

Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abteilung für Umweltpathologie
ehemaliger Leiter: Prof. Dr. med. J. Friemann

**Morphometrische Untersuchungen von Rattenlungen nach Ein-
wirkung von Quarz mit und ohne Polyvinylpyridin-N-Oxid
(PVNO) Behandlung**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Gabriele Isensee
aus Köln (Geburtsort)

Abstract

Isensee

Gabriele

Morphometrische Untersuchungen von Rattenlungen nach Einwirkung von Quarz mit und ohne Polyvinylpyridin-N-Oxid (PVNO) Behandlung

Eine hochdosierte Quarzstaubapplikation führt bei Ratten regelmäßig über eine Alveolarproteinose in Kombination mit einer Zunahme der Pneumozytenproliferationsrate und chronischer Cholesterinpneumonie mit interstitieller Fibrose zu einem progredienten Lungenumbau mit bronchiolo-alveolärer Epithelhyperplasie (bzw. adenomatöser Hyperplasie der terminalen Bronchiolen), die als präneoplastische Läsion anerkannt ist.

Die morphometrischen Untersuchungen in der Arbeit wurden an Schnittpräparaten von insgesamt 30 Rattenlungen durchgeführt, die im Rahmen eines mehr als 27 Monate dauernden Langzeitversuchs der Abteilung für experimentelle Hygiene des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf intratracheal mit 15x3mg Min-U-Sil-Quarz belastet worden waren. Jeweils die Hälfte der Versuchstiere erhielt zusätzlich subcutan 7x2mg einer 2%igen PVNO-Lösung als quarzprotektive Substanz. Die Versuchstiere wiesen nach der Behandlung eine Überlebenszeit von 66 bis 129 Wochen auf: Als Kontrollgruppe wurden die Lungen von 10 NaCl-behandelten Wistar-Ratten morphometriert. Es sollte geklärt werden, ob die quarzstaubinduzierte interstitielle Lungenfibrose ähnlich wie beim Menschen auch im Tierexperiment mit potentiellen Tumorstufen räumlich assoziiert ist und die infolge PVNO-Behandlung reduzierte interstitielle Lungenfibrose mit einer Verminderung der präneoplastischen Epithelveränderung einhergeht.

Die Untersuchungen zeigten, daß die Entwicklung adenomatös-hyperplastischer Lungenareale und die Ausdehnung silikotischer Narben bei der Ratte nicht signifikant korrelieren und damit im Tierexperiment kein morphologisches Korrelat zum sogenannten silikotischen Narbenkarzinom besteht, welches bei der versicherungsmedizinischen Begutachtungspraxis in der Humanpathologie eine große Rolle spielt. Die bronchiolo-alveoläre Hyperplasie ist in der mit PVNO behandelten Versuchstiergruppe zwar – wenn auch nicht signifikant – in geringerer Ausprägung vorhanden als in der unbehandelten Gruppe. Dieser protektive PVNO-Effekt auf die Epithelzellen der bronchiolo-alveolären Endstrecke reicht aber offensichtlich bei diesem Versuchsansatz nicht aus, die Entstehung von Tumoren zu reduzieren, was sich aus der

Analyse der Lungentumorstatistik der in der oben beschriebenen Weise behandelten Versuchstiere im genannten Zeitraum ergibt.

Anders als beim Menschen ist die Tumorentwicklung bei der Ratte von einer quarzstaubinduzierten Fibrose offensichtlich unabhängig und vermutlich eine Langzeitfolge der partikelinduzierten Epithelschädigung im Bereich der bronchiolo-alveolären Endstrecke..

Dekan: Prof. Dr. med. U. Eysel
Referent: Prof. Dr. med. J. Friemann
Koreferent: Prof. Dr. med. M. Wilhelm

Tag der Mündlichen Prüfung: 27. Juni 2000

Ulrich gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-------|
| 1. Einleitung und Fragestellung..... | 2 |
| 2. Material und Methoden..... | 6 |
| 2.1. Tierexperimentelles Untersuchungsgut..... | 6 |
| 2.2. Entnahme und Aufbereitung des Gewebematerials..... | 9 |
| 2.3. Histochemische Färbungen..... | 11 |
| 2.3.1. Hämatoxilin und Eosin (H&E)-Färbung..... | 11 |
| 2.3.2. Siriusrotfärbung..... | 11 |
| 2.4. Histologische Untersuchungsbefunde..... | 12 |
| 2.5. Morphometrische Untersuchungen..... | 17 |
| 2.5.1. Das Interaktive Bildanalysesystem (IBA)..... | 17 |
| 2.5.2. ASM 68K-Analysing System Manual der Fa. Leitz..... | 18 |
| 2.5.3. Sony Digital Color Printer..... | 19 |
| 2.5.4. Messparameter..... | 20 |
| 2.6. Statistik..... | 30 |
| 3. Morphometrische Untersuchungsbefunde..... | 31 |
| 4. Diskussion..... | 43 |
| 5. Zusammenfassung..... | 48 |
| 6. Anhang..... | 50 |
| 6.1. Abkürzungen..... | 50 |
| 6.2. Tabelle ausgewerteter Tiergruppen und ausgemessener Flächen..... | 51 |

| | |
|------------------------------|----|
| 6.2.3. Statistiktabelle..... | 52 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 55 |



Organisation IARC (International Agency for Research on Cancer) veröffentlichte 1987 ihre Einstufung der kristallinen Silikate. Demnach ist die karzinogene Wirkung im Tierversuch ausreichend bewiesen, während sie beim Menschen eingeschränkt bewiesen ist. In der Veröffentlichung der IARC von 1991 wurde die Übertragung tierexperimenteller Befunde auf den Menschen als sinnvoll beschrieben. Bereits 1996 wurde von der IARC die Kanzerogenität kristalliner Silikate auch für den Menschen als ausreichend bewiesen dargestellt. Das standardisierte Mortalitätsverhältnis (SMR) für Bronchialkarzinome ist in vielen Studien um so höher, je länger die berufsbedingte Quarzstaubexposition andauert und je höher die Staubkonzentration am Arbeitsplatz war (Klerk, de et al., 1995). Von Bedeutung ist auch der Quarzgehalt des bearbeiteten Materials (Hilscher et al., 1995).

- 3 -

Einige epidemiologische Studien kommen zu dem Ergebnis, daß die Bronchialkarzinominzidenz bei Silikosekranken deutlich erhöht ist (Goldsmith et al., 1995; Amandus et al., 1995).

Die Entstehung bösartiger humaner Lungentumoren in Zusammenhang mit einer beruflich bedingten Steinkohlestaubexposition konnte bisher epidemiologisch nicht eindeutig nachgewiesen werden und wird daher kontrovers diskutiert (Ames et al., 1983; Craighead, 1992; Hnizdo, 1991; Merlo et al., 1990; Miller et al., 1985; Pairon et al., 1991; Hilscher et al., 1991, Morfeld, 1998). So gewinnen tierexperimentelle Untersuchungen bei der Risikobewertung von Quarzstäuben an Bedeutung, zumal diesen nach den Richtlinien der Environmental Protection Agency zur Risikoabschätzung von Karzinogenen gegenüber widersprüchlichen epidemiologischen Untersuchungen Vorrang eingeräumt werden soll (OSTP, 1985). Bei einem großen Teil der

quarzstaubinduzierten Lungentumoren handelt es sich um solche, welche sich zytogenetisch von Typ-II-Pneumozyten ableiten (Johnson, 1987).

Die hoch dosierte intratracheale und inhalative Quarzstaubapplikation bei Ratten führt regelmäßig über eine Alveolarproteinose in Kombination mit einer dosis- und zeitabhängigen Zunahme der Pneumozytenproliferationsrate und chronische Cholesterinpneumonie mit interstitieller Lungenfibrose zu einem progredienten Lungenumbau mit bronchiolo-alveolärer Epithelhyperplasie (bzw. adenomatöser Hyperplasie der terminalen Bronchiolen) (Friemann, et al., 1994; Albrecht, et al. 1998; Hilscher und J. Rossmanith, 1991; Kissler, 1983).

Die in der Umgebung terminaler Bronchiolen gelegenen Alveolarwandstrukturen werden dabei von kubischen Epithelzellen nach Art von Bronchialwandepithelzellen bzw. Clarazellen ausgekleidet (Mohr, 1992). Diese Bronchialepithelmetaplasie der Alveolardeckepithelzellen als Folge der Schädigung durch die Quarzstaubeinwirkung wird als Vorläufer von Lungenadenomen gesehen (Kawada et al., 1989; Mohr, 1992).

- 4 -

Beim Menschen tritt eine Alveolarproteinose im Verlauf akuter Siliokosen nur nach hochdosierter Quarzstaubeinwirkung auf und führt nach wenigen Monaten durch respiratorische Insuffizienz zum Tode (Banks, 1986; Büchner et al.1969; Hoffmann et al., 1973; Suratt et al., 1977; Zimmermann und Sinclair, 1988). Als Voraussetzung zur Übertragung tierexperimenteller Daten auf den Menschen muß geklärt werden, ob auch die Entwicklung eines quarzstaubinduzierten Tumors im Tierexperiment (z.B. in der Rattenlunge) direkt mit einer lokalen Reizwirkung des silikotischen Narbengewebes auf die

Bronchialschleimhaut in Zusammenhang steht, wie es beim Menschen postuliert wird (Müller und Reitemeyer, 1986; Reitemeyer, 1986).

Es muß also geprüft werden, inwieweit die quarzstaubinduzierte Bindegewebsneubildung auch räumlich mit der Tumorentstehung bzw. der Entwicklung von Tumorstufen im Tierexperiment assoziiert ist.

Experimentelle Hygieniker bzw. Toxikologen erklären die Tumorentstehung mit dem sogenannten Partikeleffekt (Borm et al., 1996; Driscoll et al., 1997; Oberdörster und Yu, 1990; Dungworth et al., 1994): danach reichen allein die durch Aufnahme partikelförmiger Substanzen bedingten Epithelschädigungen als Auslöser für die Tumorentwicklung aus. Der Umstand, daß Partikel in Rattenlungen Tumore auch ohne eine begleitende Bindegewebsneubildung auslösen, hindert sie nicht daran, diese Befunde auch für den Menschen als gültig anzusehen.

Ausführliche Forschungsarbeiten zeigten, daß unter der Einwirkung der chemischen Substanz Polyvinyl-pyridin-N-Oxid (PVNO) die Entwicklung einer quarz-staubinduzierten Lungenfibrose verhindert wird (Schlipkötter und Brockhaus, 1960, 1961; Schlipkötter, 1966; Barhad et al., 1967; Klosterkötter und Gono, 1969; Rodkine und Bolonova, 1979; Bruch et al., 1977; Weller, 1967,1975; Goldstein und Rendall, 1987; Erdogdu und Hasirci, 1997) und die Lebensdauer der Versuchstiere zunimmt (Pott et al., 1991).

PVNO vermag nur die Fibrogenität von reinem Quarz zu inhibieren. Auf die durch Grubenstaub induzierte Fibrose hat PVNO keine positive, d.h. protektive Wirkung (OSTP, 1985; Joos et al., 1987). Nachdem Schlipkötter und Brockhaus

(1961) die günstige Wirkung von PVNO bei der tierexperimentellen Silikose veröffentlicht hatten, wurde herausgefunden, daß diese Substanz nicht nur prophylaktisch die Entwicklung der fibrotischen Quarzreaktion hemmt oder verhindert, sondern in der Lage ist, eine Rückbildung bereits fortgeschrittener experimenteller Silikose bei Ratten und Mäusen herbeizuführen. (Schlipköter und Brockhaus, 1963; Schlipköter und Schlensky, 1994; Pott et al. 1968; Weller, 1967; Pott, et al., 1970; Grundmann und Schlipköter, 1967).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, in wieweit die quarzstaubinduzierte interstitielle Lungenfibrose bei Ratten ähnlich wie beim Menschen mit potentiellen Tumorstufen assoziiert ist, oder ob sie für die Entstehung experimenteller Lungentumoren nach Quarzstaubeinwirkung keine Rolle spielt. Ferner soll herausgefunden werden, ob im Tierexperiment ein morphologisches Korrelat zum sogenannten silikotischen Narbenkarzinom wie beim Menschen besteht. Vor diesem Hintergrund wurden bei Lungen von mit Quarzstaub behandelten Wistar-Ratten morphometrische Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, herauszufinden, ob die durch PVNO reduzierte quarzstaubinduzierte Fibrose auch mit einer Verminderung präneoplastischer Epithelveränderungen einhergeht. Wenn im Tierexperiment die Entwicklung von Tumorstufen – und damit auch von manifesten Tumoren – fibroseassoziiert abläuft, müßte eine Reduktion der Fibrose auch die Tumorzinzidenz und die Häufigkeit des Auftretens präneoplastischer Epithelveränderungen reduzieren.

2. Material und Methoden

2.1. Tierexperimentelles Untersuchungsgut

Bei den in der Abteilung für experimentelle Hygiene (ehemaliger Leiter Prof. Dr. med. F. Pott), des medizinischen Institutes für Umwelthygiene an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen (Versuch 86/12; Versuchsbeginn: 15.09.1986; Versuchsende 15.03.1989) wurden insgesamt 400 weiblichen Wistar-Ratten intratracheal verschiedene nicht faserige Stäube instilliert, die sich unter anderem durch ihre spezifische Oberfläche von-einander unterschieden. Ziel dieses Forschungsplans war die Prüfung von verschiedenen Quarzen (Min-U-Sil, DQ-12, F 600), Magnetit, Erionit und Dieselruß auf ihre kanzerogene Wirkung nach intratrachealer Instillation bei der Ratte und der Einfluß von PVNO auf die durch Quarz bzw. Erionit induzierte Tumormorbidität. Die Ratten wurden unter SPF-Bedingungen gezogen und waren bei Versuchsbeginn ca. 15 Wochen alt, mit einem Durchschnittsgewicht von 185 g. Sie wurden in CO₂-Narkose getötet oder verstarben spontan.

Pott et al. instillierten im Rahmen dieser Versuchsreihe u.a. 40 Wistar-Ratten in wöchentlichen Abständen insgesamt 15 Suspensionen mit jeweils 3 mg DQ-12 Quarz intratracheal. Eine weitere Versuchstiergruppe erhielt zusätzlich 7 s.c. Injektionen von PVNO.

Die folgende Abbildung zeigt, daß neben der längeren Lebenserwartung der mit PVNO behandelten Versuchstiergruppe die Zahl der malignen Tumoren unter dieser Behandlung zunahm.

- 7 -

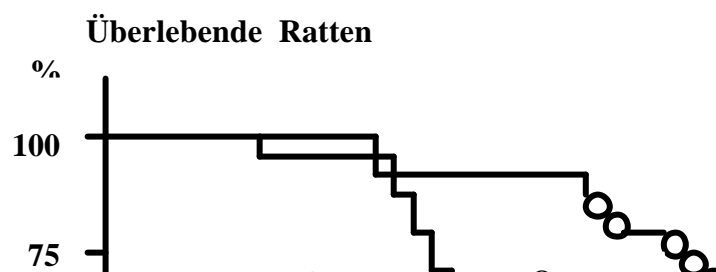


Abb. 1: Lebenserwartung von Wistarratten in Prozent nach 15 intratrachealen Instillatio-nen von 3 mg DQ12-Quarz in zwei Versuchstiergruppen. Eine Gruppe erhielt 7 s.c. Injektionen PVNO. Das Sterbedatum der Ratten mit benignen und malignen Lungentumoren sind markiert. (Pott et al. 1994)

Für unsere Auswertungen wählten wir die Min-U-Sil-Quarz-Gruppe mit und ohne PVNO-Behandlung aus, bei der die Versuchstiere jeweils mit 3 mg Staub wöchentlich über 15 Wochen (Beginn September 1986) intratracheal exponiert worden waren. Die PVNO-Versuchstiergruppe erhielt zusätzlich 7 Injektionen subcutan von je 2 ml 2%iger PVNO-Lösung in NaCl im Abstand von jeweils 4 Monaten, beginnend einen Tag vor der ersten Staubinstillation. (PVNO-Behandlung: am 16.09.86, 13.01.87, 19.05.87, 15.09.87, 18.01.88, 15.05.88, 15.09.88).

Pro Versuchstiergruppe wurden Lungen von 15 Ratten ausgewählt, die in einem Alter von 66-129 Wochen verstorben waren.

Es wurden hierzu die aus diesem Versuchsvorhaben vorliegenden mit Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnittpräparate, die später mit Siriusrot umgefärbt wurden und zusätzlich archiviertes Feuchtmaterial, das gezielt im Bereich makroskopisch tumorfreier Areale zugeschnitten wurde, verwandt.

Als Kontrollgruppe dienten 10 Versuchstiere, denen 15x0,4ml 0,9% NaCL-Lösung intratracheal appliziert worden war.

Das in dieser Arbeit ausgewertete Untersuchungsmaterial ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Untersuchungsmaterial

| Tierzahl | Appl.art | Dosis | Agenz | Versuchsdauer (Mo.) | Überlebenszeit (Wo.) |
|-----------------|-----------------|--------------|--------------|----------------------------|-----------------------------|
| 15 | i.tr. | 15x3mg/0,5ml | Min-U-Sil | > 27 | 66-127 |
| 15 | i.tr. | 15x3mg/0,5ml | Min-U-Sil | >27 | 71-129 |
| | s.c. | 7x2mg/ 0,5ml | 2% PVNO | | |
| 10 | i.tr. | 15x0,4ml | Nacl | | |

2.2. Entnahme und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

a) Entnahme und Fixierung des Untersuchungsmaterials

Die Lungen wurden nach medianer Sternotomie unter CO₂-Narkose entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung nach Lillie (gepuffert mit Natriumphosphat bei einem ph-Wert von ca. 7) expandiert fixiert. Nach zwölfstündiger Fixierung wurden die fünf Lungenlappen longitudinal bzw. transversal zum

Hauptbronchus in zwei Hälften nach dem in Abb.2 dargestellten Schema geteilt, routinemäßig in maximal 4mm Dicke zugeschnitten und anschließend über die aufsteigende Alkoholreihe und das Medium Xylol in Paraplast vollständig eingebettet.

b) Einbettung des Untersuchungsmaterials

Die Einbettung wurde nach der üblichen Technik durchgeführt (Romeis 1968), wobei Paraplast anstelle von Paraffin verwendet wurde. Die Lungenstücke wurden maschinell mit dem Fixationsautomaten Whipp Vacuuminfiltrations Prozessor für die Einbettung vorbereitet. Dabei wurden sie jeweils eine Stunde lang bei 40°C in einem Automaten unter Vakuum nach dem Prinzip der aufsteigenden Alkoholreihe (2x 70% iger, 2x96% iger, 2x ca.99% iger, 2xXylol) entwässert. Im Anschluß an diese Vorbereitung wurden die Präparate mit frischem Paraplast und Hilfe eines Einbettungssystems (Tissue-TeK 3 der Firma Miles-Scientific) in Metallgieß-förmchen gegossen und auf die Rückseite der Einbettkosette aufgeblockt.

c) Anfertigung von Paraffinschnitten

1. Einspannen in den Präparatehalter eines Schlittenmikrotoms und Anfertigung von 3-5 µm dicken Schnittpräparaten.
2. Strecken der Schnittpräparate in einem 40°C warmen Wasserbad
3. Aufziehen der Schnittpräparate auf gekennzeichnete und mit Chromalaungelatine beschichteten Objektträger und Trocknung bei 60°C über 20 Minuten.

