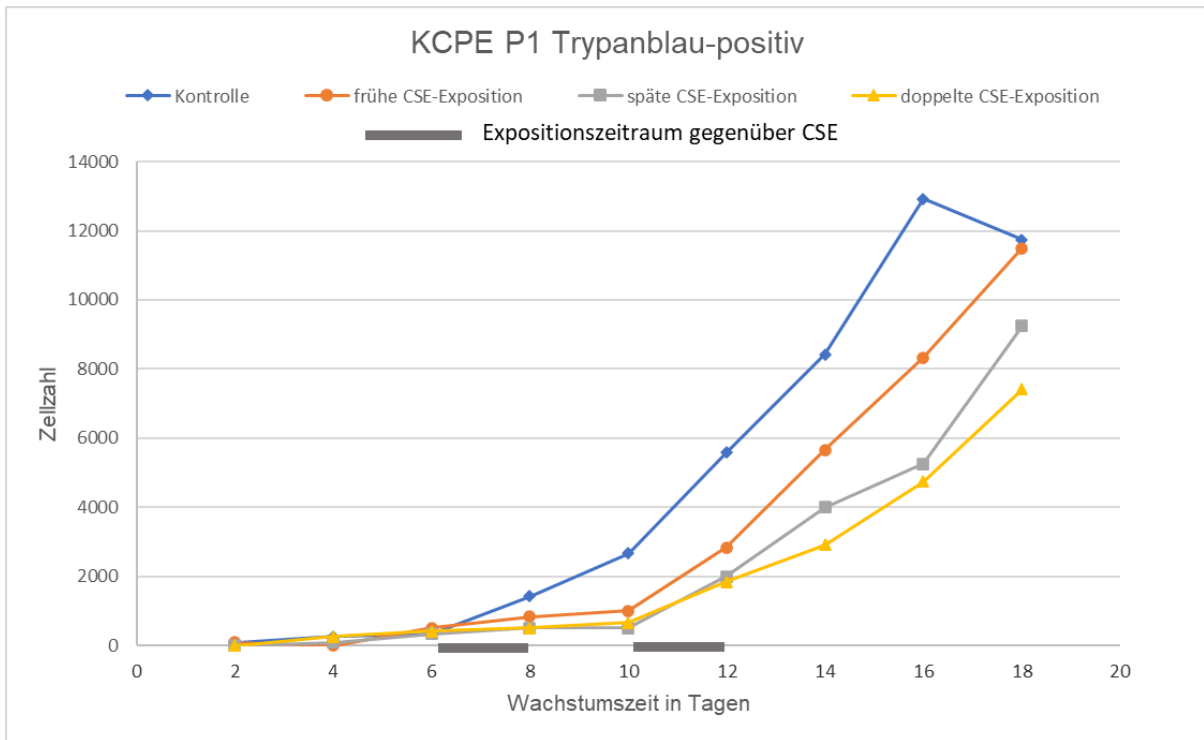


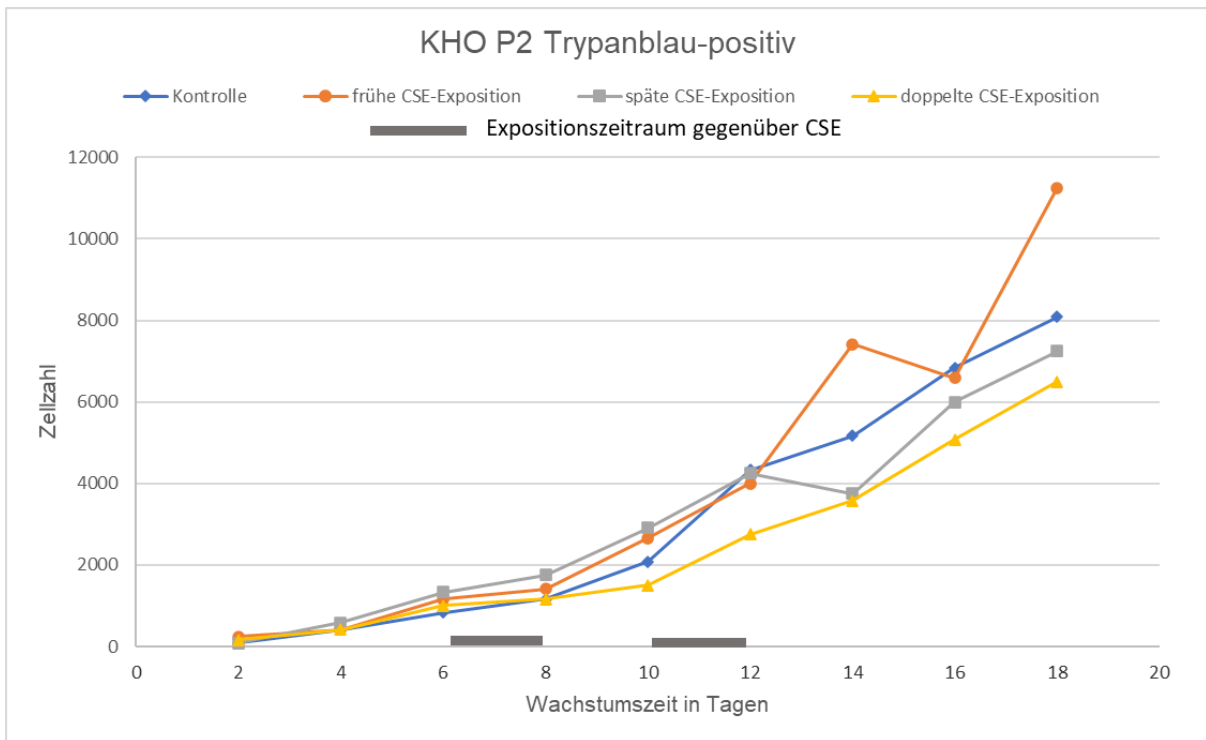