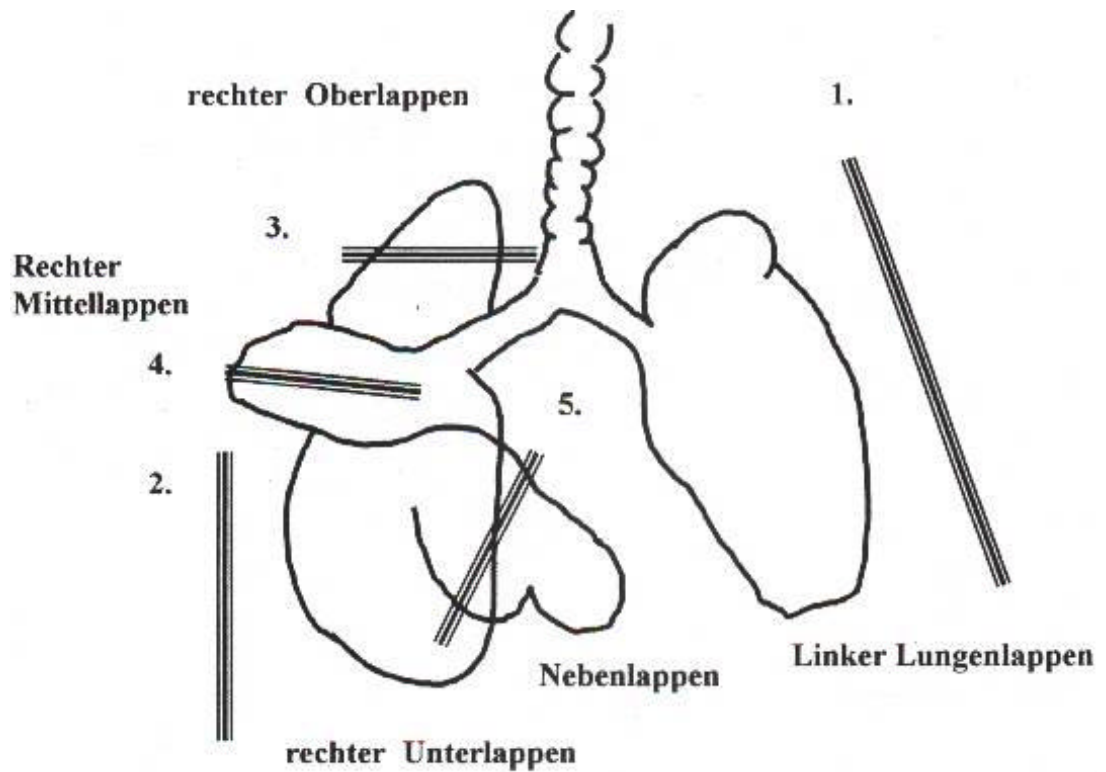


Abb. 2: Präparatentnahmestelle in der Rattenlunge

Schnittebene: longitudinal und transversal zum

Hauptbronchus

- Lokalisationen:**
1. linker Lungenlappen longitudinal
 2. rechter Unterlappen longitudinal
 3. rechter Oberlappen transversal
 4. rechter Mittellappen longitudinal
 5. Nebenlappen transversal

2.3. Histochemische Färbungen

2.3.1. Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung

Bei der HE-Färbung dient das Hämatoxylin zur Anfärbung der Kerne (blau). Das Eosin dient als Bindegewebs- und Zytoplasmafärbung (rot).

Die Schnitte wurden manuell mit Hilfe von Glasküvetten gefärbt. Dabei wurden sie mit jeweils 15 Sekunden Abtropfzeit zwischen den Bädern in folgender Reihenfolge gespült: zweimal Xylol je 5-10 Minuten, zweimal absoluter Alkohol ca. eine Minute, zweimal 96%iger und zweimal 70%iger Alkohol jeweils ca. eine Minute, Leitungswasser, Hämatoxylin (sauer) nach Mayer, Leitungswasser, 70% ige Salzsäure, Leitungswasser, Eosin, Leitungswasser, zweimal 70%iger Alkohol je eine Minute, zweimal 96%iger Alkohol je eine Minute, zweimal absoluter Alkohol je eine Minute, zweimal Xylol über je 5-10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt der Fa. Kindler eingedeckt. Die absteigende Alkoholreihe dient zur Entparaffinisierung der geschnittenen Präparate, damit diese transparent werden und gefärbt werden können. Zum Eindecken der Schnitte werden die Objektträger durch die aufsteigende Alkoholreihe gebracht, um sie entwässern zu können.

2.3.2. Siriusrotfärbung

Die Siriusrotfärbung dient zur spezifischen Darstellung der Kollagenfasern. Kollagene Fasern erscheinen rosa-purpurrot vor hellem Hintergrund. Nur wenige Strukturen sind deutlich unterscheidbar. Aus meßtechnischen Gründen werden die Kerne nicht gefärbt. Die Kollagenfärbung entspricht einer Von-Gieson-Färbung ohne Hämatoxylin-Gegenfärbung.

Die Schnitte wurden fünf Minuten mit Aqua dest behandelt. Anschließend wurden sie Sirius-Lösung überführt. Nach einer Färbedauer von zehn Minuten wurden die Schnitte dreimal in Aceton abgewaschen und differenziert, danach in Xylol überführt und mit Eukitt eingedeckt.

- 12 -

Herstellung der Siriusrot-Gebrauchslösung:

Siriusrot-Stammlösung:

1g Siriusrotpulver mit Aqua dest auf 100ml auffüllen und mit einigen Tropfen Eisessig ansäuern. (unbegrenzte Haltbarkeit)

Siriusrot-Gebrauchslösung:

Stammlösung 1:10 (1+9) mit gesättigter, wässriger Pikrinsäure verdünnen.

2.4. Histologische Untersuchungsbefunde

In unserem Tierexperiment induzierte der Quarzstaub zum größten Teil eher kollagene faserarme Staubzellknötchen und eine interstitielle Fibrose mit nur geringem Staubzellgehalt.

Histologisch zeigten die Rattenlungen neben diesen typischen silikotischen Veränderungen, Alveolarproteinoseherde (Abb.4) und charakteristischen Veränderungen im Bereich der bronchiolo-alveolären Endstrecke, eine sogenannte adenomatöse Hyperplasie bzw. eine bronchiolo-alveoläre Hyperplasie (Abb.3).

Die Alveolarwände in der Umgebung terminaler Bronchiolen sind dabei von einreihig angeordneten, hochprismatischen bis kubischen Epithelzellen ausgekleidet. Es kommt dadurch zum Verlust der runden bis polygonalen Alveolenform.

Bei den zusätzlich mit PVNO behandelten Rattenlungen zeigte sich zusätzlich das Bild einer Desquamativpneumonie (Abb.5) mit im Vergleich zu unbehandelten Versuchstieren verminderter interstitieller Fibrose (Abb.6).

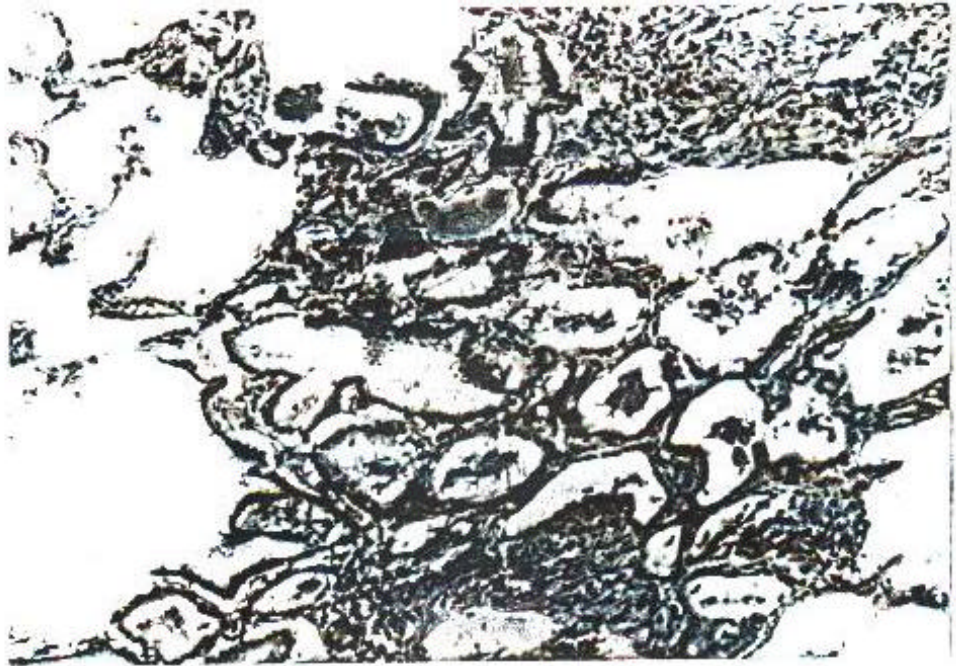


Abb. 3: Schnittpräparat der Rattenlunge 28 Monate nach i.tr. Instillation von 15x3 mg Min-U-Sil Quarz mit dem Befund einer adenomatösen Hyperplasie; H&E; (Vergrößerung 100 x)

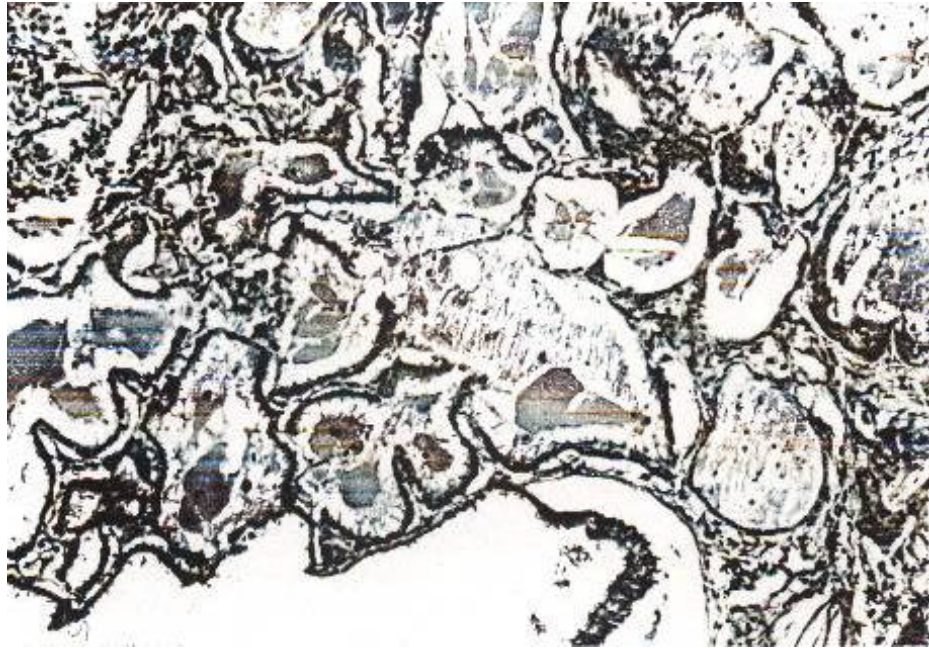
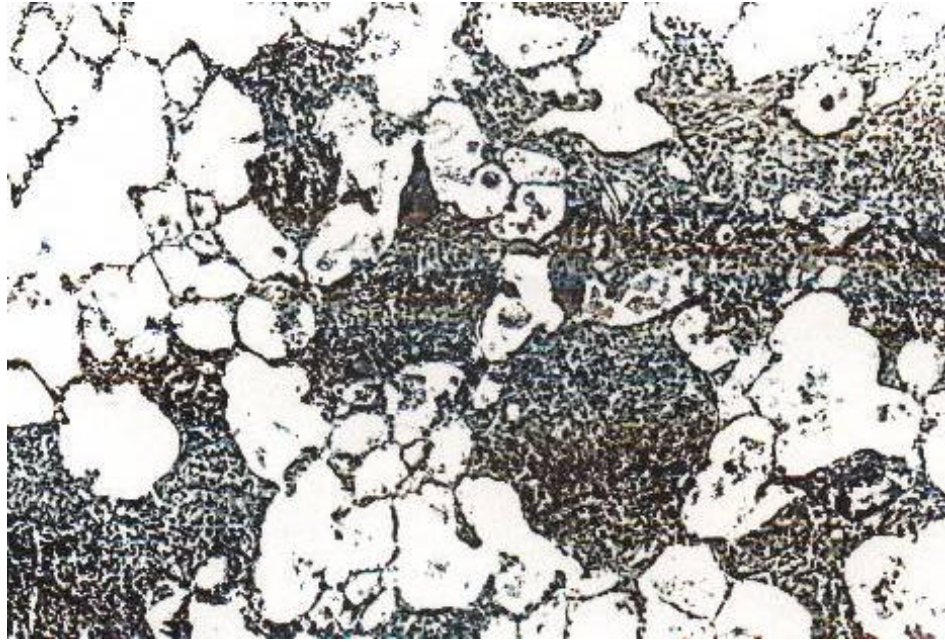


Abb. 4: Schnittpräparat der Rattenlunge 28 Monate nach i.tr. Instillation von 15x3mg Min-U-Sil-Quarz mit dem Befund einer Alveolarproteinose; H&E; (Vergrößerung 100x)



**Abb. 5: Schnittpräparat der Rattenlunge 26,5 Monate nach i.tr.
Instillation
Von 15x3mg Min-U-Sil-Quarz und 7x2ml 2%iger PVNO-Lösung
s.c.
Mit dem Befund einer Desquamativpneumonie; H&E;
(Vergrößerung 100x)**

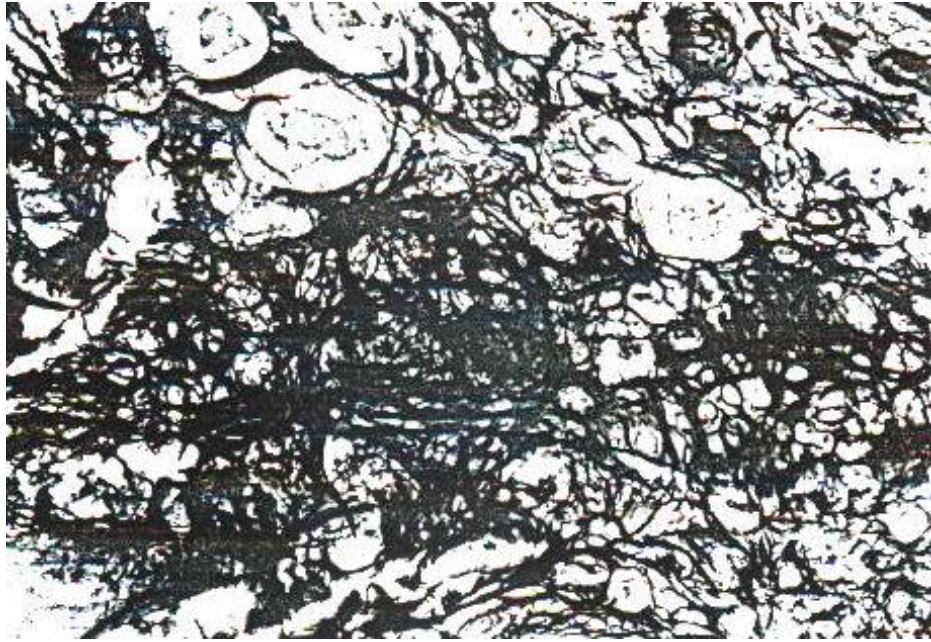


Abb. 6: Schnittpräparat der Rattenlungen 24,75 Monate nach i.tr. Instillation von 15x3mg Min-U-Sil-Quarz mit dem Befund einer quarzstaubinduzierten Fibrose (Silikose); Siriusrot; (Vergrößerung 100x)

- 17 -

2.5. Morphometrische Untersuchungen

2.5.1. Das Interaktive Bildanalyse-system (IBAS)

a) Hardware-Voraussetzung

Das IBAS der Firma Kontron ist ein auf Basis eines Z80 Mikriprozessors arbeitendes Computersystem, welches speziell für die Auswertung und Analyse von Bildinformationen entwickelt worden ist. Es gliedert sich in zwei Computereinheiten, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen:

Das IBAS I ist ein unter dem Betriebssystem CP/M arbeitender Computer mit 64 k Byte Arbeitsspeicher und separatem 16k Byte Grafikspeicher. Diese Systemeinheit dient einerseits der statistischen Erfassung des anfallenden Datenmaterials sowie der Steuerung der peripheren Bausteine (Videokamera, Mikroskop, Objektisch, Diskettenlaufwerk, Drucker). Andererseits überwacht das IBAS I die Bildverarbeitungsprozesse im IBAS II.

Das IBAS II ist ein Computer, der einen speziell für die schnelle Verarbeitung großer Datenmengen, wie sie bei der Bildverarbeitung anfallen, entwickelten Mikroprozessor enthält.

In dieser Systemeinheit findet die Umwandlung des analogen Videobildes in einen digitalen Bildaufbau, d.h. die Reduktion eines Videobildes mit theoretisch unendlich vielen Grauwerten (analoges Videobild) in ein Bild mit nur zwei Grauwerten (digitales Bild), nämlich Weiss und Schwarz, statt. Außerdem wird auch der eigentliche Bildverarbeitungsprozess im IBAS II durchgeführt. Dieser Computer besitzt zur internen Verarbeitung von Bildern 15 Speicher, in denen Zwischenstufen einer Bildverarbeitung abgelegt werden können. Die Auflösung eines solchen digitalen Bildes beträgt 512 x 512 PIXEL (Bildpunkte), die in 255 Graustufen (8 Bit) angesprochen werden können.

Schnittstelle zum Untersucher sind bei der Bildanalyse ein RGB-Monitor (Farbmonitor mit besonders guter Punktauflösung und Farbwiedergabe), auf dem die Ergebnisse des Rechenprozesses ohne Zeitverzögerung nachvollzogen werden können, und ein Kontrollmonitor, auf dem der vom

IBAS als nächstes abzuarbeitende Befehl sowie die den Befehl charakterisierenden Rechenparameter dargestellt werden. Bei eventuellen Änderungen dieser Rechenparameter kann der Untersucher mit Hilfe einer Tastatur sowie eines Digitalisiertabletts korrigierend in den Untersuchungsvorgang eingreifen. Der elektronische Bildeinzug in das IBAS- Computersystem wird mit Hilfe einer Videokamera der Firma Siemens vollzogen. Für die lichtmikroskopische Wiedergabe wurde ein Mikroskop der Firma Zeiss (großes Forschungsmikroskop universal für Durchlicht) mit bis zu 65-facher Vergrößerung des zu untersuchenden Präparates verwandt.

b) Software-Voraussetzungen

Für die morphometrische Untersuchung wurde das zum IBAS-System gehörige Softwarepaket Rel. 4.4 verwandt, mit der die Meßprogramme für die jeweilige Fragestellung programmiert werden können.

2.5.2. ASM 68K – Analysing System Manuel der Fa. Leitz

a) Software-Voraussetzungen

Es wurde das zum ASM 68 K gehörige Softwarepaket verwandt, welches eine halbautomatische Bildanalyse ermöglicht und mit welchem Meßprogramme für die jeweilige Fragestellung erstellt werden können.

b) Hardware-Voraussetzungen und Technische Daten

Für die Steuer- und Auswertungseinheit steht ein Einplatinen-Computer mit Motorola-68000 Mikroprozessor mit zwei 5 ¼ Floppy-Disk-Laufwerken (DS/DD/96tpi) zur Verfügung.

Das System verfügt über eine Tafel mit dichtem Meßraster und elektronischem Zeichenstift, dem „Cursor“. Die angefertigten Transparenzskizzen werden auf die Tafel gelegt, unter visueller Kontrolle die Umrisse der jeweiligen Bezirke nachgezeichnet und die Fläche ermittelt.

Bei Aufsetzen des Stiftes gibt die Elektronik der Tafel die Lagekoordinaten des Stiftes in Bezug zum nächsten Netzschnittpunkt an. Alle Positionen des Stiftes werden von einem Mikrocomputer erfaßt und automatisch alle quantitativen Parameter gespeichert.

Das Meßprinzip beruht somit auf der koordinatenmäßigen Erfassung der Randpunkte der zu untersuchenden Strukturen. Die Meßgenauigkeit beträgt 10 Rasterpunkte pro Millimeter. Die einfache automatische Kalibrierung erfolgt durch Vorgabe des gewünschten Maßstabes. Selbst wenn keine Bildvorlagen zur Verfügung stehen, können mit Hilfe eines Videomischers mikro- und makroskopische Bilder, die von der Fernsehkamera aufgenommen wurden, vermessen werden. Darüber hinaus bietet das ASM ein Arbeits- und Sicherheits-Kontrollsystem.

2.5.3 Sony Digital Color Printer

Die Darstellung der Meßparameter der morphometrischen Auswertungen erfolgte retrospektiv anhand von Videobildern, die ein Sony Digital Color Printer Mavigraph UP 1510 CNE herstellte, der am IBAS-Nachfolgemodell KS 400 angeschlossen worden war.

2.5.4 Messparameter

Bei den Voruntersuchungen erwies sich eine automatisierte Auswertung des histologischen Materials auf Grund mangelhafter Standardisierbarkeit der zu untersuchenden Präparate in Bezug auf die Schnittdicke und Transparenz als zu ungenau. Es wurde daher ein Programm entwickelt, welches dem Untersucher die Möglichkeit gibt, korrigierend in den Untersuchungsvorgang einzugreifen. Das erstellte Programm dient sowohl der besseren Darstellung zu untersuchender Strukturen auf digitalem Wege als auch der Flächenmessung und der Speicherung gewonnener Daten auf einem Datenträger (Diskettenlaufwerk).

Die morphometrische Auswertung erfolgte an Lungenschnitten mit einer mittl. Schnittdicke von 3-5 μm .

Die Gesamtheit der pro Versuchstier zur Verfügung stehenden Lungenschnittflächen (1,59-2,58cm) wurden vollständig morphometrisch ausgewertet.

Bei der morphometrischen Auswertung wurden an zunächst HE-gefärbten und später mit Siriusrot umgefärbten Präparaten folgende Parameter bestimmt:

1. Gesamtfläche des Epithels in adenomatös-hyperplastischen Lungenabschnitten (Objektiv 10x) (Abb. 3 u. 4).

Die Bezirke der adenomatösen Hyperplasien (Abb.7) wurden in dem zu messenden Gesichtsfeld grob interaktiv eingegrenzt (Abb.8 u.9) und das übrige Bild gelöscht (Abb.10). Über die automatische Grauwertdiskriminierung wurden nur die durch intensive Kernfärbung sehr dunkel dargestellten Epithelzellflächen erfaßt. Der Auswerter konnte mit Hilfe eines Overlays, welches in das Originalgrauwertbild eingeblendet wurde, die automatische Diskriminierung kontrollieren und gegebenenfalls ändern.

2. Gesamtfläche „ nicht atmendes Lungengewebe“, d.h. Gesamtfläche silikotischen Narbengewebes (bei ausschließlich mit Min-U-Sil behandelten Versuchstieren) bzw. Gesamtfläche unbelüfteten Lungengewebes, d.h. Gesamtfläche silikotisches Narbengewebe und Desquamativpneumonie (bei mit Min-U-Sil und PVNO behandelten Versuchstieren). (Objektiv 6,3) (Abb.5 u. 6).

Die Vermessung von „nicht atmendem Lungengewebe“ (Abb.11 -16), d.h. der Anteil des alveolären Lungenparenchyms, das für den Gasaustausch nicht zur Verfügung stand, erfolgte am Computersystem IBAS II durch interaktive Eliminierung von Gefäßen (Abb.12) und automatische Eliminierung der Septen (Abb.14) bzw. nicht relevanter, kleiner Partikel (Abb.13) zwecks Beurteilung des Einflusses der „Minderbelüftung“ auf die Aussprossung terminaler Bronchiolen.

2. Fläche der insgesamt ausgewerteten Lungenabschnitte (ohne Bronchien, Gefäße und Tumorgewebe) (Abb. 17)

Eine genauere Erfassung von Arealen wie Gefäßen und Bronchien, bei der Bestimmung der „Gesamtpräparatefläche“ als Bezugsgröße durch das Flächenmeßsystem ASM erforderte eine Vergrößerung dieser Flächen. Zur Bestimmung der Gesamtschnittfläche des histologischen Präparates als Bezugsgröße pro Versuchstier, wurden daher alle Schnitte mit Hilfe eines Diaprojektors vergrößert und auf eine Mattscheibe projiziert. Anschließend wurden die Schnittumrisse sowie die großen Gefäße und Bronchien des projizierten Bildes auf Transparentpapier übertragen. Zur Ermittlung des Vermessungsmaßstabes wurde der entsprechende Vergrößerungsfaktor zu 1 cm Längsbasis bestimmt (Abb.17). Die Vermessung der Umrisse der Transparenzskizze erfolgte am ASM 68 K der Firma Leitz, in dem die

Kontur auf dem Transparentpapier mit Hilfe eines Cursors auf einem Digitizertablett umfahren wurde. Die großen Bronchien, Gefäße und Tumoren wurden separat vermessen und von der Gesamtfläche subtrahiert.

- 22 -

4. Fläche der Fibrosebezirke mit dem ASM (Abb.6)

Zur Bestimmung der Ausdehnung fibrotisch umgewandelter Lungenabschnitte wurden die zuvor mit dem IBAS ausgewerteten HE-Präparate mit Siriusrot ungefärbt. Unter visueller Kontrolle wurden die Umrisse der gesamten Fibrosebezirke nachgezeichnet und die Fläche mit dem ASM halbautomatisch bestimmt (Abb.18,19)..

Die Untersuchungen zum Vergleich der Ausdehnung des nicht atmenden Lungengewebes in beiden Versuchsgruppen sind erfolgt, um herauszufinden, ob der Tatbestand „Minderbelüftung“ allein – unabhängig davon, ob er durch eine Desquamativpneumonie oder eine Vernarbung induziert wird - geeignet ist, das Aussprossen terminaler Bronchiolen im Sinne einer bronchiolo-alveolären Hyperplasie in den beiden Versuchsgruppen zu begünstigen. Um den Einfluß einer quarz-staubinduzierten Fibrose auf die Entstehung einer adenomatösen Hyperplasie genauer zu untersuchen, mußte gesondert auch die Ausdehnung der adenomatösen Hyperplasie bezogen auf das belüftete Lungengewebe erfaßt werden. Nur so hätte eine stärker entwickelte adenomatöse Hyperplasie außerhalb fibrotischer Lungenbezirke in quarzexponierten Lungen ohne PVNO-Behandlung erkannt werden können. Zur Bestimmung der adenomatösen Hyperplasien im belüfteten Lungengewebe wurde von der zuvor ermittelten Gesamtschnittfläche des histologischen Präparates die Fläche des nicht atmenden Lungengewebes (gleichgültig ob in Folge einer Fibrosierung oder einer

Desquamativpneumonie) substrahiert. Die Meßergebnisse wurden auf ein 1 cm² bereinigte Lungenschnittfläche bezogen, d.h. das gesamte alveoläre Lungenparenchym ohne große Gefäße, Bronchien und Tumorgewebe.

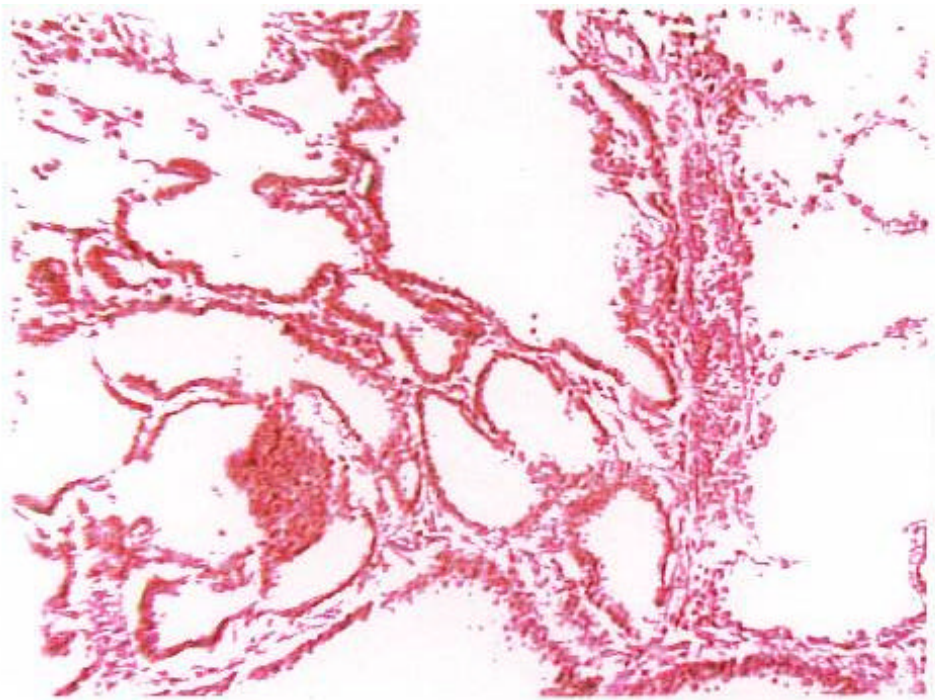


Abb. 7: Videoprintbild der Rattenlunge 28 Monate nach i.tr. Instillation von 15x3 mg Min-U-Sil Quarz mit dem Befund einer adenomatösen Hyperplasie; H&E

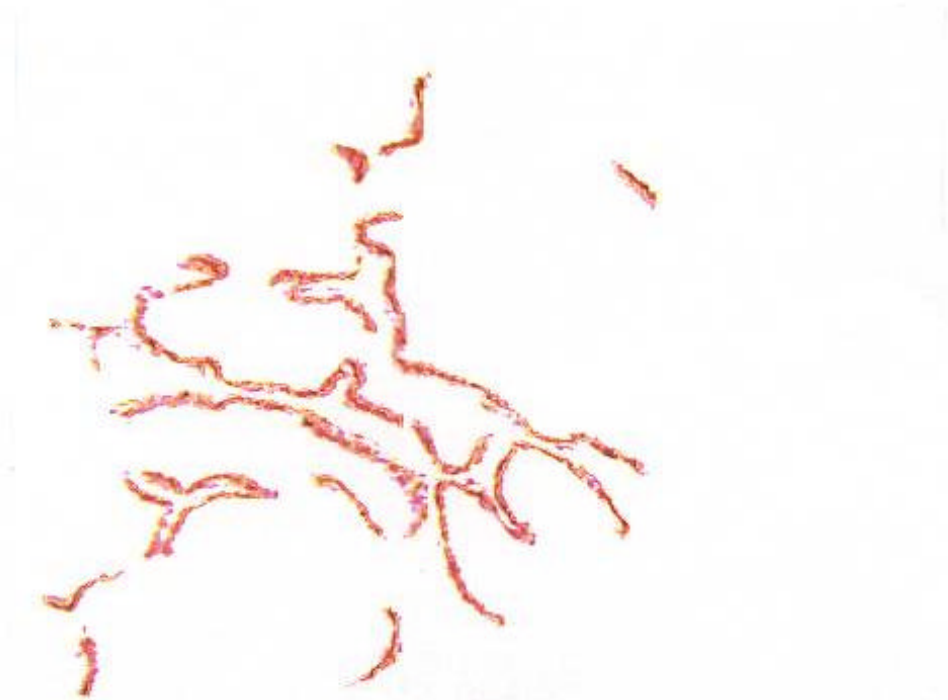


Abb. 8: Isolierte Overlaydarstellung der adenomatösen Hyperplasie mit Kontur nach Löschung des übrigen Bildes

- 24 -

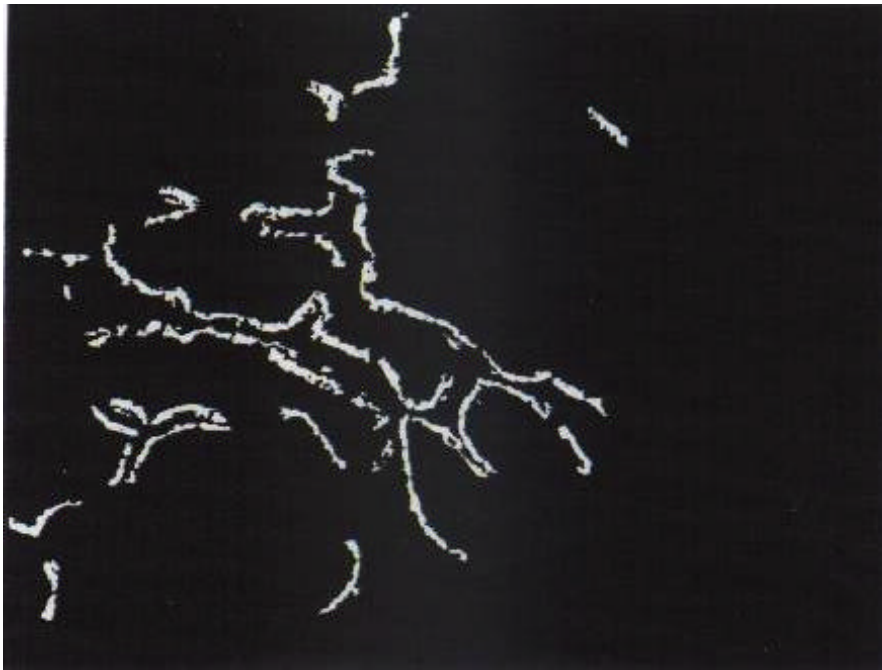
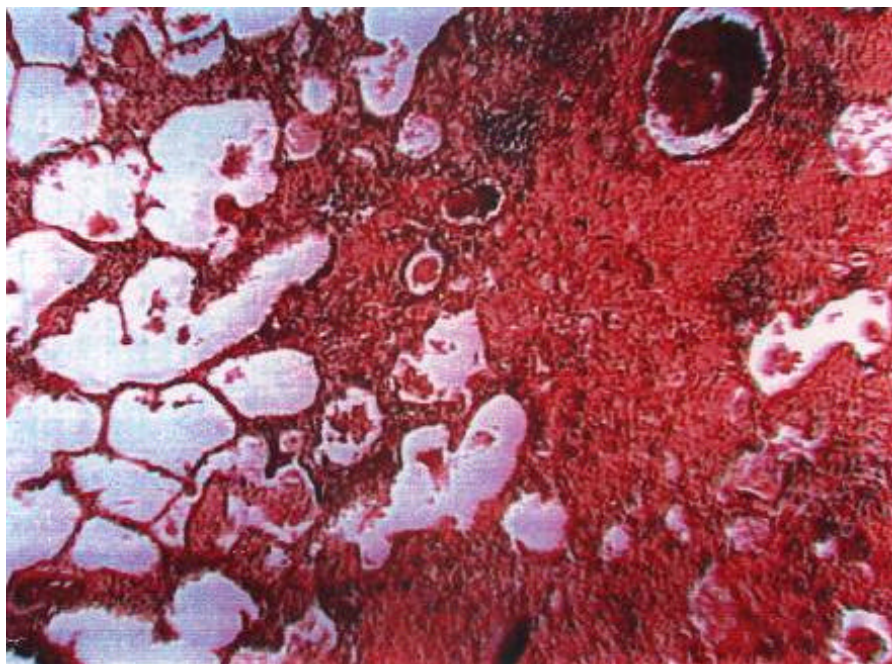


Abb. 9: Binärbild der zu vermessenden Bezirke der adenomatösen Hyperplasien

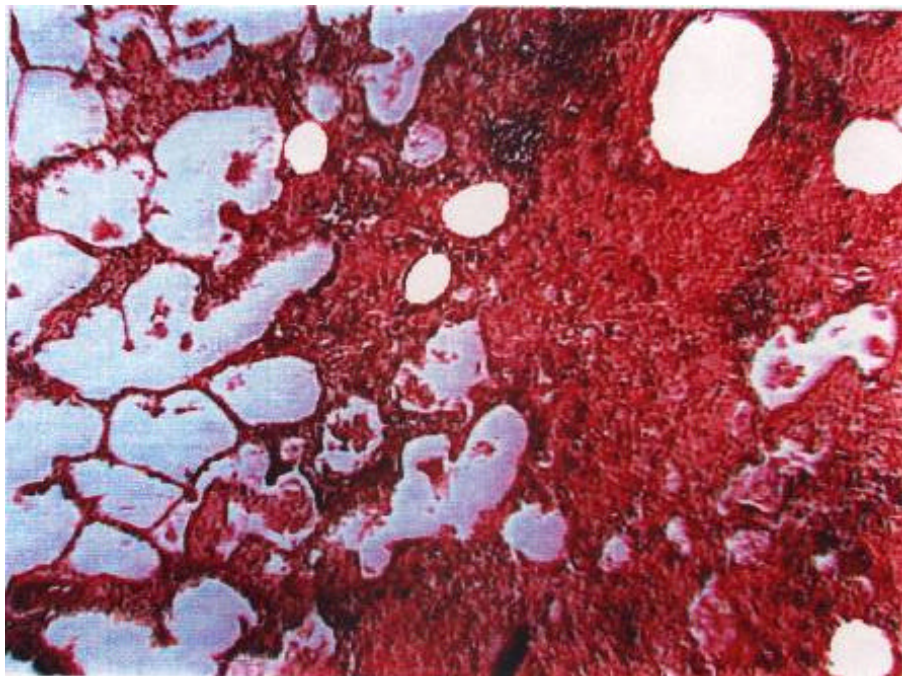


Abb. 10: Overlaydarstellung der ausgemessenen Flächen der adenomatösen Hyperplasien – gelb markiert

- 25 -



**Abb. 11: Videoprintbild der Rattenlunge 26 Monate nach i.tr. Instillation
von
15x3 mg Min-U-Sil-Quarz und Injektion von 7x2 ml 2%iger PVNO-
Lösung s.c. mir Darstellung von „nicht atmendem Lungengewebe“;
H&E**



**Abb. 12: Originalbild „nicht atmendes Lungengewebe“ nach interaktiver
Eliminierung von Gefäßen (vergl. Abb. 11)**

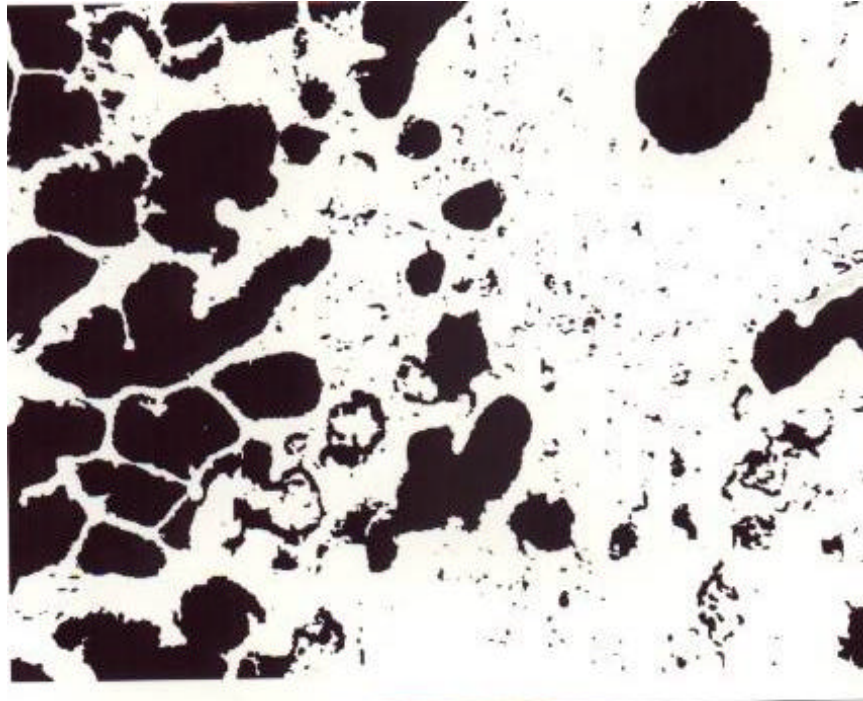


Abb. 13: Binärbild nach Reinigung von kleinen, nicht zur Messung gehörender Partikel