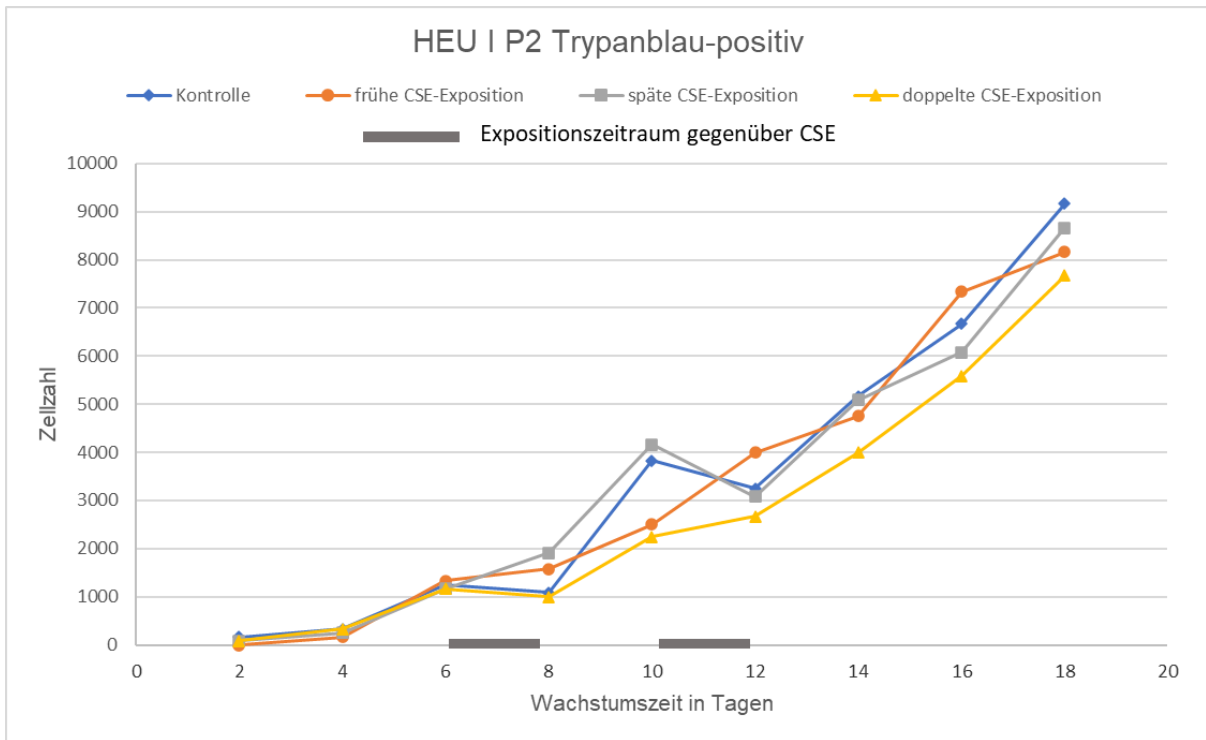