Abb. 14: Binärbild nach Eliminierung von Septen und Entfernung weiterer kleiner Teilchen

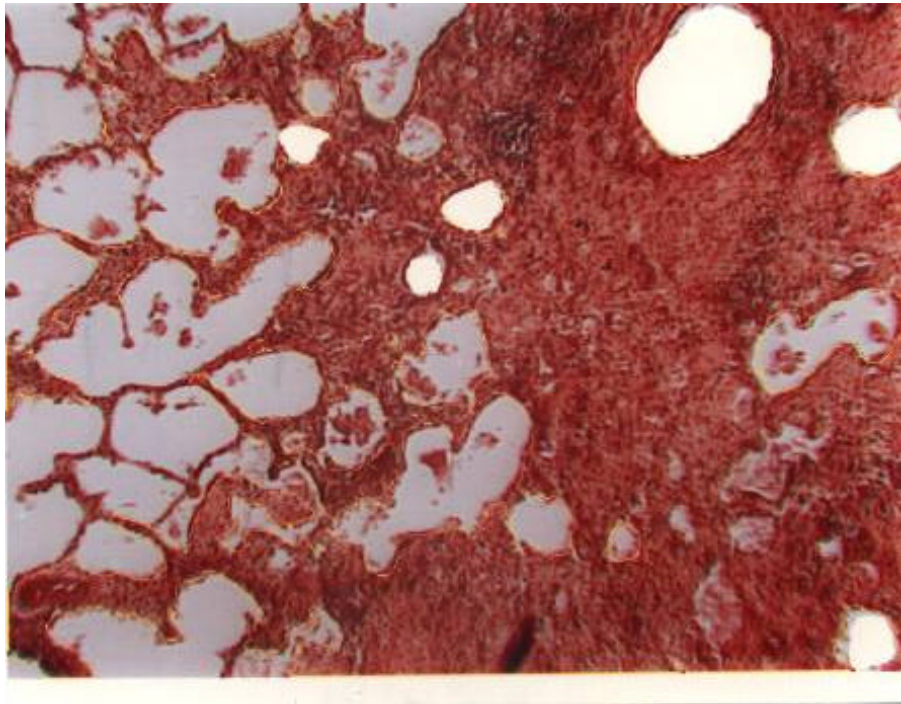


Abb. 15: Overlaydarstellung „nicht atmendes Lungengewebe“ mit Kontur im Originalbild

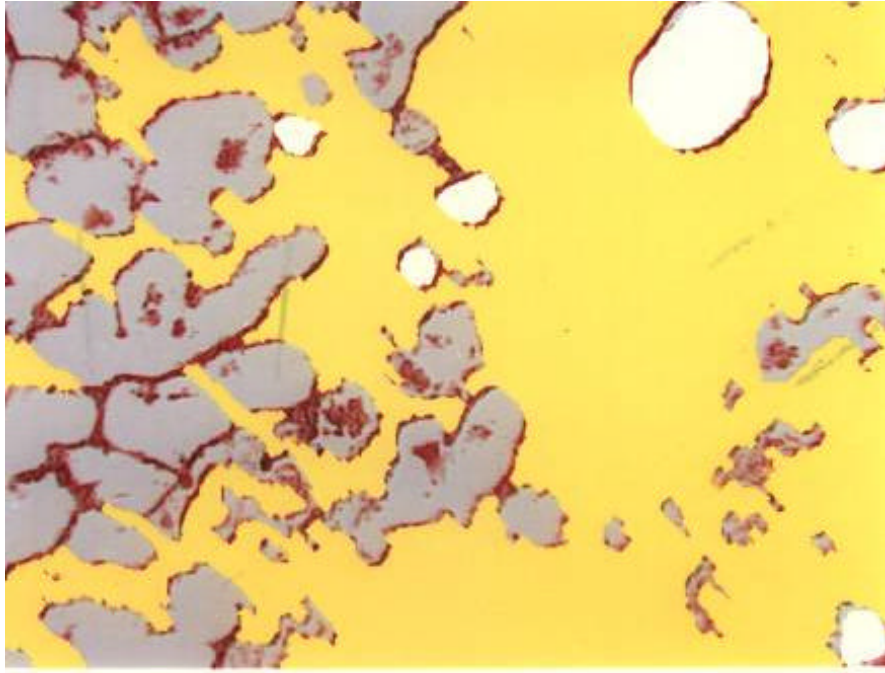


Abb. 16: Overlaydarstellung „nicht atmendes Lungengewebe“ mit Darstellung der tatsächlich gemessenen Bezirke

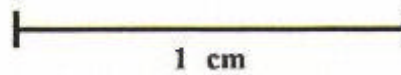
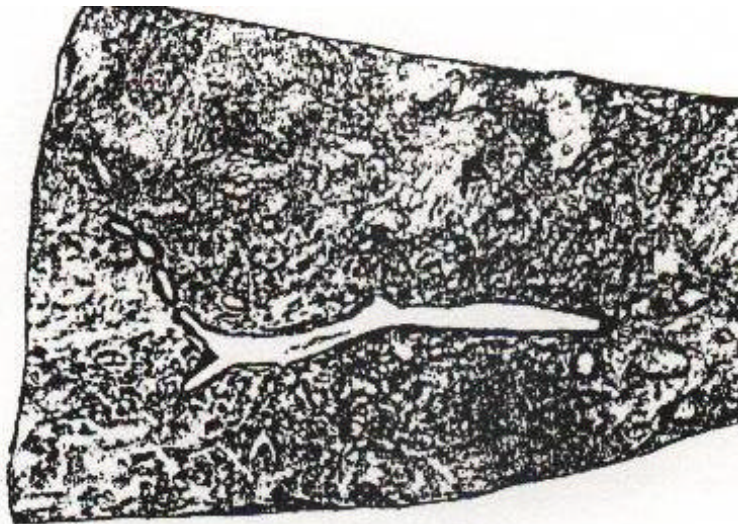


Abb. 17: Schnittumriß des histologischen Präparats Nr.: 2283/88

QDI nach

Vergrößerung durch Diaprojektion und Übertragung auf

Trans-

parentpapier (5-fache Vergrößerung)

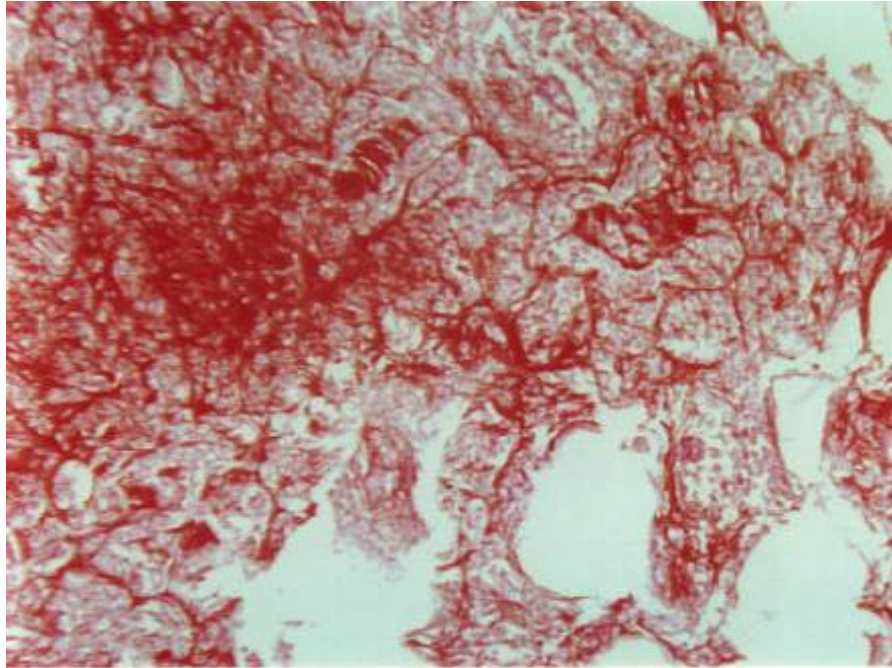


Abb. 18: Videoprintbild der Rattenlunge 24,75 Monate nach i.tr. Instillation von 15x3mg Min-U-Sil-Quarz mit dem Befund einer Fibrose; Siriusrot

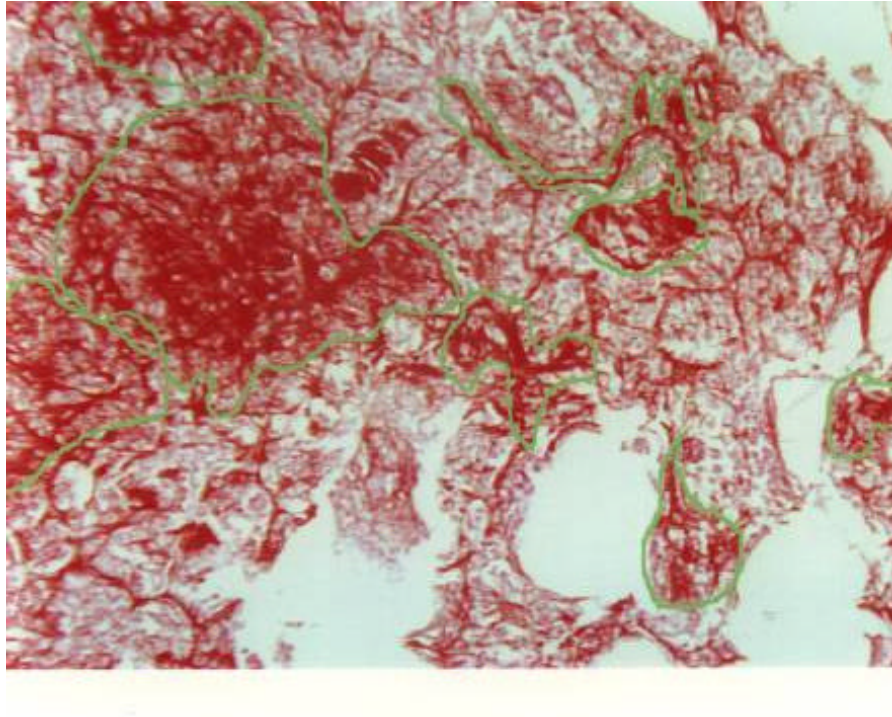


Abb. 19: Overlaydarstellung „Fibrose-Bezirke“ mit Kontur im Originalbild

- 30 -

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistischen Analysesystem SAS. Es wurden die Mittelwerte der Standardabweichung und mit dem Students t-Test die Mittelwertunterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen auf Signifikanz geprüft.

Liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $< 5\%$ ($p < 0,05$), so unterscheiden sich die Gruppenmittelwerte signifikant voneinander.

Der Zusammenhang zweier Variablen wurde durch die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ermittelt..

Zur Überprüfung der Linearität des Zusammenhangs wurden die Werte zusätzlich grafisch aufgetragen und die Regressionsgerade eingezeichnet, um Ausreißer zu finden sowie aus der Steigung der Regressionsgeraden und den Abweichungen der Werte von den Regressionsgeraden die Stärke des Zusammenhangs zu erkennen.

- 31 -

3. Morphometrische Untersuchungsbefunde

Die morphometrisch ermittelte Ausdehnung des silikotischen Narbengewebes bzw. der interstitiellen Fibrose zeigte, daß die quarzstaubinduzierte Lungenfibrose in der PVNO behandelten Gruppe deutlich geringer ausfiel (0,85 mm² Fibrose auf 100 mm² Lungengewebe), als in der nicht mit PVNO behandelten quarzstaub- exponierten Versuchstiergruppe (9,93 mm² Fibrose auf 100 mm² Lungengewebe) (Abb.20). Dieses Merkmal wurde mit p=0,0001 als signifikant eingestuft.

Darüber hinaus wurde das Ausmaß der adenomatösen Hyperplasie morphometrisch pro Versuchstier erfaßt. Die morphometrische Bestimmung der Ausdehnung derartiger metaplastisch umgewandelter Alveolarepithelabschnitte (d.h. adenomatös-hyperplastische Lungenbezirke) bezogen auf 100 mm² Lungenschnittfläche ergab deutliche Unterschiede zwischen der ausschließlich mit Min-U-Sil und der mit Min-U-Sil und PVNO behandelten

Versuchstiergruppen. In den Lungen mit ausgeprägter quarzstaubinduzierter Fibrose entsteht eine stärkergradige adenomatöse Hyperplasie (0,42 mm² auf 100 mm² Lungenschnittfläche) als in den zusätzlich mit PVNO behandelten Versuchstieren (0,24 mm² auf 100 mm² Lungenschnittfläche) (Abb.21,22). Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant (p=0,0607).

Der Anteil der adenomatös hyperplastischen Lungenbezirke am belüfteten Lungengewebe (= Präparatefläche minus nicht atmendes Lungengewebe) lag bei den ausschließlich mit Quarzstaub exponierten Versuchstieren um 29% höher als bei den sowohl mit Quarz als auch mit PVNO behandelten Versuchstieren (Abb.23, 24, 25). Mit p=0,05 ist dieses Ergebnis nicht signifikant.

Es konnte morphometrisch nachgewiesen werden, daß die sogenannten „nicht atmenden“ Lungengewebe, d.h. des Anteils des Lungenparenchyms, welcher für den Gasaustausch nicht mehr zur Verfügung stand, zum Zeitpunkt des Ablebens der Nager in beiden Vergleichsgruppen keine signifikanten Unterschiede aufwies (Abb.26,27). Dabei handelt es sich bei der ausschließlich mit Min-U-Sil behandelten Versuchstiergruppe um silikotische Narbenfelder bzw. Lungenfibrose (34,08 mm² auf 100 mm² Lungenschnittfläche). Bei der mit Min-U-Sil und PVNO behandelten Versuchstiergruppe zeigte sich in gleicher Flächenausdehnung eine Desquamativpneumonie (28,36 mm² auf 100 mm² Lungenschnittfläche).

PVNO ersetzt somit quarzpartikelhaltiges Narbengewebe durch Desquamativ- bzw. Cholesterin-pneumonien.

Die Unterschiede bei der Ausdehnung des unbelüfteten Lungengewebes sind in beiden Versuchsgruppen aber deutlich weniger stark ausgeprägt als die Unterschiede bezüglich der Ausdehnung der adenomatösen Hyperplasie, weswegen die Belüftung alleine kein ursächlich entscheidender Faktor für die Läsion sein kann.

Die Korrelation der flächenhaften Ausdehnung der Fibrose mit dem Ausmaß der adenomatösen Hyperplasie bei dem ausschließlich mit Quarz behandelten Versuchstieren beträgt $r=0.22$ und ist mit $p=0.4233$ nicht signifikant (Abb. 28).

Die Korrelation der flächenhaften Ausdehnung der Fibrose mit dem Ausmaß der adenomatösen Hyperplasie bei der zusätzlich mit PVNO behandelten Versuchstier-gruppe beträgt $r=0.46$ und ist mit $p=0.0841$ nicht signifikant (Abb. 29).

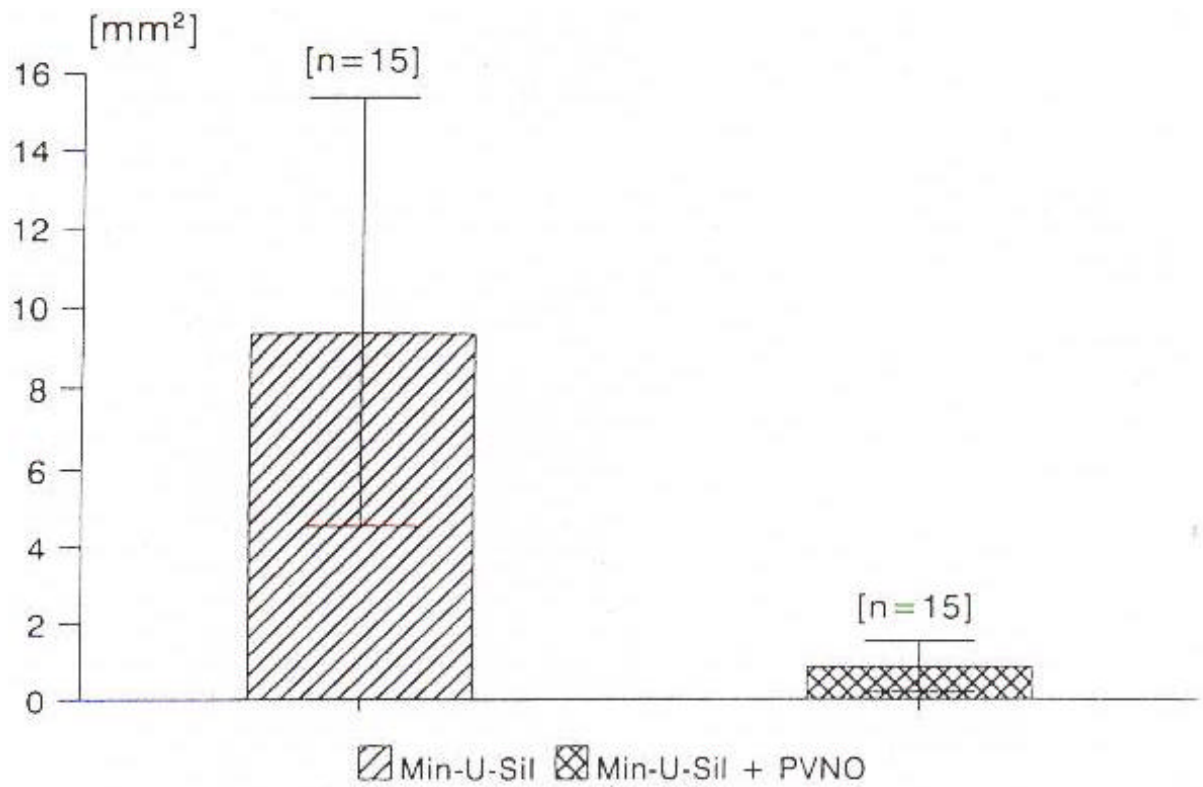


Abb. 20 : Morphometrisch ermittelte Ausdehnung des silikotischen Narbengewebes pro 1 cm² Lungenschnittfläche nach Behandlung mit Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.)

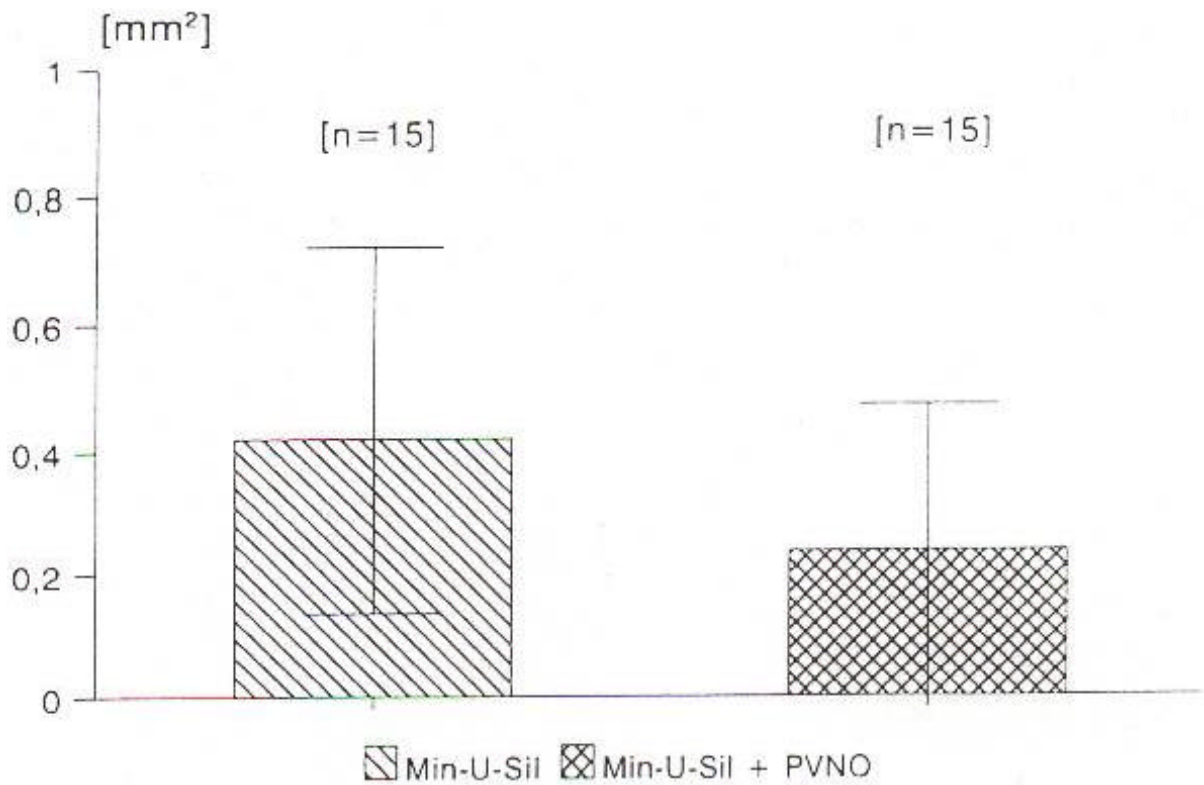


Abb. 21 : Morphometrisch ermittelte Ausdehnung der adenomatösen Hyperplasie pro 1 cm² Lungenschnittfläche nach i.tr. Applikation von Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.) bezogen auf die gesamte Versuchstiergruppe

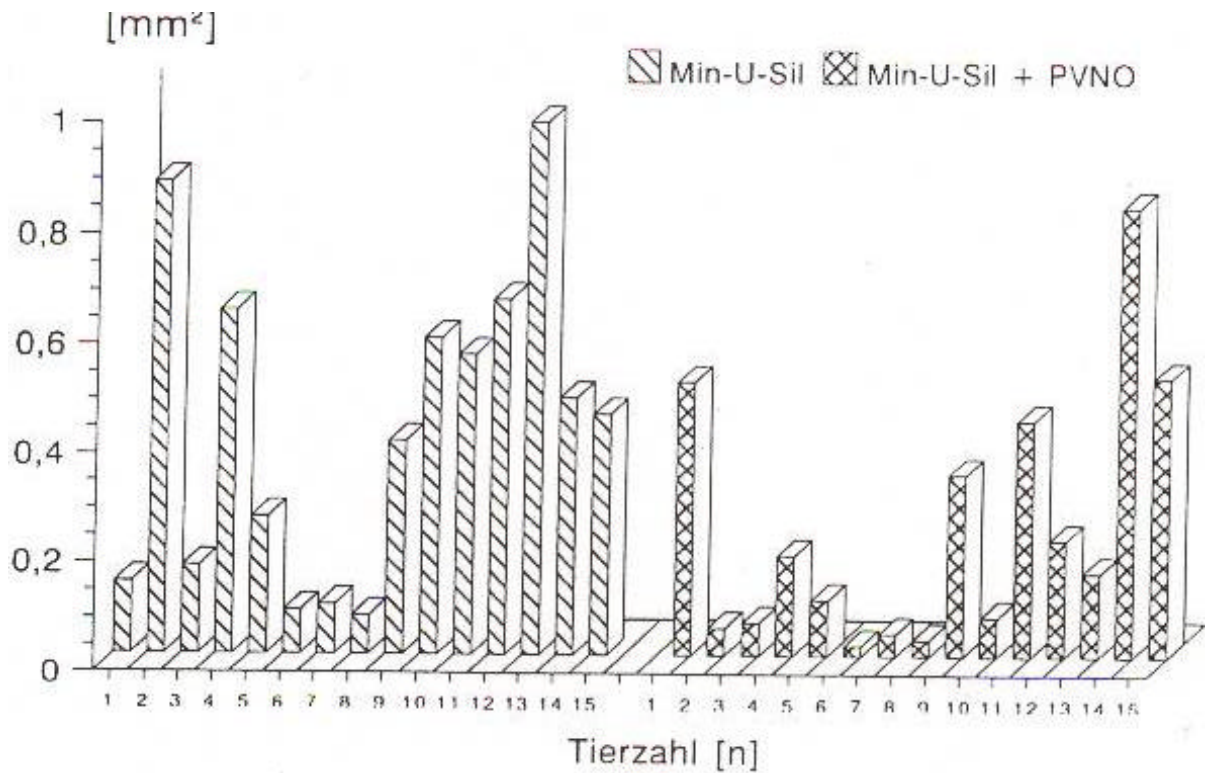


Abb. 22 : Morphometrisch ermittelte Ausdehnung der adenomatösen Hyperplasie pro 1 cm² Lungenschnittfläche nach i.tr. Applikation von Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.) bezogen auf die gesamte Lungenschnittfläche der Einzeltiere unabhängig davon, ob es sich um belüftetes oder unbelüftetes bzw. narbiges oder nicht fibrotisches Gewebe handelt

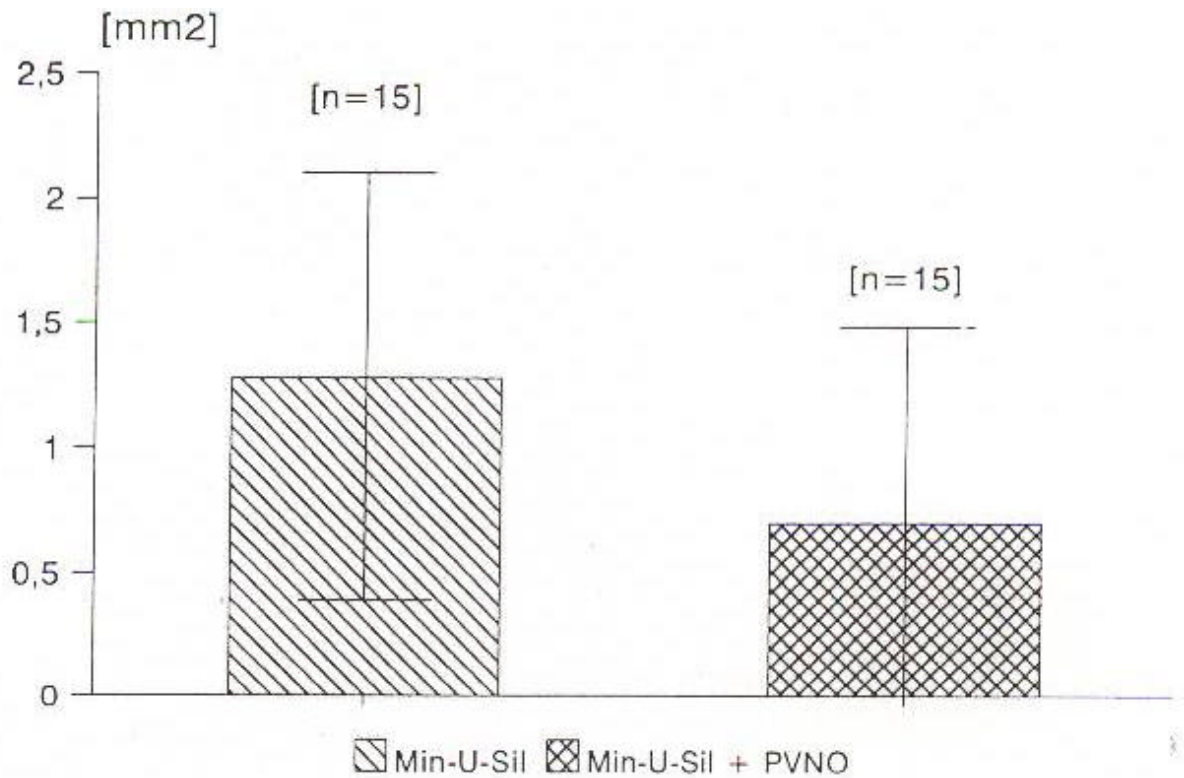


Abb. 23 : Morphometrisch ermittelte Ausdehnung der adenomatösen Hyperplasie pro 1 cm² Lungenschnittfläche im belüfteten Lungengewebe nach Behandlung mit Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.) bezogen auf die gesamte Versuchstiergruppe

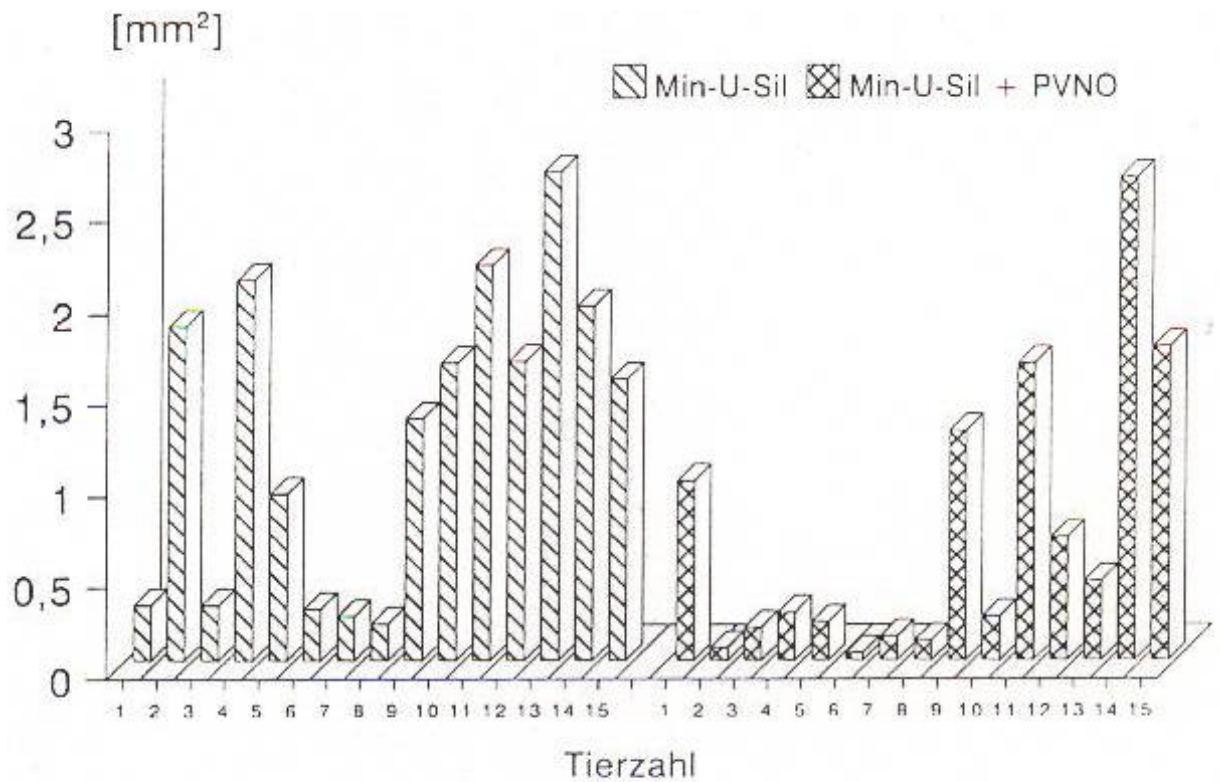


Abb. 24 : Morphometrisch ermittelte Ausdehnung der adenomatösen Hyperplasie pro 1 cm² Lungenschnittfläche im belüfteten Lungengewebe nach Behandlung mit Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.) bezogen auf die Einzeltiere (lineare Darstellung)

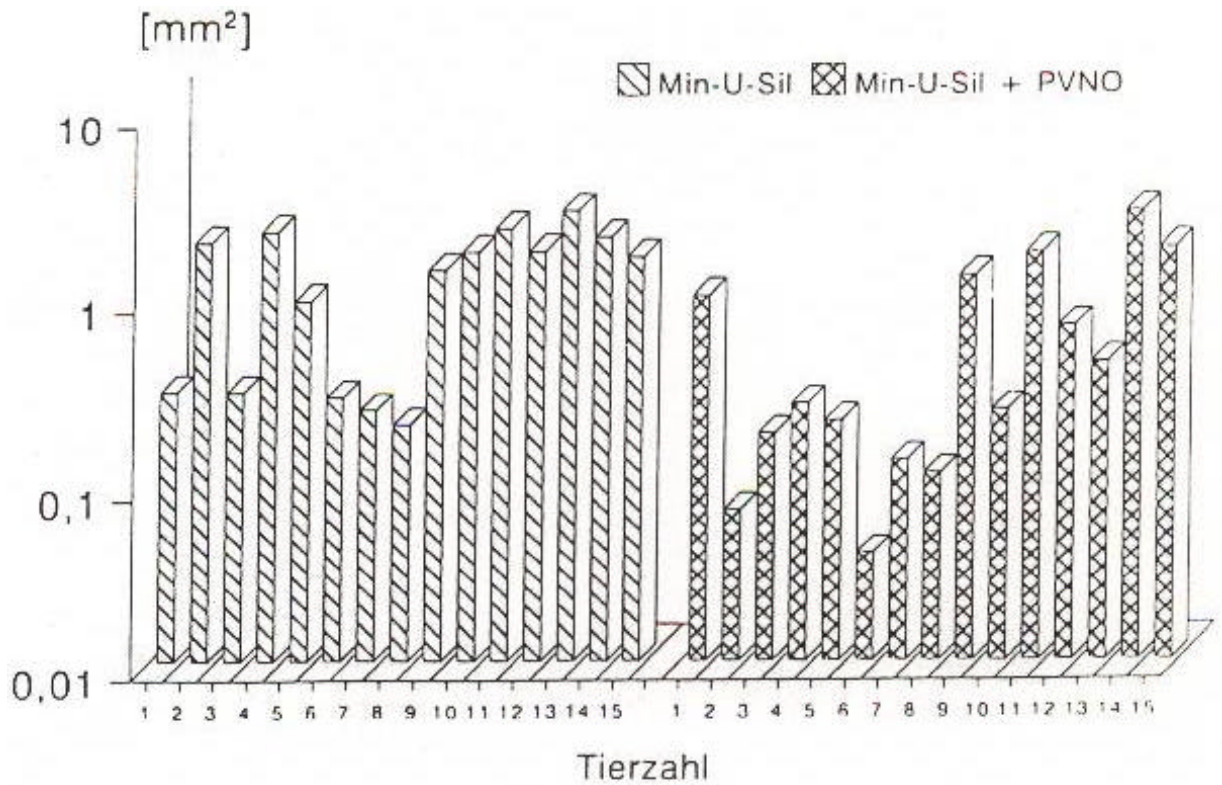


Abb. 25 : Morphometrisch ermittelte Ausdehnung der adenomatösen Hyperplasie pro 1 cm² Lungenschnittfläche im belüfteten Lungengewebe nach Behandlung mit Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.) bezogen auf die Einzeltiere (logarithmische Darstellung)

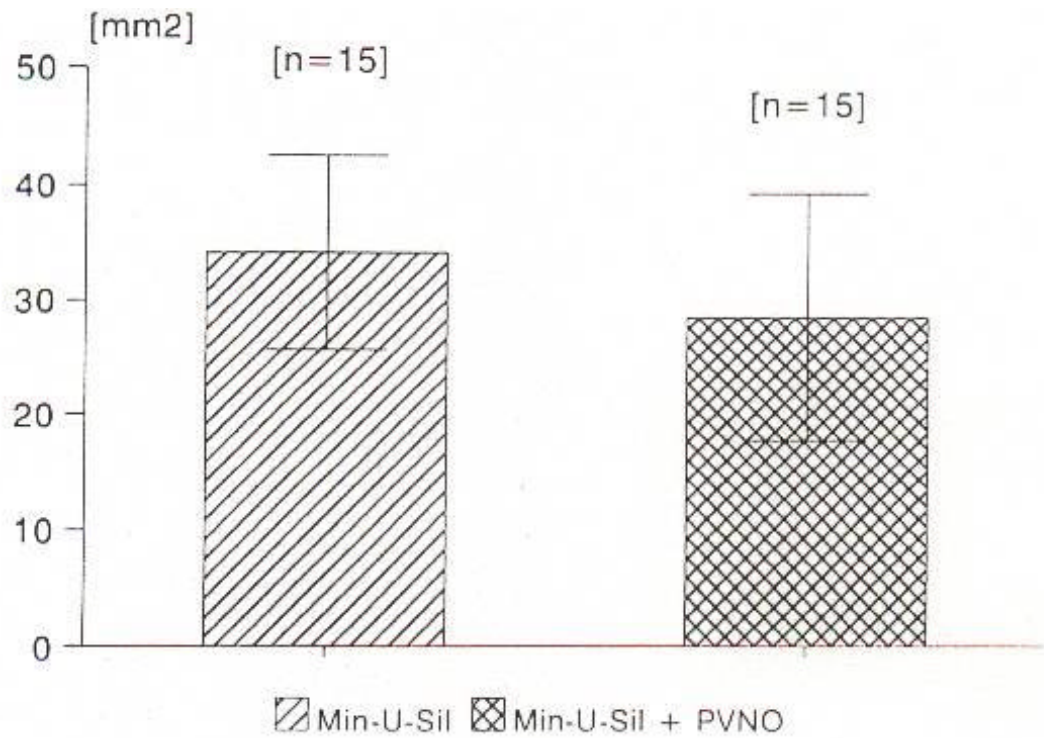


Abb. 26 : Morphometrisch ermittelte Ausdehnung des unbelüfteten Lungengewebes pro 1 cm² Lungenschnittfläche nach i.tr. Applikation von Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.) bezogen auf die gesamte Versuchstiergruppe

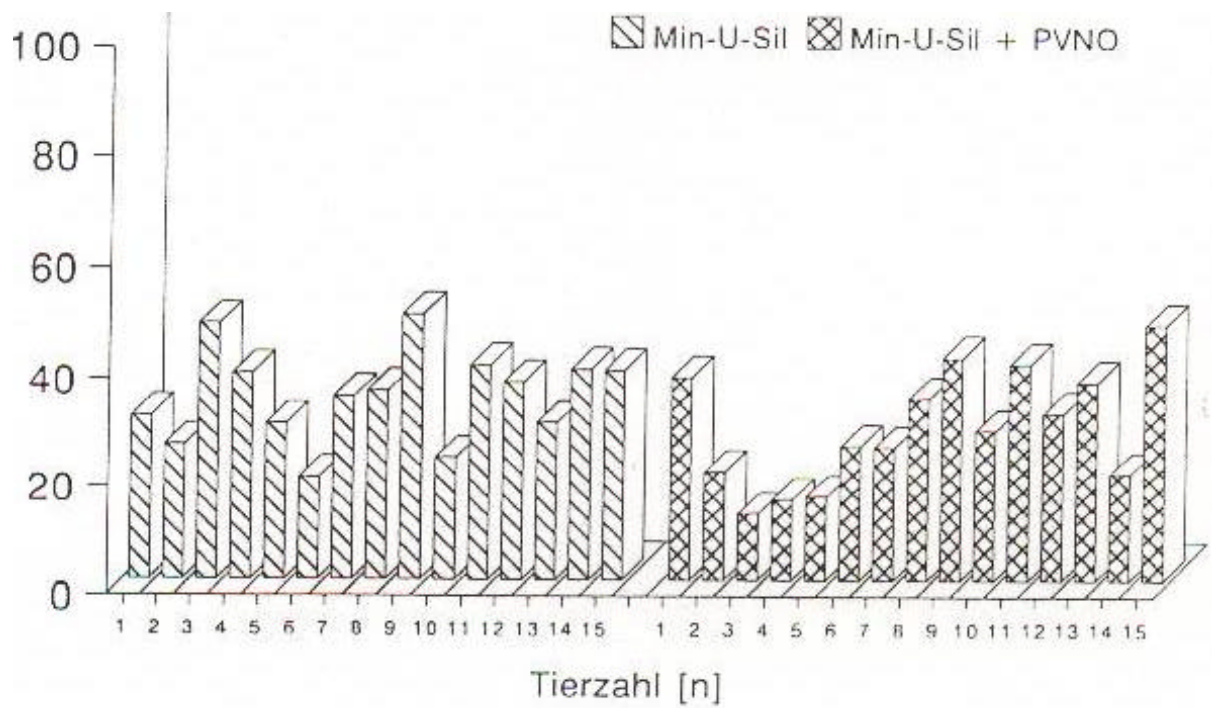


Abb. 27: Morphometrisch ermittelte Ausdehnung des unbelüfteten Lungengewebes pro 1 cm² Lungenschnittfläche nach i.tr. Applikation von Min-U-Sil und Min-U-Sil + PVNO (s.c.) bezogen auf die Einzeltiere