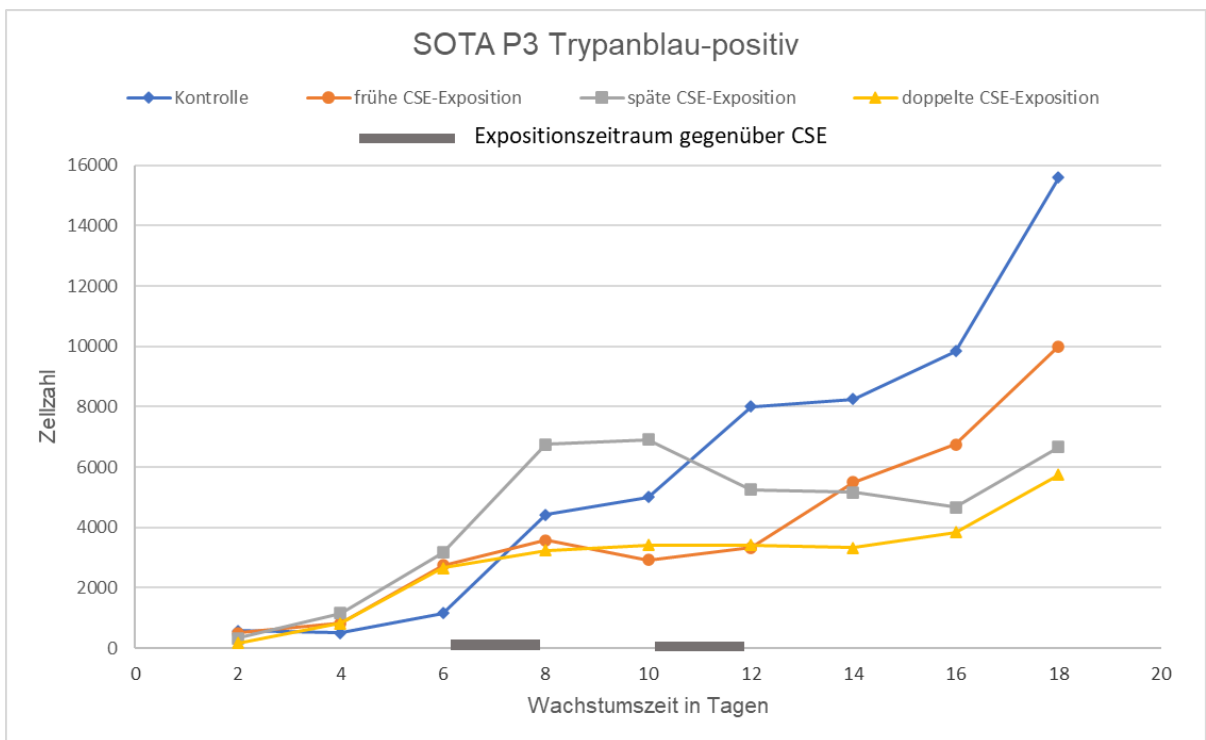
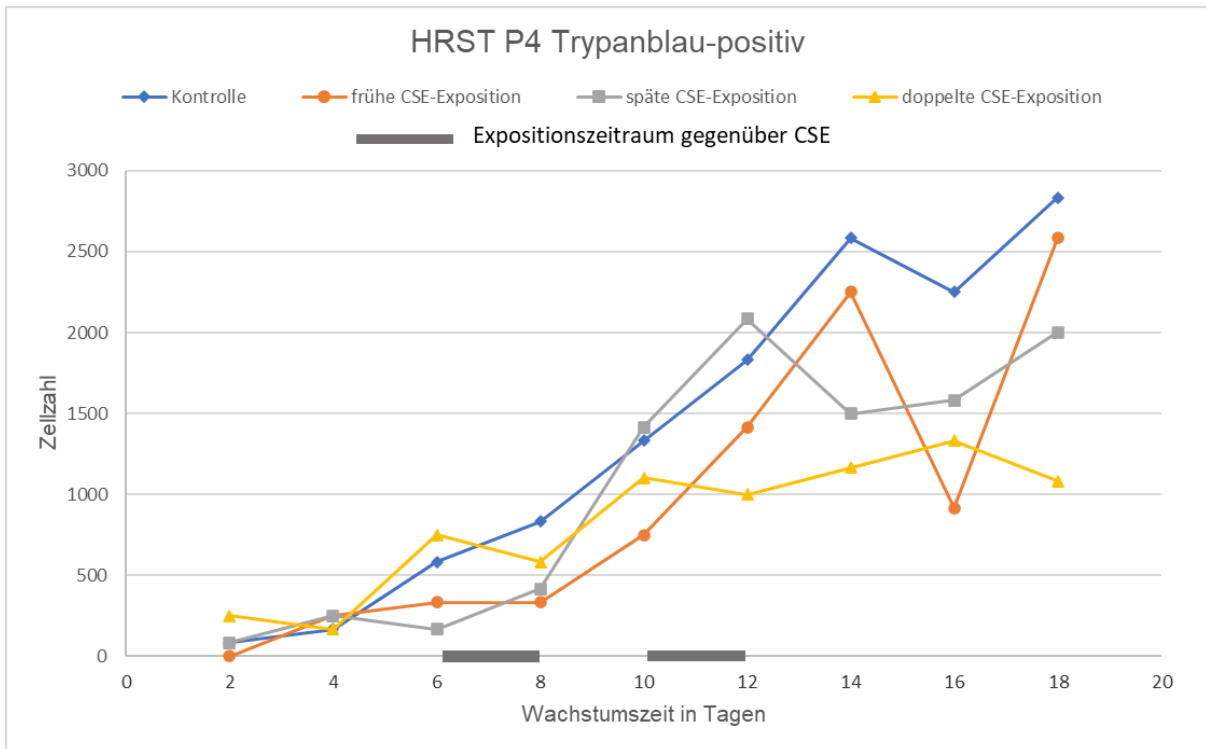
Trypanblau-positive Zellen