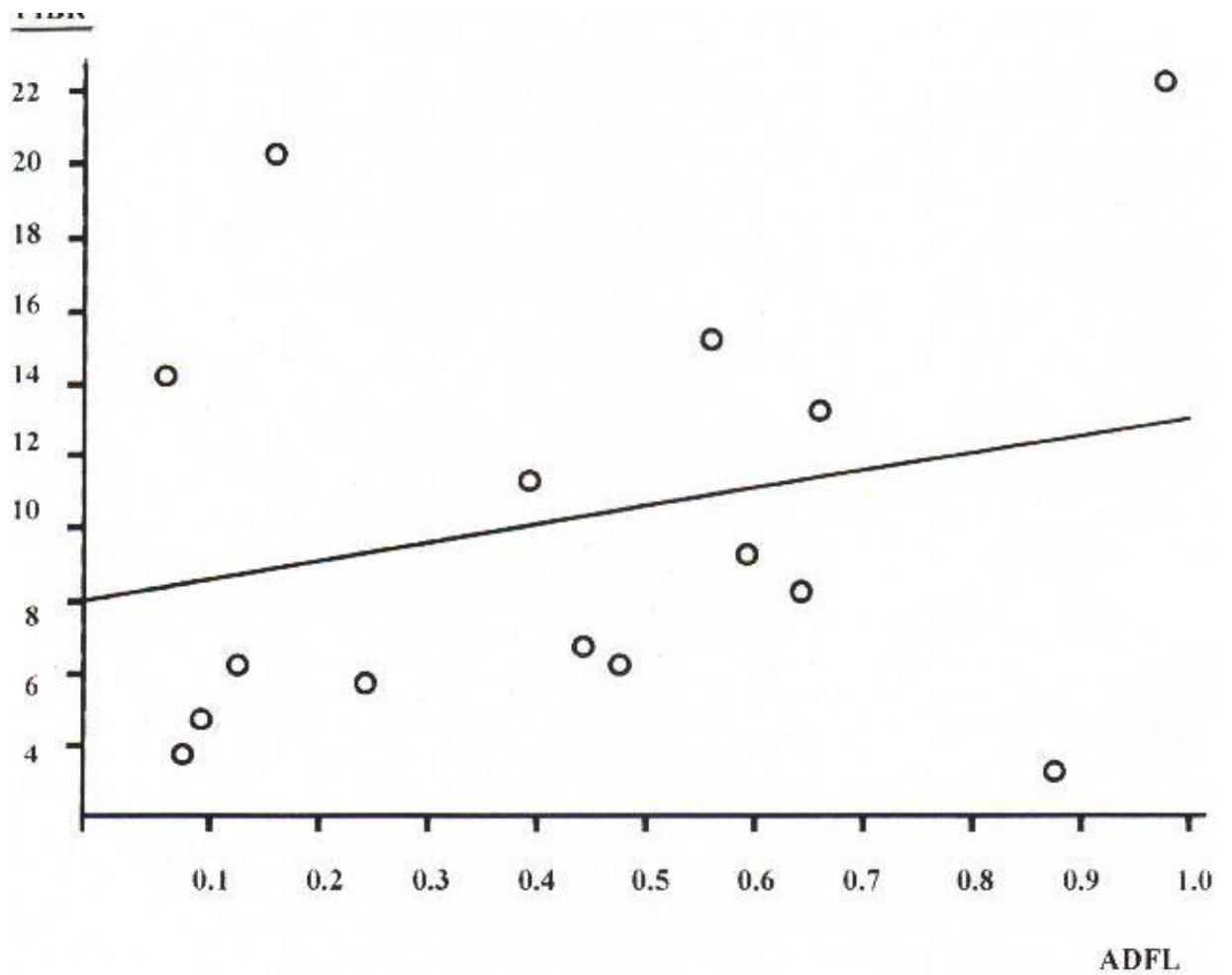


Abb. 28: Fibrose (FIBR) zur Fläche der adenomatösen Hyperplasie (ADFL) in 1 cm² Lungengewebe bei ausschließlich mit Quarz behandelten Versuchstieren ($r=0.22$, $p=0.4233$) mit Regressionsgeraden

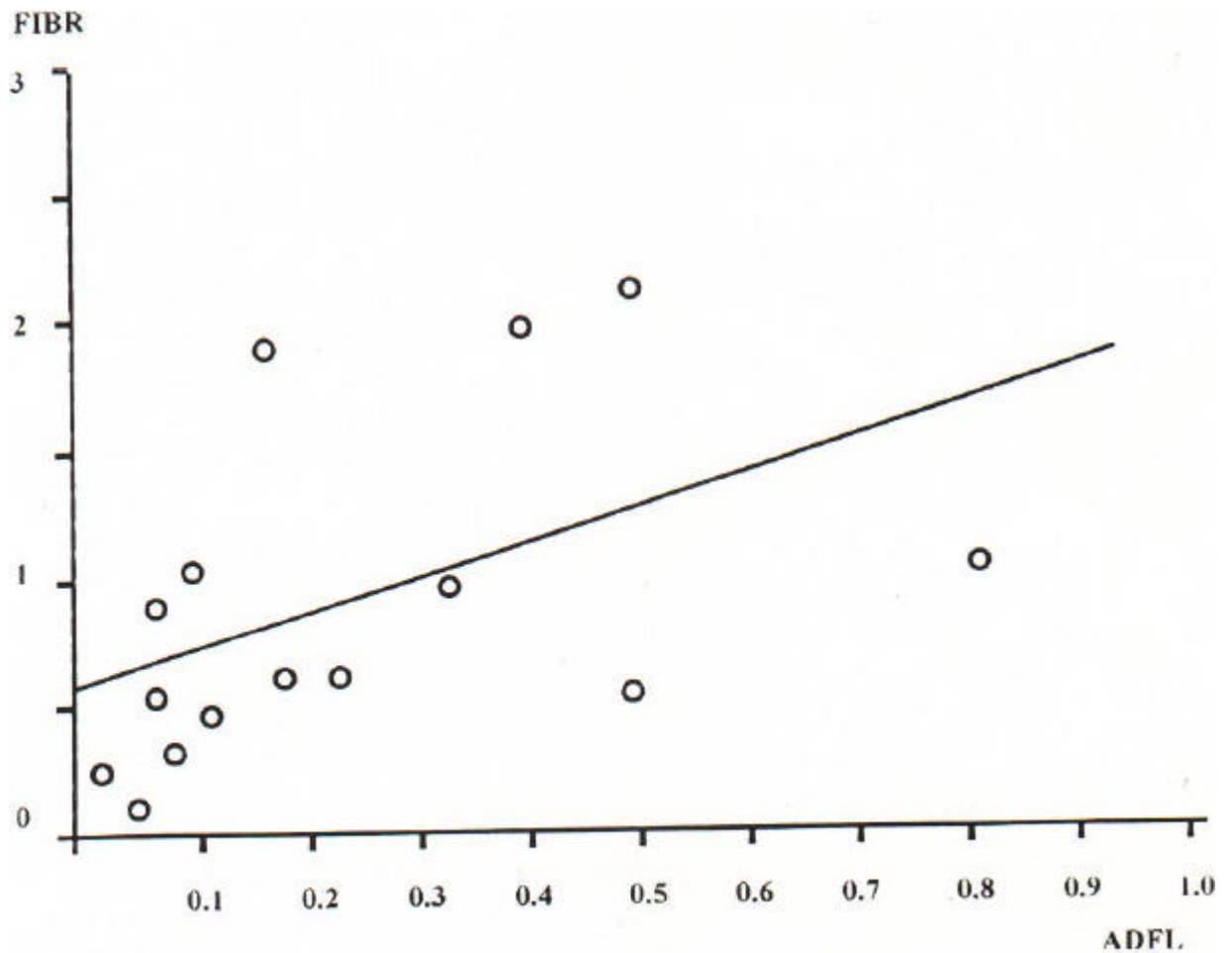


Abb. 29: Fibrose (FIBR) zur Fläche der adenomatösen Hyperplasie (ADFL) in 1 cm² Lungengewebe bei ausschließlich mit Quarz und PVNO behandelten Versuchstieren ($r=0.46$, $p=0.0841$) mit Regressionsgeraden

4. Diskussion

Nach den bisher vorliegenden Befunden führt die Quarzstaubinhalation bei Nagern im Gegensatz zu Befunden bei der chronischen Silikose des Menschen regelmäßig zu einer Alveolarproteinose (Abb. 4) mit reaktiver Hyperplasie der

Pneumozyten vom Typ II als Folge einer quarzstaubinduzierten Epithelschädigung (Hilscher et al., 1991; Kissler, 1983).

Beim Menschen tritt eine Alveolarproteinose im Verlauf akuter Silikosen nur nach hochdosierter Quarzstaubeinwirkung auf. Eine respiratorische Insuffizienz führt in der Regel in diesen Fällen bereits nach einigen Monaten zum Tode (Banks, 1986; Büchner u. Ansari, 1969; Hoffmann et al., 1973; Suratt et al., 1977; Zimmermann u. Sinclair, 1988). Die Entstehung bösartiger Lungentumoren beim Menschen kann daher nicht mit der Entwicklung einer Alveolarproteinose in Zusammenhang gebracht werden.

Die Überlebensrate von Ratten mit einer quarzinduzierten Alveolarproteinose ist dagegen im Vergleich zur behandelten Kontrollgruppe nicht signifikant reduziert (Hilscher et al., 1991; Thome u. Koep, 1991; Kissler, 1983). In den hochbelasteten Rattenlungen können daher reaktive Epithelveränderungen im Zusammenhang mit einer Alveolarproteinose über einen längeren Zeitraum hinweg zunehmen. Im Verlauf von mehreren Wochen bis Monaten kommt es zu einer Bronchialisierung des alveolären Lungenparenchyms, die im Schrifttum als bronchiolo-alveoläre Hyperplasie bezeichnet wird (Mohr, 1992).

An der bronchiolo-alveolären Endstrecke erfolgt eine Vermehrung von flachen bis kubischen, z.T. Zilien tragenden Epithelzellen. Die Alveolarwände in der Umgebung terminaler Bronchiolen sind von meistens einreihig hochprismatischen bis kubischen Epithelzellen ausgekleidet. Es kommt zum Verlust der rund-polygonalen Alveolarform. Da die Veränderung als Aussprossung terminaler Bronchiolen aufgefaßt werden können und einer glandulären Hyperplasie von Schleimhäuten ähneln, werden sie auch als adenomatösen Hyperplasie bezeichnet (Friemann et al., 1994).

Die erhöhte proliferative Aktivität bronchialer Epithelzellen ist eine wichtige Voraussetzung für die Tumorentstehung in der Rattenlunge (Friemann et al., 1994). Das vermehrte Auftreten bronchiolo-alveolärer Hyperplasien wird als präneoplastische Läsionen anerkannt. Diese Bronchial-epithelmetaplasie der Alveolardeckepithelzellen wird als Vorläufer von Lungenadenomen beschrieben (Mohr, 1992).

Sowohl Clarazellen als auch Typ-II-Pneumozyten werden als Ursprungszellen von Lungentumoren angesehen. Zwischen der bronchiolo-alveolären Hyperplasie und Adenomen gibt es Übergangsformen. Charakteristisch für eine bronchiolo-alveoläre Hyperplasie vom bronchiolären Typ ist eine Proliferation von Clarazellen. Eine bronchiolo-alveoläre Hyperplasie vom alveolären Typ ist durch eine Proliferation von Typ-II-Pneumozyten gekennzeichnet. Einige Tumoren in quarzstaubexponierten Rattenlungen weisen enge topographische Beziehungen zu adenomatös-hyperplastisch umgebauten Lungenarealen auf (Mohr, 1992).

In unserem Versuch erfolgte die morphometrische Auswertung der Gesamtfläche derartiger metaplastisch umgewandelter Alveolarepithelabschnitte, d.h. adenomatös-hyperplastischer Lungenbezirke.

Bei beiden von uns untersuchten Versuchstiergruppen läßt sich morphometrisch allerdings eine nur nicht signifikant unterschiedliche Ausprägung des Merkmals adenomatöse Hyperplasie nachweisen, obwohl die PVNO-Behandlung bekanntermaßen zu einer Reduktion der toxischen Quarzstaubwirkung und Alveolarproteinose führt (Schlipkötter et al., 1963).

In nicht mit PVNO behandelten Rattenlungen mit quarzstaubinduzierter Fibrose ist die adenomatöse Hyperplasie im Vergleich mit den mit PVNO behandelten Vergleichstiergruppen stärker ausgeprägt.

Es besteht daher die Möglichkeit, daß die beschriebenen Veränderungen im Bereich der terminalen Bronchiolen durch die quarzstaubinduzierte Lungenfibrose begünstigt wird.

Danach wäre eine interstitielle Fibrose ein die adenomatöse Hyperplasie begleitendes Phänomen, aber nicht das ursächlich entscheidende. Das ist nach den bisher vorliegenden Ergebnissen auch nicht zu erwarten, da die adenomatöse Hyperplasie auch früher einsetzt als eine Fibrosierung (Bruch u. Schlösser, 1977) und nicht mit den Fibrosearealen räumlich assoziiert ist. Sie muß als Folge der partikel-induzierten Epithelschädigung und nicht als Reaktion auf die Bindegewebsneubildung aufgefaßt werden.

Wenn die Ausdehnung der quarzstaubinduzierten Fibrose einen Einfluß auf die adenomatöse Hyperplasie gehabt hätte, wäre es nicht auszuschließen gewesen, daß ein Bezug der Meßwerte der Ausdehnung der bronchiolo-alveolären Hyperplasie auf die gesamte Lungenschnittfläche zu einer Fehlinterpretation der Befunde geführt hätte. Es hätte z.B. eine stärker entwickelte adenomatöse Hyperplasie außerhalb fibrotischer Lungenbezirke in ausschließlich quarzexponierten Lungen unerkant bleiben können, wenn man davon ausgeht, daß die adenomatös-hyperplastischen Areale sekundär in die Fibroseareale inkorporiert und damit nicht in die Messung eingegangen wären.

Die geringere Ausprägung dieses Merkmals in der mit Quarz und PVNO behandelten Versuchsgruppe scheint die durch Quarzstaub induzierte Lungentumorraten nicht zu beeinflussen.

Beide Tiergruppen entwickelten im Langzeitversuch Lungentumoren. Die Tumorfrequenz der beiden Min-U-Sil-Gruppen mit und ohne PVNO waren praktisch gleich hoch. Etwa 70% der Ratten entwickelten Lungentumoren (Pott et al., 1991).

- 46 -

Bei den Untersuchungen von Weller et al. (1967, 1971) entstanden nach chronischer P204-Applikation Polymertumoren ausschließlich an der Applikationsstelle, jedoch niemals an den Ablagerungsorten der Substanz in den Organen. Das läßt darauf schließen, daß diese Substanz am Zustandekommen der Lungentumoren keinen Anteil hatte. Obwohl der Fibroseanteil in den mit PVNO behandelten Rattenlungen geringer ausfiel als in den mit Quarzstaub behandelten Lungen (Joos et al., 1987; Schlipkötter u. Brockhaus, 1963; Schlipkötter u. Sklen-sky, 1994/95; Grundmann u. Schlipkötter, 1969; Pott et al., 1968; Schlipkötter und Brockhaus, 1961), war infolge einer kräftig entwickelten Desquamativpneumonie bei den mit PVNO behandelten Versuchstieren die Ausdehnung des für den Gasaustausch zur Verfügung stehenden, ausreichend belüfteten alveolären Lungenparenchyms in beiden Gruppen gleich beschaffen.

Nach den hier vorgestellten Untersuchungsbefunden besteht zwischen der Entwicklung und Inzidenz der bronchiolo-alveolären Hyperplasie als Vorstufe experimenteller quarzstaubinduzierter Lungentumoren und der Intensität der silikotischen Narbenbildung offensichtlich keine signifikante Korrelation d.h. kein ursächlicher Zusammenhang.

In der Humanpathologie wird die Entwicklung eines silikotischen Narbenkarzinoms direkt mit einer lokalen Reizwirkung silikotischen

Narbgewebes auf die Bronchialschleimhaut in Zusammenhang gebracht (Müller u. Reitemeyer, 1986; E. Reitemeyer, 1986).

Bei gleicher Tumorrates im Langzeitversuch (Pott et al., 1991) fällt die silikotische Narbenbildung bei den mit Min-U-Sil-Quarz und PVNO behandelten Versuchstieren wie oben erwähnt geringer aus als in der Vergleichstiergruppe. Die Entwicklung adenomatös-hyperplastischer Lungenareale und die Ausdehnung silikotischer Narben sind bei der Ratte nicht signifikant korreliert. Die mit und ohne PVNO-Behandlung quarzexponierten Tiere weisen zwar eine gleiche Tumorrates auf, jedoch tritt nach PVNO-Behandlung ein größerer Anteil maligner Tumoren auf, was wahrscheinlich an der längeren Überlebensdauer liegt (Pott et al., 1991; W.Weller, 1971). Sowohl die quarzstaubinduzierte Alveolarproteinose als auch die adenomatöse Hyperplasie treten als regelmäßige Begleiterscheinung in quarzbehandelten Lungen mit manifesten Lungentumoren auf.

- 47 -

Zusammenfassend müssen die morphometrischen Untersuchungen zur Ausdehnung adenomatös-hyperplastischer Lungenareale nach Quarzstaubbehandlung so interpretiert werden, daß bei der Entstehung der experimentellen Rattenlungentumoren - anders als man es beim Menschen bisher beobachtet hat - der silikotischen Narbe offensichtlich nicht die Bedeutung eines sogenannten Krebsrealisationsfaktors zukommt. Dieser Umstand eröffnet neue Perspektiven für die pathologisch-anatomische Aufarbeitung staubexponierter Lungen des Menschen, da zukünftig der präneoplastischen Potenz von Epithelveränderungen der bronchiolo-alveolären Endstrecke auch außerhalb silikotischer Störfelder mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden muß. Ferner sollten die dargestellten

Untersuchungsergebnisse Veranlassung sein, die Übertragung tierexperimenteller Untersuchungen zur lungenkarzinogenen Wirkung von Quarz auf den Menschen kritisch zu überprüfen.

Es besteht die Möglichkeit, daß die experimentellen Lungentumoren bei der Ratte evtl. als Regenerationskrebs nach Überdosierung aufzufassen sind. Vielleicht fällt die Entscheidung zur Tumorentstehung dabei auf molekular chromosomaler Ebene bereits schon kurze Zeit nach der massiven Staubexposition. Gegebenenfalls werden hier bereits sehr früh Gendefekte gesetzt, die später nicht mehr reparaturfähig sind. Letztendlich könnten nur Analysen von Chromosomenstrangbrüchen, die teilweise nach Quarzstaubexposition der Lunge durchgeführt werden können, zur endgültigen Klärung der Frage beitragen (IARC, 1997).

- 48 -

5. Zusammenfassung

Bei Ratten führt eine hoch dosierte intratracheale und inhalative Quarzstaubapplikation regelmäßig über eine Alveolarproteinose in Kombination mit einer dosis- und zeitabhängigen Zunahme der Pneumozytenproliferationsrate und chronische Cholesterinpneumonie mit interstitieller Fibrose zu einem progredienten Lungenumbau mit bronchioloalveolärer Epithelhyperplasie (bzw. adenomatöser Hyperplasie der terminalen Bronchiolen), die als präneoplastische Läsion anerkannt ist und als Vorläufer von Lungenadenomen beschrieben wird. Wir sind mit unserer Untersuchung der Frage nachgegangen, ob die quarzstaubinduzierte interstitielle Lungenfibrose bei Ratten ähnlich wie beim Menschen mit potentiellen Tumorstufen

assoziiert ist, oder ob sie für die Entstehung experimenteller Lungentumoren nach Quarzstaubeinwirkung keine Rolle spielt. Es soll die Frage beantwortet werden, ob im Tierexperiment ein morphologisches Korrelat zum sogenannten silikotischen Narbenkarzinom wie beim Menschen besteht.

Vor diesem Hintergrund erfolgte die morphometrische Auswertung an Lungenschnittpräparaten (mittlere Schnittdicke 3-5 µm) von 30 Wistar-Ratten aus der Versuchsreihe (Versuch 86/12) von Herrn Professor Pott und wurde mit dem Ziel durchgeführt, herauszufinden, ob die durch PVNO reduzierte Fibrose auch mit einer Verminderung präneoplastischer Veränderungen einhergeht. Die Ratten wurden unter SPF-Bedingungen gezogen und waren bei Versuchsbeginn ca. 15 Wochen alt, mit einem Durchschnittsgewicht von 185 g. Sie wurden unter CO₂-Narkose getötet oder verstarben spontan. Für unsere Untersuchungen wählten wir Versuchstiere, die in einem Alter von 66-129 Wochen verstorben waren. Wir werteten 15 Lungenpräparate der Min-U-Sil-Quarz-Gruppe mit und 15 Lungenpräparate ohne PVNO-Behandlung aus. Den Versuchstieren wurden jeweils 3 mg Staub wöchentlich über 15 Wochen intratracheal instilliert. Die PVNO-Versuchstiergruppe erhielt zusätzlich 7 Injektionen subcutan von je 2ml einer 2%igen PVNO-Lösung in NaCl im Abstand von jeweils 4 Monaten, beginnend einen Tag vor der ersten Staubinstillation. Als Kontrollgruppe dienten 10 Versuchstiere, denen 15x0,4ml 0,9% NaCl-Lösung intratracheal appliziert worden waren.

- 49 -

Es wurden sowohl aus diesem Versuchsvorhaben vorliegende mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnittpräparate, die später mit Siriusrot umgefärbt wurden, als auch zusätzlich archivierte Feuchtmaterial, das gezielt im Bereich makroskopisch tumorfreier Areale zugeschnitten wurde, verwandt.

Bei der morphometrischen Auswertung wurden folgende Parameter bestimmt:

1. Gesamtfläche des Epithels in adenomatös-hyperplastischen Lungenabschnitten
2. Gesamtfläche des „nicht atmenden Lungengewebes“
3. Fläche der insgesamt ausgewerteten Lungenabschnitte (ohne Bronchien, Gefäße und Tumorgewebe)
4. Fläche der Fibrosebezirke

Die Untersuchungen zeigten, daß die Entwicklung adenomatös-hyperplastischer Lungenareale und die Ausdehnung silikotischer Narben bei der Ratte nicht signifikant korrelieren. Durch die mehrmalige intratracheale Staubapplikation werden Epitheldefekte gesetzt, die zu einem progredienten Lungenumbau führen, der sich in der mit PVNO behandelten Gruppen nicht signifikant von der unbehandelten Gruppe unterscheidet. Das morphologische Korrelat einer Reparation dieser Epithelschädigung, nämlich die adenomatöse Hyperplasie, ist aber in der mit PVNO behandelten Versuchstiergruppe - wenn auch nicht signifikant - in geringerer Ausprägung vorhanden. Hieraus kann auf einen protektiven Effekt von PVNO bezüglich dieser Läsionen geschlossen werden, wie er hinsichtlich der Membranstabilisierung von Makrophagen bereits mehrfach beschrieben wurde. (E. Grundmann, 1967; J. Bruch, 1973; J. Bruch, J. W. Schlösser, 1977; H. Idel, 1981; M. R. Joos, J. Bruch, B. Rehn, I. Hille, 1987). Der protektive PVNO-Effekt auf die Epithelzellen der terminalen Bronchiolen und die alveolären Deckzellen reicht jedoch in diesem Tiermodell offensichtlich nicht aus, um die Entstehung von Tumoren zu verhindern.

Anders als beim Menschen ist die Tumorentwicklung bei der Ratte offensichtlich unabhängig von einer quarzstaubinduzierten Fibrose, die in der einen Versuchsgruppe durch die PVNO-Behandlung weitgehend verhindert wurde.

6. Anhang

6.1. Abkürzungen

| | | |
|----------|---|--|
| ADFL | = | Adenomatöse Hyperplasie (mm ²) |
| ADANZ | = | Anzahl der getrennt liegenden Areale der adenomatösen Hyperplasien |
| UMF | = | Umfänge der einzelnen Areale der adenomatösen Hyperplasien (mm) |
| NATFL | = | Nicht atmendes Lungengewebe (ohne Tumoren) (mm ²) |
| PRFL | = | Präparatesamtfläche ohne große Bronchien, ohne Tumoren (cm ²) |
| FIBR | = | Fibroseanteile (mm ²) (ASM) in den Bezirken des nicht atmenden Lungengewebes am Gleichen Präparat nach Umfärbung mit Siriusrot |
| ADBELU | = | Prozentualer Anteil der adenomatösen Hyperplasie am belüfteten Lungengewebe |
| ADFLCM2 | = | Adenomatöse Hyperplasie in 1 cm ² Lungengewebe (%) |
| ADANZCM | = | Anzahl der adenomatösen Hyperplasie in 1 cm ² Lungengewebe (%) |
| UMFCM2 | = | Umfänge der adenomatösen Hyperplasie in 1 cm ² Lungengewebe (%) |
| BELU | = | Belüftetes Lungengewebe = Präparatefläche minus Fläche nicht atmendes Lungengewebe |
| ADBELU | = | Prozentualer Anteil der adenomatösen Hyperplasie am belüfteten Lungengewebe |
| FIBRCM2 | = | Fibroseanteil in 1cm ² Lungengewebe |
| ADFLFIBR | = | Prozentualer Anteil der adenomatösen Hyperplasie an der Fibrose |
| TNR | = | Tiernummer |
| Q | = | Gruppe Quarz |
| P | = | Gruppe PVNO |

Lf.Nr. = Laufende Nummer

- 51 -

6.2 Tabelle ausgewertete Tiergruppen und ausgemessene Flächen

| Lf.Nr. | Gruppe | TNR | ADFL | ADANZ | UMF | NATFL | PRFL | FIBR |
|---------------|---------------|------------|-------------|--------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | q | 59093 | 0.7008 | 208 | 59.88 | 57.54 | 1.95 | 17.91 |
| 2 | q | 59093 | 1.8200 | 395 | 141.37 | 38.94 | 2.33 | 21.11 |
| 3 | q | 59193 | 0.3990 | 85 | 31.67 | 32.23 | 2.05 | 23.04 |
| 4 | q | 59193 | 2.2100 | 226 | 115.79 | 154.05 | 2.65 | 45.67 |
| 5 | q | 59293 | 1.4000 | 230 | 89.85 | 76.23 | 1.93 | 13.42 |
| 6 | q | 59293 | 0.6850 | 122 | 50.84 | 40.11 | 1.25 | 26.44 |
| 7 | q | 59393 | 2.4300 | 472 | 173.70 | 64.39 | 2.17 | 31.58 |
| 8 | q | 59393 | 1.3600 | 187 | 94.02 | 49.22 | 1.73 | 47.68 |
| 9 | q | 59493 | 1.9100 | 243 | 83.54 | 136.17 | 2.77 | 22.73 |
| 10 | q | 59493 | 0.4700 | 91 | 37.60 | 58.36 | 2.23 | 10.69 |
| 11 | q | 59593 | 1.3800 | 281 | 102.53 | 84.15 | 2.43 | 12.25 |
| 12 | q | 59593 | 0.5200 | 92 | 33.32 | 84.09 | 1.92 | 18.02. |
| 13 | q | 1330 | 0.2100 | 96 | 39.36 | 48.41 | 1.60 | 10.11 |
| 14 | q | 1332 | 1.3800 | 399 | 170.02 | 39.84 | 1.60 | 6.21 |
| 15 | q | 1333 | 0.1600 | 41 | 27.67 | 44.69 | 0.95 | 19.25 |
| 16 | q | 2283 | 1.2900 | 454 | 158.26 | 77.86 | 2.04 | 17.13 |
| 17 | q | 2284 | 0.6500 | 155 | 117.20 | 73.61 | 2.55 | 14.37 |
| 18 | q | 2285 | 0.2300 | 143 | 53.03 | 53.62 | 2.85 | 11.87 |
| 19 | q | 2286 | 0.1600 | 68 | 33.57 | 59.65 | 1.76 | 8.72 |
| 20 | q | 2287 | 0.1300 | 60 | 23.95 | 61.18 | 1.75 | 24.64 |
| 21 | q | 2288 | 0.6800 | 304 | 129.72 | 84.88 | 1.74 | 19.26 |
| 22 | p | 59693 | 1.2100 | 141 | 64.83 | 69.00 | 2.48 | 1.52 |
| 23 | p | 59693 | 0.2600 | 55 | 21.19 | 108.74 | 1.87 | 2.54 |
| 24 | p | 59793 | 0.2600 | 27 | 12.11 | 58.33 | 2.59 | 2.37 |
| 25 | p | 59793 | 0.0880 | 8 | 5.64 | 76.58 | 2.28 | 2.41 |
| 26 | p | 59893 | 1.8500 | 350 | 147.86 | 125.36 | 2.52 | 3.21 |
| 27 | p | 59893 | 0.1100 | 19 | 8.31 | 57.89 | 1.97 | 5.70 |
| 28 | p | 59993 | 0.5300 | 236 | 62.62 | 74.21 | 1.54 | 0.67 |
| 29 | p | 59993 | 0.4000 | 93 | 30.95 | 60.01 | 2.80 | 1.80 |
| 30 | p | 60093 | 0.2960 | 37 | 28.62 | 48.17 | 1.11 | 5.13 |
| 31 | p | 60093 | 0.2500 | 62 | 20.85 | 81.90 | 2.44 | 1.73 |
| 32 | p | 60193 | 2.1200 | 260 | 117.66 | 50.58 | 2.58 | 2.73 |
| 33 | p | 60293 | 1.4900 | 230 | 94.10 | 140.11 | 2.98 | 2.62 |
| 34 | p | 60293 | 0.3300 | 49 | 22.36 | 26.98 | 0.57 | 4.91 |
| 35 | p | 1334 | 0.6140 | 293 | 118.28 | 45.65 | 1.22 | 0.49 |
| 36 | p | 1335 | 0.0610 | 27 | 12.09 | 25.50 | 1.28 | 0.68 |
| 37 | p | 2292 | 0.1560 | 47 | 24.32 | 29.43 | 2.43 | 0.59 |
| 38 | p | 2293 | 0.2200 | 47 | 31.25 | 17.39 | 1.18 | 0.67 |

| | | | | | | | | |
|----|---|------|--------|----|-------|-------|------|------|
| 39 | p | 2294 | 0.1800 | 39 | 28.67 | 26.49 | 1.73 | 0.65 |
| 40 | p | 2296 | 0.0270 | 11 | 5.43 | 35.24 | 1.42 | 0.27 |
| 41 | p | 2297 | 0.1000 | 34 | 18.09 | 57.69 | 2.35 | 1.99 |
| 42 | p | 2298 | 0.0730 | 37 | 14.78 | 71.65 | 2.13 | 0.11 |

- 52 -

6.3 Statistiktabelle

Gruppe = Quarz

| Variable | N | Mean | Std Dev | Minimum | Maximum |
|----------|----|-------------|-------------|------------|-------------|
| ADFL | 15 | 0.8354933 | 0.5628069 | 0.1300000 | 1.8950000 |
| ADANZ | 15 | 202.4000000 | 126.5310803 | 41.0000000 | 454.0000000 |
| UMF | 15 | 83.9890000 | 47.9898680 | 23.9500000 | 170.0200000 |
| NATFL | 15 | 65.4320000 | 18.3586581 | 39.8400000 | 97.2650000 |
| PRFL | 15 | 1.9696667 | 0.4793093 | 0.9500000 | 2.8500000 |
| FIBR | 15 | 18.4533333 | 8.9994646 | 6.2100000 | 39.6300000 |
| ADFLCM2 | 15 | 0.4246962 | 0.2889051 | 0.0742857 | 0.9717949 |
| NATFLCM2 | 15 | 34.0768676 | 8.4512852 | 18.8140351 | 48.7816092 |
| ADANZCM2 | 15 | 104.8631841 | 69.9423493 | 34.2857143 | 249.3750000 |
| UMFCM2 | 15 | 43.7458683 | 26.7969908 | 13.6857143 | 106.2625000 |
| BELU | 15 | 131.5346667 | 41.9776607 | 50.3100000 | 231.3800000 |
| ADBELU | 15 | 0.6484231 | 0.4170034 | 0.0994036 | 1.3712508 |
| FIBRCM2 | 15 | 9.9322034 | 5.4141419 | 3.8812500 | 20.3230769 |
| ADFLFIBR | 15 | 5.2456105 | 5.2072522 | 0.5282406 | 22.2222222 |

Gruppe = Quarz + PVNO

| Variable | N | Mean | Std Dev | Minimum | Maximum |
|----------|----|------------|------------|------------|-------------|
| ADFL | 15 | 0.4725333 | 0.5539952 | 0.0270000 | 2.1200000 |
| ADANZ | 15 | 96.5666667 | 90.9503135 | 11.0000000 | 293.0000000 |
| UMF | 15 | 42.0193333 | 36.5262078 | 5.4300000 | 118.2800000 |
| NATFL | 15 | 54.9140000 | 24.3042055 | 17.3900000 | 91.6250000 |
| PRFL | 15 | 1.9296667 | 0.4804777 | 1.1800000 | 2.5800000 |
| FIBR | 15 | 1.6990000 | 1.3955634 | 0.1100000 | 4.4550000 |

| | | | | | |
|--------------|----|-------------|------------|------------|-------------|
| ADFLCM2 | 15 | 0.2360222 | 0.2363824 | 0.0190141 | |
| 0.8217054 | | | | | |
| NATFLCM2 | 15 | 28.3623610 | 10.7750345 | 12.1111111 | |
| 47.0676056 | | | | | |
| ADANZCM2 | 15 | 53.2170380 | 59.8116281 | 7.1868583 | 240.1639344 |
| UMFCM2 | 15 | 23.2846198 | 23.8015984 | 3.6447639 | |
| 96.9508197 | | | | | |
| BELU | 15 | 138.0526667 | 41.2925114 | 76.3500000 | |
| 213..5700000 | | | | | |
| ADBELU | 15 | 0.3558830 | 0.3592551 | 0.0252904 | |
| 1.0220808 | | | | | |
| FIBRCM2 | 15 | 0.8496409 | 0.6640330 | 0.0516432 | |
| 2.1211268 | | | | | |
| ADFLFIBR | 15 | 34.3703957 | 32.8190140 | 5.0251256 | |
| 125.3061224 | | | | | |

- 53 -

The SAS System

Variable: FIBRCM2

| <u>Gruppe</u> | <u>N</u> | <u>Mean</u> | <u>Std Dev</u> | <u>Std Error</u> |
|---------------|----------|-------------|----------------|------------------|
| Quarz | 15 | 9.93220343 | 5.41414189 | 1.39792543 |
| Quarz+PVNO | 15 | 0.84964092 | 0.66403304 | 0.17145259 |

Variance T DF Prob>ITI

| | | | |
|---------|--------|------|--------|
| Unequal | 6.4489 | 14.4 | 0.0001 |
| Equal | 6.4489 | 28.0 | 0.0000 |

Variable: BELU

| <u>Gruppe</u> | <u>N</u> | <u>Mean</u> | <u>Std Dev</u> | <u>Std Error</u> |
|---------------|----------|--------------|----------------|------------------|
| Quarz | 15 | 131.53466667 | 41.97766066 | 10.83858538 |
| Quarz+PVNO | 15 | 138.05266667 | 41.29251142 | 10.66168060 |

| Variance | T | DF | |
|--------------------|----------|-----------|--------|
| Prob>ITI | | | |
| Unequal | -0.4287 | 28.0 | 0.6714 |
| Equal | -0.4287 | 28.0 | 0.6714 |

- 54 -

Variable: ADBELU

| Gruppe | N | Mean | Std Dev | Std Error |
|---------------|----------|-------------|----------------|------------------|
| Quarz | 15 | 0.64842310 | 0.41700345 | 0.10766983 |
| Quarz+PVNO | 15 | 0.35588296 | 0.35925511 | 0.09275927 |

| Variiances | T | DF | Prob> ITI |
|-------------------|----------|-----------|---------------------|
| Unequal | 2.0585 | 27.4 | 0.0492 |
| Equal | 2.0585 | 28.0 | 0.0490 |

Variable: ADFLCM2

| Gruppe | N | Mean | Std Dev | Std Error |
|---------------|----------|-------------|----------------|------------------|
| Quarz | 15 | 0.42469615 | 0.28890511 | 0.07459498 |
| Quarz +PVNO | 15 | 0.23602221 | 0.23638243 | 0.06103368 |

| Variance | T | DF | |
|--------------------|----------|-----------|--------|
| Prob>ITI | | | |
| Unequal | 1.9576 | 26.9 | 0.1179 |
| Equal | 1.9576 | 28.0 | 0.0603 |

Variable: NATFLCM2

| Gruppe | N | Mean | Std Dev | Std Error |
|---------------|----------|-------------|----------------|------------------|
| Quarz | 15 | 34.07686759 | 8.45128521 | 2.18211246 |
| Quarz+PVNO | 15 | 28.36236096 | 10.77503452 | 2.78210195 |

Variance T DF **Prob>ITI**

| | | | |
|---------|--------|------|--------|
| Unequal | 1.6162 | 26.5 | 0.1179 |
| Equal | 1.6162 | 28.0 | 0.1173 |

Variable: ADFLFIBR

| Gruppe | N | Mean | Std Dev | Std Error |
|---------------|----------|-------------|----------------|------------------|
| Quarz | 15 | 5.24561047 | 5.20725216 | 1.34450673 |
| Quarz+PVNO | 15 | 34.37039572 | 32.81901404 | 8.47383299 |

Variance T DF **Prob>ITI**

| | | | |
|---------|---------|------|--------|
| Unequal | -3.3946 | 14.7 | 0.0041 |
| Equal | -3.3946 | 28.0 | 0.0021 |

7. Literaturverzeichnis

1. Albrecht, C., Mogilevski, G., Breuer, P., Althoff, G.-H., Friemann, J.:
Untersuchungen zur Morphogenese präneoplastischer Veränderungen in
Rattenlungen nach Applikation quarzhaltiger Stäube.