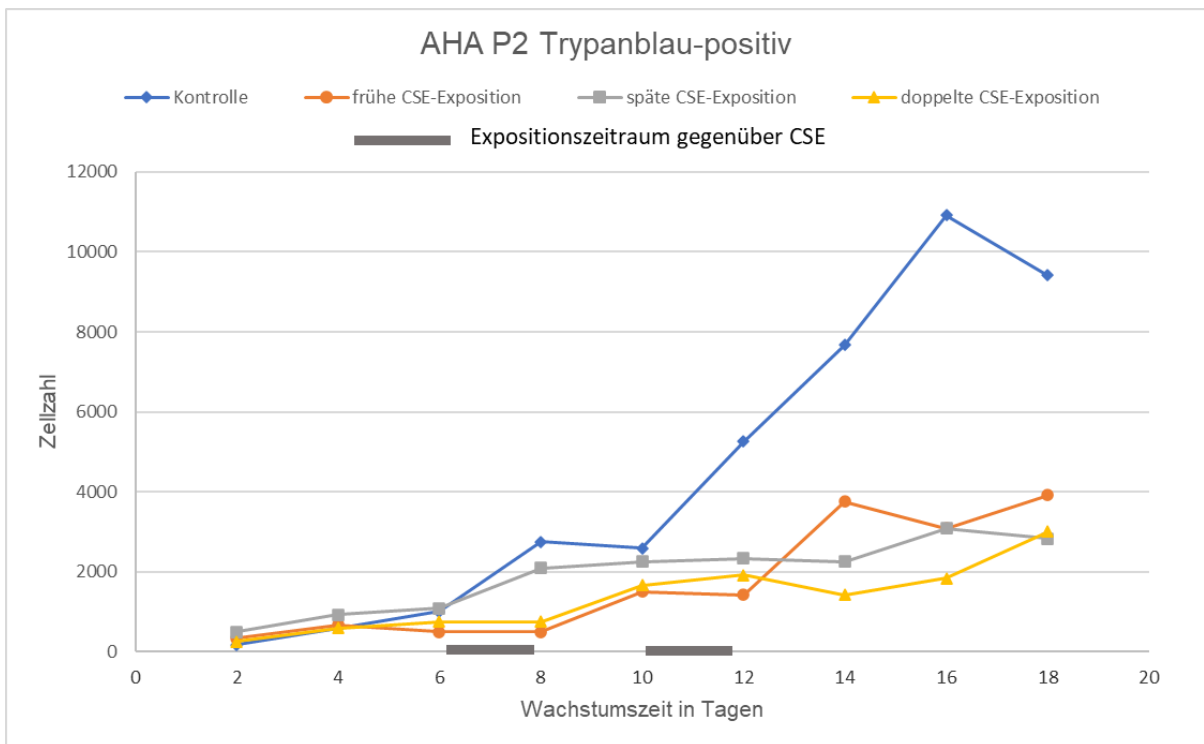
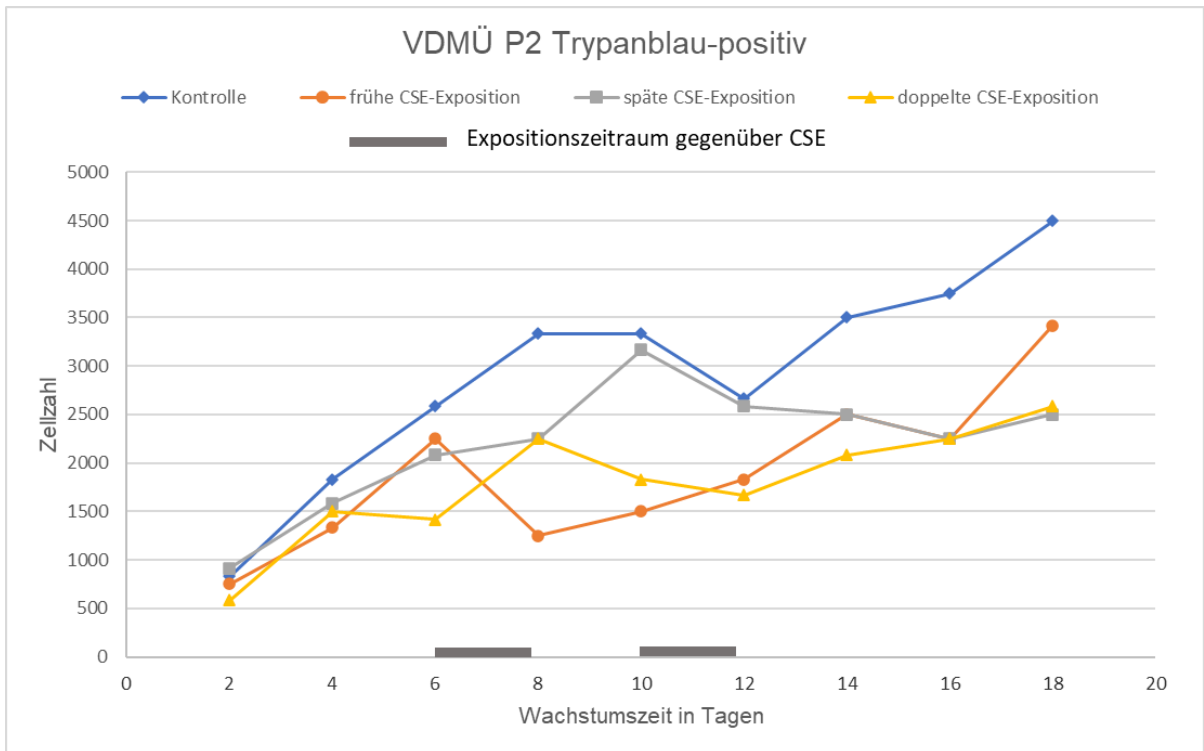


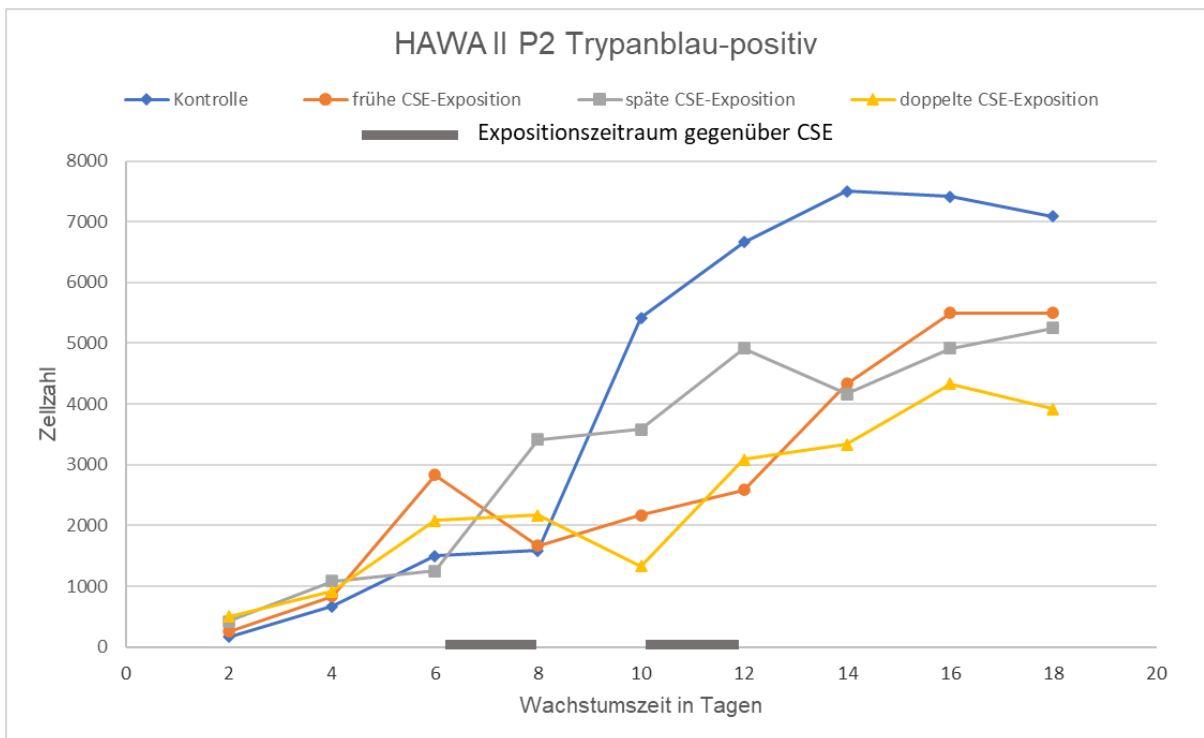
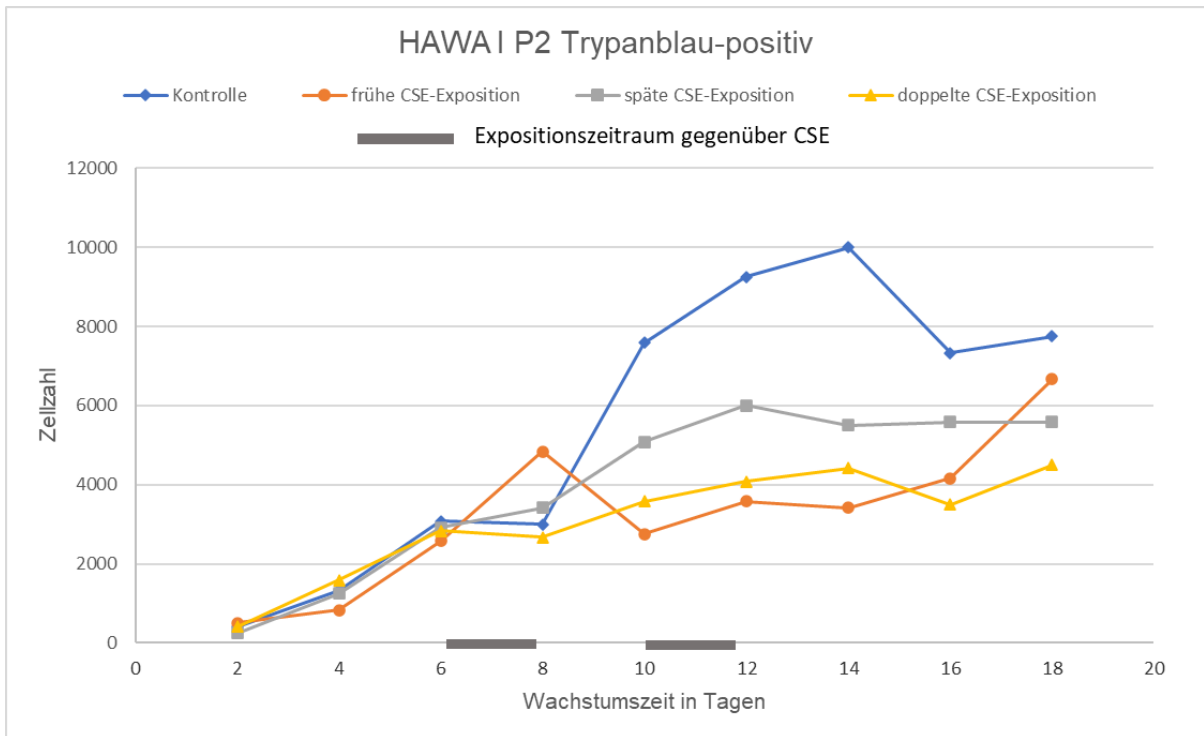