Silikosebericht Nordrhein-Westfalen Band 20: 251-265 (1998)

2. Amandus, H.E., Shy, C., Castellan, R.M., Blair, A., Heinemann, E.F.:
Silicosis and lung cancer among workers in North Carolina dusty trades.
Scand. J. Work. Environ. Health 21 suppl. 2: 81-83 (1995)
3. Ames, B., Amandus, M., Attfield, M., Green, F:
Does Coal Mine Dust Present a Risk of Lung Cancer?
A Case-Control Study of U.S.Coal Miners.
Archives of Environmental Health 38: 331-333 (1983)
4. Banks, D.E.:
Acute silicosis.
DHHS NIOSH publication, 86-102: 239-241 (1986)
5. Borm, P.J.A. and Driscoll, K.:
Particles, inflammation and respiratory tract carcinogenesis.
Toxicol. Letters 88(1-3):109-113 (1996)
6. Bruch, J.:
Die Vermehrung der Pneumozyten Typ II unter dem Einfluß von Quarz
Silikosebericht Band 9: 99-112,173-180 (1973)
7. Bruch, J., Schlösser, J.W.:
Zellpopulation in den Alveolen der Rattenlungen nach Inhalation von Quarz
und ihrer Beeinflussung durch PVNO.
Silikosebericht Band 11: 175-192 (1972)

8. Büchner, H.A., Ansari, A.
Acute silico-proteinosis. A new pathologic variant of acute silicosis in sand-blasters, characterized by histologic features resembling alveolar proteinosis.
Dis. Chest., Vol.55 No.4:274-284 (1969)
9. Chekoway, H., Heyre, N., Demers, P., Breslow, N.:
Mortality among workers in the diatomaceous earth industry.
British Journal of industrial medicine 50: 586-597 (1993)
10. Craighead, J.:
Do silicia and asbestos cause Lung cancer?
Arch Pathol Lab Med 116:16-20 (1992)
11. Craighead, J., Kleinerman, J.:
Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals.
Arch Pathol Lab Med 112: 673-720 (1989)
12. Driscoll, K.E ., Deyo, L.C., Carter J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.C.,
Bertram, T.A.:
Effects of particleelicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar
epithelial cells.
Carcinogenesis;18 (2); 423-430; (1997)
13. Driscoll, K.E., Lindenschmidt, R.C., Maurer, J.K., Higgins, J.M., Ridder, G.:
Pulmonary response to silica or titanium dioxide:
Inflammatorycells alveolar macrophage-derived cytokines and histopathology
Am.J.Resp.Cell Mol. Biology;2;382-390 (1990)

14. Dungworth, D, Mohr, U., Heinrich, U., Ernst, H., Kittel, B.:
Pathologic Effects of Inhaled Particles in Rat Lungs:
Associations between inflammatory and neoplastic processes.
Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract (Ed.
By U.Mohr)
ILSI Press (Washington): 75-98 ; (1994)

15. Erdgdu, G., Hasirci, V.:
A overview of the role of mineral solubility in silicosis and asbestosis.
Enviromental Research, Section A 78: 38-42 (1998)

16. Friemann, J., Friedrichs, K., Dunemann, L., Pesch, B., Pott, F.,
Schlipkötter, H.W.:
Krebsrisiko durch Asbest-Möglichkeiten und Grenzen der Präventivmedizin.
Atemw.-Lungenkrkh.20: 89-97 (1994)

17. Friemann, J., Pott, F., Wilk, K., Ahrens, O., Rosenbruch, M., Hilscher, W.,
Schlipkötter, H.W.:
Pulmonary alveolar proteinosis in rats after administration of quartz:
Its possible role in morphogenesis og lung cancer.
Journal cancer Res Clin Oncol 120: 348-353 (1994)

18. Friemann, J.,Breuer, P.,Weishaupt, C.,Grover, R., Althoff, G.H., Schlip-
kötter, H.W.:
Type II cell hyperplasia and bronchiolo-alveolar hyperplasia as possible
Praeneoplastic conditions in rats treated with mine dust and quartz.
In: I.Eddington (ed.) Towards health and safety at work.
Technical papers of the asia pacific conference on occupational health
Safety: 451-456 (20.-22.09.1995, Brisbane,Australia)

19. Friemann, J., Wilk, B., Rosenbruch, M., Hilscher, W., Schlipköter, H.-W.:
Tierexperimentelle Untersuchungen zur quarzstaubinduzierten Pneumoyten-
Proliferation.
Atemw.-Lungenkrankh.9: 385-387 (1993)
20. Goldsmith, D., Guidotti, T., Johnston, D.:
Does occupational exposure to silica cause lung cancer?
Am. J. Ind Med 3: 423-440 (1982)
21. Goldsmith, D., Ruble, RP., Klein, CO.:
Comparative cancer potency for silica from extrapolations of human and animal
findings
Scand. J. Work Environ Health 21 suppl 2: 104-107 (1995)
22. Goldsmith, D., Beaumont, J., Morrin, L., Schenker, M.:
Respiratory cancer and other chronic disease mortality among silicotics in
California.
Am J Ind Med. 4: 459-467 (1995)
23. Goldsmith, D.:
The link between silica dust levels, risk assessments, and regulations.
J-Expo-Anal-Environ-Epidemiol. 7: 385-395 (1997)
24. Goldstein, B., Rendall, R.E.G.:
The prophylactic use of Polyvinylpyridine-N-oxide (PVNO) in baboons ex-
posed to quartz dust
Environmental Research 42: 469-481 (1987)

25. Groth, D.H., Stettler, L.E., Platek, S.F., LAL, J.B., Burg, J.R.:
Lung tumors in rats treated with quartz by intratracheal instillation.
In:Goldsmith,D.F.,Winn,D.M.,Stiy,C.M. (eds):
Silicia, silicosis and cancer 24: 243-253 (1986)

- 59 -

26. Grünspan, M., Antweiler, H.:
Die Lungenspeicherung des PVNOs und deren Bedeutung für die Fibrose-
hemmung im Tierexperiment.
Silikosebericht Band 8: 191-194 (1971)
27. Grundmann, E.:
Experimentelle Untersuchungen über die zelluläre Speicherung des PVNOs:
Fortschr. Staublungenforsch. Bd.2 Hrsg.H.Reploh u. Einbrodt, H.J.:
223-226 (1967)
28. Grundmann, E., Schlipköter, H.-W.:
Über die Rückbildung experimenteller silikotischer Granulome unter Poli-
vinylpyridin-N-Oxid:
Verh.dtsch. Ges.Path.: 367-370 (1969)
- 29 Hilscher, W., Rosmanith, J., Thome, E., Koep,D.:
Morphometrische Untersuchungen an den Lungen und Lymphknoten von
Ratten nach intratrachealer Instillation quarzhaltiger Stäube zur Erfassung
Der minimalen Dosis.
In:Ergebn. Unters. Geb. Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenberg-
Bau Silikosebericht NRW 18: 223-238 (1991)

30. Hilscher, W., Rosmanith, J., Grover, R., Weishaupt, C., Friemann, J.:
Morphometrische Untersuchungen an Rattenlungen sechs und zwölf Monate nach intratrachealer Instillation dreier Fraktionen des Grubenstaubes H1-Do9 aus der unteren Dorstener Schicht und einer Fraktion des Grubenstaubes H1-Do3 aus der unteren Wittener Schicht.
In: Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau, Bd. 19 Hrsg. Ministerium für Wirtschaft, Mittelstand und Technologie des Landes NRW, DMT-Gesellschaft für Forschung und Prüfung mbH, Essen: 321-330 (1995)

- 60 -

31. Hilscher, W.:
Staublungenforschung:
Umwelthygiene Jahresbericht Band 23: 14-19 (1990/91)
32. Hnizdo, E., Sluis-Cremer, G.K.:
Silica exposure, silicosis, and lung cancer: a mortality study of South African gold miners
Brit. J. of Industr. Med. 48: 53-60 (1991)
33. Hoffmann, E.O., Lamberty, J., Pizzolato, P., Coover, J.:
The ultrastructure of acute silicosis.
Arch. Pathol. 96: 104-107 (1973)
34. Holland, L.M., Gonzales, M., Wilson, J.S., Tillery, M.I.:
Pulmonary effects of shale dusts in experimental animals.
In: Wagner, W.L., Rom, W.N., Merchant, J.A.: (eds): "Health issues released

To metal and nonmetallic mining“
Boston Butterworth: 485-496 (1983)

35. Holland, L.M., Wilson, J.S., Tillery, M.I., Smith, D.M.:
Lung cancer in rats exposed to fibrogenic dusts.
In:Goldsmith,D.F.,Winn,D.M.,Shy,C.M.,(eds):
„Silicia,silicosis cancer“ New York,Praeger: 267-279 (1986)
36. Holland, L.:
Crystalline Silica and lung cancer:
A review of recent experimental evidence.
Regulatory toxicology and pharmacology 12: 224-237 (1990)
- 37 IARC Working Group
IARC Monographs on the evaluation of crcinogenic risks to humans
International Agency for Research on Cancer, Lyon Vol. 52: 21-22; (1991)
- 61 -
38. IARC Working Group
Silica and some silicates.
IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals
to Humans:
International Agency for Research on Cancer,Lyon Vol 42: 73-142; (1987)
39. IARC Working Group
Silica
IARC Monographs on the evaluation of cacinogenic risks to humans
International Agency for Research on Cancer, Lyon Vol.68: 195-211; (1997)

40. Idel, H.:
Die Überprüfung der Schutzwirkung von PVNO im Phagozytostest
Silikosebericht Band 13: 285-295 (1981)
41. Johnson, N.F., Smith, D.M., Sebring, R., Holland, L.M.:
Silicia induced alveolar cell tumors in rats.
American Journal of Industrial Medicine 11: 93-107 (1987)
42. Joos, M.R., Bruch, J., Rehn, B., Hille, I.:
Unterschiede der Hemmbarkeit der Histotoxischen Reaktion auf Quarz und
Grubenstaub durch PVNO.
Silikosebericht Band 16: 223-228 (1987)
43. Kawada, H., Horiuchi, T., Shannon, J.M., Kuroki, Y., Voelker, D.R.,
Mason, R.:
Alveolar Type II-Cells, Surfactant Protein A, and the Phospholipid
Components of Surfactant in Acute Silicosis in the Rat.
Am Rev. Respir. Dis. 140: 460-470 (1989)

- 62 -

44. Kissler, W.:
Formal genesis of pulmonary fibrosis: experimental investigations.
In: Müller, K.M. (Hrsg.). Pulmonary Diseases. Clinicopathological Correlations.
Springer Verlag: 207-231 (1983)
45. Klerk de, N., Musk, A., Tetlow, S., Hansen, J.:
Preliminary study of lung cancer mortality among Western Australian gold
miner exposed to silica.

- Scand. J. Work Environ. Health 21 suppl.2: 66-68 (1995)
46. Merlo, F., Doria, M., Fontana, L., Ceppi, M., Chesi, E., Santi, L.:
Mortality from specific causes among silicotic subjects:
A historical prospective study.
In: Simonato, L., Fletcher, A.C., Saracchi, R., Thomas, T.L. (Eds.)
Occupat. Exposure to silica and cancer risk: 105-115 (1990)
47. Miller, B.G., Jacobson, M.:
Dust exposure, pneumoconiosis, and mortality of coalminers.
British Journal of Industrial Medicine 42: 723-733 (1985)
48. Mohr, U.:
International classification of rodent tumors.
Part 1: The rat. 1. Respiratory system.
In: IARC Scientific Publications No. 122: 31-32 (1992)
49. Morfeld, P., Pietarski, C.:
Epidemiologische Erkenntnisse zur kanzerogenen Wirkung von
Steinkohlengrubenstäuben.
Silikosebericht Nordrhein-Westfalen Band 20: 281-324 (1998)
- 63 -
50. Müller, K.M., Reitemeyer, E.:
Lungentuberkulose und Lungenkrebs aus der Sicht des Pathologen
Öff. Gesundheitswesen. 48: 481-487 (1986)
51. Muhle, H., Takenata, S., Mohr, U., Dasenbrock, C., Mermelstein, R.:

- Lung tumor induction upon long-term low-level inhalation of crystalline silica.
Am. J. Industr. Med. 15: 343-346 (1989)
52. Oberdörster, G., Yu, C.P.:
The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust: A particle effect?
J. Aerosol Sci., Vol.21: 397-401 (1990)
53. Oellig, W.P., Böhm, E., Schejbal, V., Löbecke, F.:
Sektionsbefunde nach PVNO-Behandlung d. menschlichen Anthrasilikose
Beitrag für Silikoseforschung Band 27: 65-75 (1975)
54. OSTP (Office of science and technology policy):
Guidelines on assessing chemical carcinogens (50FR 10372, March 14,1985).
A review of the science and its associated principles. Chapter 3: Long term
carcinogen bioassay.
Bureau of national affairs, Washington D.C.: 2040-2049 (1985)
55. Pairon, J.C., Brochard, P., Jaurand, M.C., Bignon, J.:
Silica and lung cancer: A controversial issue.
Eur. Respir. Journal 4: 730-744 (1991)
56. Pott, F., Dehnen, W., Brockhaus, A.:
Der Abbau von Kollagen bei der experimentellen Silikose nach Behandlung
mit Polyvinylpyridin-N-Oxid in Abhängigkeit von der Dosis.
Beitr. Klein.Tuberk. 141: 259-267 (1970)

57. Pott, F., Schlipkötter, H.W., Brockhaus, A.:

- Tierexperimentelle Grundlagen zur medizinischen Silikoseprophylaxe mit Polivinylpyridin-N-Oxid (P204)
Dtsch. Med. Wschr. Band 93: 2479-2482 (1968)
58. Pott, F.:
Testing the carcinogenicity of fibers in laboratory animals: Results and conclusions
Warheit, D. (Hrsg.) Contemporary Issues in Fiber Toxicology. New York, London:
Academic Press: 395-424 (1993)
59. Pott, F., Dungworth, D., Heinrich, U., Muhle, H., Kamino, K., Roller, M., Rippe, R., Mohr, U.:
Lung tumors in rats after intratracheal instillation of dusts.
British Occupational Hygiene Society, 7th Symposium on inhaled particles
Edinburgh,
16.-20- Sep.1991,
Ann. Occup. Hyg. 38: 357-363 (1994)
60. Pott, F., Roller, M., Althoff, G.H.:
Krebsrisiko durch Fasern –ein zusammenfassender Vergleich von epidemiologischen und tierexperimentellen Daten.
In: Gesellschaft zur Förderung der Lufthygiene und Silikoseforschung e.V. (Hrsg.)
Umwelthygiene Jahresbericht 94/95, Band 27, Stefan Albers Verlag,
Düsseldorf 1995:133-189 (1994/95)
61. Reitemeyer, E.:
Silicose und Bronchialcarcinom. Pathogenetische Aspekte zum sogenannten Narbencarcinom der Lunge.
Inaugural Dissertation. Universität Bochum. (1986)

62. Reitemeyer, E., Müller, K.-M.:
Anthrasilikose der Lungen und Lungenkrebs.
Kompaß 9: 409-411 (1986)
63. Schlipköter, H.-W., Brockhaus, A.:
Die Hemmung der experimentellen Silikose durch subcutane Verabreichung von
Polivinyl-N-Oxid.
Klin. Wschr. Band 39: 1182-1189 (1961)
64. Schlipköter, H.-W., Sklensky, B.:
Polivinylpyridin-N-oxide (PVNO) and his antifibrotic action in experimental
and clinical observation.
Wissenschaftliche Konferenz der Medizinischen Fakultät der Masaryk Uni-
versität am 12.11.94 in Brno, Techechien. Vortrag.
Umwelthygiene Jahresbericht Band 27: 391-392 (1994/95)
65. Simonato, L., Saracci, R.:
Epidemiological aspects of the relationship between exposure to silica dust
and lung cancer.
Occupational Exposure to Silica and Cancer risk (Ed. by L.Simonato,IARC):
1-5 (1990)
66. Suratt, P.M., Washington, C.W., Brody, A.R., Bolton, W.K., Giles, R.D.:
Acute silicosis in tobstone sandblasteers.
Am. Rev. Respir. Dis.115: 521-529 (1977)
67. Ulmer, W.T.:

Die Silikose: Entwicklung einer Krankheit

Pneumokoniose Konferenz, Bochum Volume 1: 75-83 (1983)

- 66 -

68. Weller, W.:

Über die erhöhte Tumorfrequenz nach Inhalation von Poly-2-vinylpyridin –N-Oxid.

Zschr. Ges.exp. Med. Band 154: 235-246 (1971)

69. Weller, W., Grundmann, E., Könn, G., Schlipköter, H.W., Ulmer, W.T.:

Polymertumoren bei Ratten nach subcutaner Injektion von Poly-2-vinyl-pyridin-N-Oxid.

Fortschr. Staublungenforsch. Band 2: 213-218 (1967)

70. Weller, W.:

Rückbildung silikotischer Granulome im Peritonealtest an Ratten unter P 204 Injektion.

Bericht über die V. Internationale Staublungentagung in Münster: 243-247 (1967)

71. Zimmermann, P.V., Sinclair, R.A.:

Rapidly progressive fatal silicosis in young man.

Med. J.: Of Australia: 704-706 (1988)

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Friemann für die Bereitstellung des Themas und für seine Unterstützung und wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch den technischen Mitarbeitern der Abteilung für Umweltpathologie, insbesondere Frau Grover und Frau Weishaupt.

LEBENS LAUF

Gabriele Isensee, geb. Musinski

Biographische Daten

Geboren: 30.03.1961 in Köln als Tochter des Buchhalters Jan Musinski und seiner Ehefrau Brigitte, geb. Hannig

Familienstand: verheiratet

Konfession: römisch-katholisch

Ausbildungsgang:

1980 Abitur am Städt. Gymnasium Köln-Mülheim,

Genovevastrasse

Studium der Pharmazie an der Friedrich-Wilhelms-Universität in
Bonn

- 1982 Wechsel zum Studium der Humanmedizin an die Universität
Köln
- 1983 Ärztliche Vorprüfung
- 1986 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1987 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Beginn des Praktischen Jahres am Städt.
Krankenhaus Leverkusen mit dem Wahlfach
Anästhesiologie
- 01.12.1988 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Januar 1989-
Januar 1990 Beginn der Ausbildungsphase als Ärztin im Praktikum
bei Herrn Dr. med Waurick, Arzt für Innere Medizin und
Rheumatologie, in Köln
- Januar 1990-
Juni 1990 Ärztin im Praktikum bei Herrn Dr. med. Anhut, Arzt für
Allgemeinmedizin, in Köln
- Juli 1990 Approbation als Ärztin
- Sept. 1990-
April 1992 Internistisch-chirurgische Ausbildung als Assistenzärztin
im St.-Willibrod-Spital in Emmerich / Rees

| | |
|------------------|--|
| April 1992 | Internistische Ausbildung als Assistenzärztin in der |
| Dez. 1992 | Fabricius-Klinik in Remscheid |
| Januar 1993- | Assistenzärztin bei Herrn Dr. med. Yildiz, Arzt für |
| Juli 1993 | Chirurgie, in Köln |
| Juli 1993- | Chirurgische Ausbildung als Assistenzärztin im |
| Dez. 1993 | St.-Agatha-Krankenhaus in Köln |
| Seit Januar 1994 | Selbständige Ärztin in eigener Praxis |
| Juli 1994 | Heirat mit Herrn Dr. Dr. Ulrich Isensee |