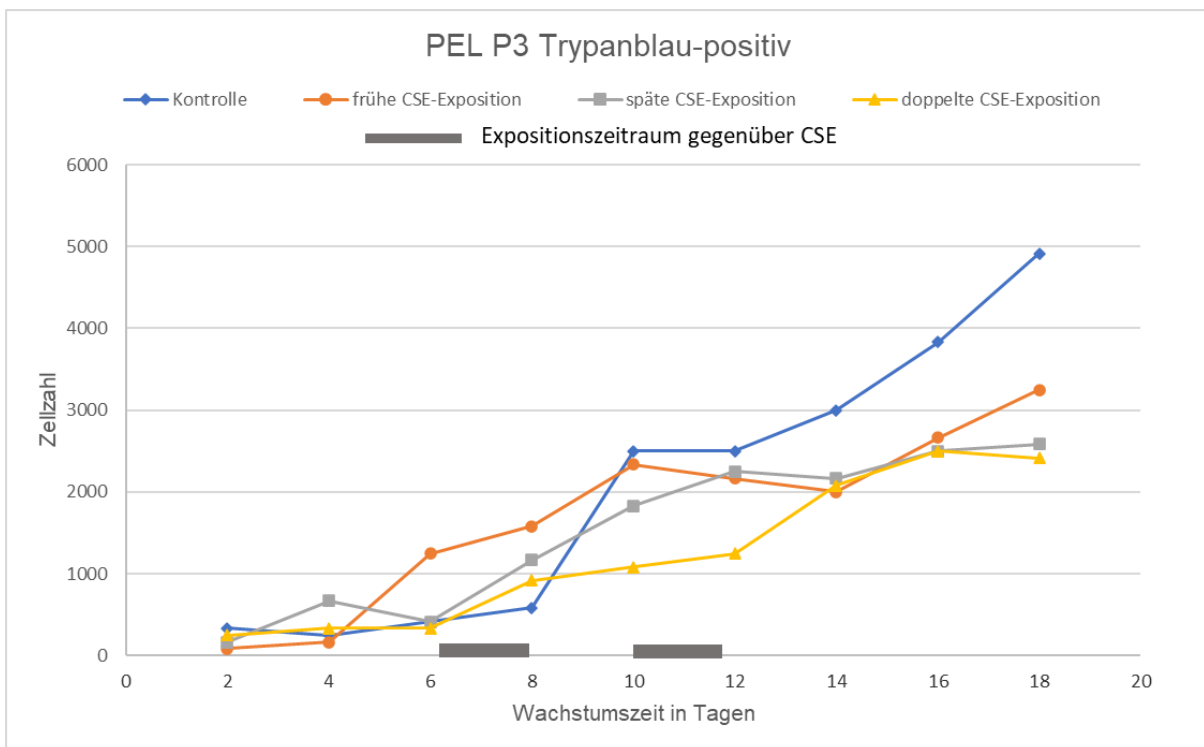
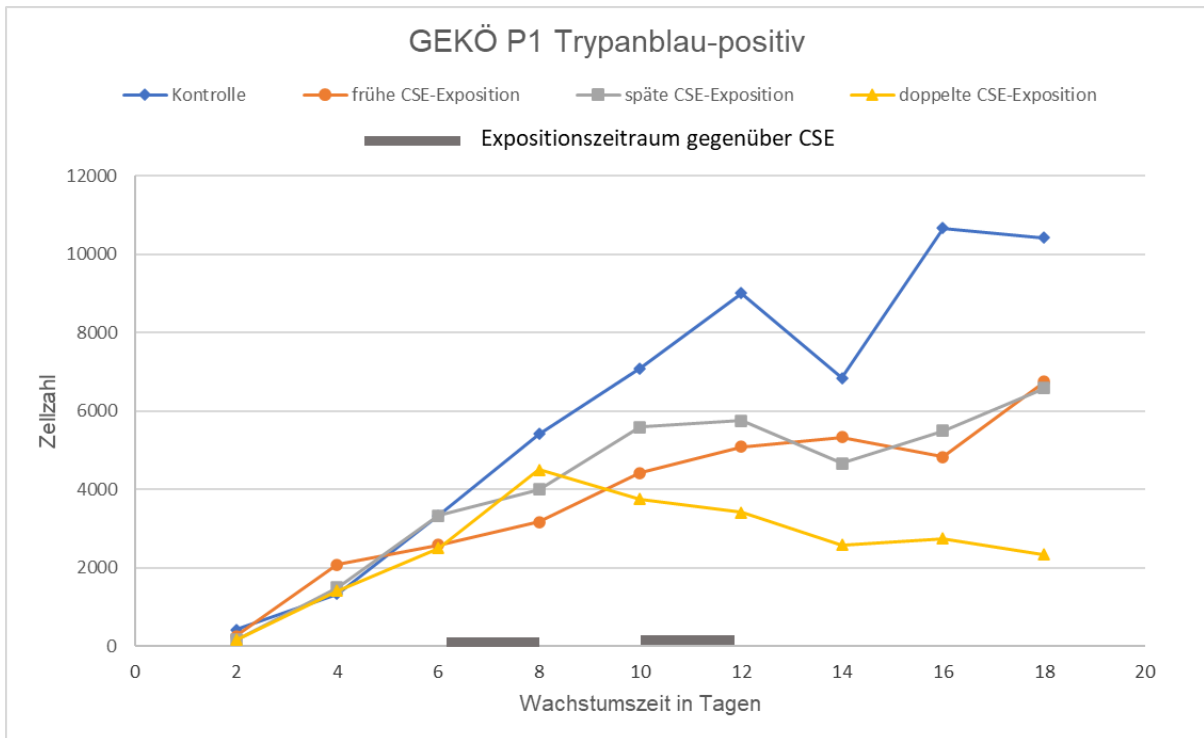












Anhang B

Material

Chemikalien

- Bacillol
- CSE (cigarette smoke extract, Zigarettenrauchextrakt)
- D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco 22320-030)
- DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma D2650)
- FCS (Fötale Kälberserum, Gibco 10270-106)
- Gentamicin (Gibco 15710-049)
- HBSS (Hanks' balanced salt solution, Gibco 14175-053)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (Gibco 15140-122)
- Sterillium (BODE Chemie GmbH)
- Trypanblau-Lösung (Fluka 93595)
- Trypsin-EDTA (Gibco 25300-054)

Geräte

- Brutschrank (BINDER CB210)
- Inverses Mikroskop (Axiovert 40 C, Carl Zeiss AG)
- Mikroskop Laborlux S (Leica)
- Sicherheitswerkbank (Laminair, Heraeus)
- Zentrifuge (Labofuge 400, Function Line, Heraeus)

Sonstige Materialien

- Autoklavierbare Pipetten (Nichiryo, 10-100µl / 100-1000µl)
- Kryoröhrchen (Roth)
- Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved)
- Pasteurpipette (Brand)

- Pipetten Eppendorf Research
- Pipettenspitzen mit Filter (Sarstedt)
- Röhren 15 ml und 50 ml (Sarstedt)
- Serologische Pipetten (Sarstedt)
- Sterile 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (VWR)
- Waschflasche (Impinger, DEHA Haan & Wittmer GmbH)
- Zellkulturflaschen (TC25, Sarstedt)
- Zellkulturplatten 24-Well (Sarstedt)
- Zigaretten (Gauloises blondes)



Institute and Outpatient Clinic for Occupational and Environmental Medicine, LMU Munich
Ziemssenstrasse 1 • 80336 Munich • Germany • <http://arbmed.klinikum.uni-muenchen.de>



Repeated exposure to cigarette smoke extract (CSE) in primary human lung fibroblasts - Effects on proliferation rate

Cannard E¹, Kronseder A¹, Welker L², Holz O², Watz H², Branscheid D², Magnussen H², Nowak D¹, Jörres RA¹

¹Institute and Outpatient Clinic for Occupational and Environmental Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich; ²Hospital Großhansdorf, Germany

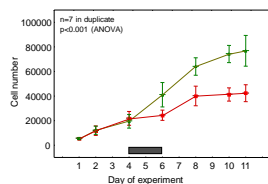


Figure 1: Effect of temporary exposure (2 days) to 5 % CSE (red line; grey bar) or control DMEM medium (green) on the proliferation of human lung fibroblasts (mean values and SEM of duplicate experiments with triplicate cell number determinations)

Artificial Smoker inhaling smoke into DMEM



Cell culture and exposures

- Primary human lung fibroblasts
- Subpleural samples from resectates
- Patients without marked COPD
- Explant cultures
- Passage 1-4
- DMEM culture medium, 10 % FCS
- 24-well plates
- Incubator settings 37°C, 5 % CO₂
- 1 cigarette in 5 min in 10 mL DMEM
- Exposures of cells with diluted solutions (2 %)

Figure 2: Experimental set-up for the production of cigarette smoke extract (CSE) (left) and conditions of cell culture (right)

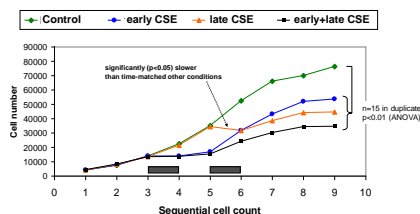


Figure 3: Effect of single („early“ and „late“) and double temporary exposure (2 days; grey bars) to 2 % CSE (red) or control DMEM medium on the proliferation rate of human lung fibroblasts (mean values of n=15 experiments in duplicate with triplicate cell number determinations)

Background

- Single temporary exposure to cigarette smoke extract (CSE) can induce a persistent reduction of proliferation rate or capacity in human lung fibroblasts as well as induce signs of cellular senescence (Uhlmann et al. ERS 2005; Fig. 1).
- As fibroblasts of senescent phenotype have been found in lung emphysema (Holz et al., ERJ 2004;24:575-9; Müller et al., Respir Res 2006;7:32), cellular senescence induced by smoking could be one factor in the development and progression of this disease.
- The model of experimental CSE exposure could allow to determine the susceptibility of lung fibroblasts to CSE under different exposure modalities.

Aim of the study

- We investigated whether repeated vs single exposure to CSE has different effects on cell proliferation and whether the effect depends on the time of exposure.

Methods

Cultures

- Using explant cultures from subpleural samples of lung resectates from smokers without clinically significant COPD, fibroblasts were grown. Growth conditions were similar to those used previously (ERJ 2004;24:575-9). Experiments were performed under standard incubator settings (37°C, 5 % CO₂), using duplicate subconfluent cultures in 24-well plates, DMEM culture medium (10 % FCS) and cells from different donors.

Exposures

- Cigarette smoke extract (CSE, 100 %) was generated under standardized conditions by bubbling mainstream cigarette smoke through DMEM (1 cigarette per 10 mL in 5 min) (Fig. 2).
- During quasi-linear growth, cells were exposed two times (early and late) to 2 % CSE or DMEM (control) for 2 days, with an interval of 2 days in between. Experiments were performed in duplicate for each donor cell line and cell number was monitored over time.

Results

- Early, late and 2x exposure to CSE led to a significant reduction in final cell numbers which were 63, 52 and 40 %, respectively, of control (n=15 and p<0.01 each, ANOVA; Fig. 3).
- 2x exposure to CSE had a greater effect than the single exposure (p<0.05) indicating that cells did not become protected by the single early exposure.
- When expressing proliferation rate as the factor of increase as observed at the time after the second exposure, the single late exposure showed factor 1.33, which was different (p<0.05) from the time-matched factors after early, 2x and control exposure (3.15, 2.32 and 2.51, respectively).

Conclusion

- The data indicate that the effect of a single temporary exposure to CSE on the proliferation rate of primary human lung fibroblasts is stronger, if exposure occurs at a later stage of culture.
- Furthermore, a single early exposure does not prevent the effect of a second exposure.
- Assuming an inverse relationship between proliferation and anti-oxidative cellular defense and its priming by the first exposure, this pattern appears to speak against purely oxidative damage exerted by CSE.

Supported by a grant from the Friedrich-Baur-Stiftung, Munich

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. rer. nat. R. A. Jörres für seine unermüdliche Unterstützung bedanken. Mit viel Fachwissen und unendlicher Geduld stand er mir zur Seite und hat diese Arbeit somit erst möglich gemacht.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Nowak für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit am Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchzuführen.

Mein weiterer Dank geht an Frau Angelika Kronseder, die mich bei der Durchführung der Versuche und auch nach Abschluss der Arbeiten im Labor unterstützt hat.

Des Weiteren danke ich meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben. Schließlich möchte ich meinem Freund Markus für seine Unterstützung danken.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Cannard, Emilie Cécile

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Wirkung wiederholter Exposition gegenüber Zigarettenrauchextrakt auf die Proliferation menschlicher Lungenfibroblasten

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, den 06.05.2024

Emilie Cécile Cannard

Publikationsliste

- 09.2006 Poster beim European Respiratory Society Annual Congress 2006