

## **Über Veränderungen des Mengenverhältnisses von Kollagen Typ I und III im interlobulären Lungeninterstitium beim plötzlichen Kindstod – eine Pilotstudie**

**S. Ogbuihi und P. Zink**

Gerichtlich-medizinisches Institut der Universität Bern, Bühlstrasse 20, CH-3012 Bern, Switzerland

### **On Changes in the Ratio of Pulmonary Interlobular Interstitial Collagen Types I and III in Sudden Infant Death – a Pilot Study**

**Summary.** In a blind study the interlobular interstitial connective tissue in paraffin embedded lung sections from 45 autopsy cases aged under 2 years (23 SIDS and 22 Non-SIDS) were investigated with the aim of determining the collagen type I : type III ratio by means of polarimetric evaluation. Sections were stained with Resorcin-Fuchsin for elastin fibres, Celestine Blue/Mayer's Haematoxylin for nuclear details and with Solophenyl Red 3 BL in saturated picric acid solution for the differential staining of type I and type III collagen fibres for polarization microscopy. The type I fibres were orange and the type III fibres green in colour. The spectral distribution of the coloured polarized light from the sections was determined and peaks were evident at the wavelengths 590 nm for the orange coloured light of type I and 490 nm for the green coloured light of type III collagen. With corresponding filters the intensities of the orange and green emissions were separately measured at several points adjacent to lymphatic vessels. The ratio collagen I/III, deduced from the ratio of the intensities of orange to green light, was significantly higher in the SIDS-group than in the Non-SIDS-group ( $\alpha = 0.001$ ) due to the increase in the amount of collagen type I and could indicate an insidious fibrosis resulting from lymphostasis.

**Key words:** Sudden infant death syndrome, pulmonary fibrosis – Pulmonary-collagen types I and III, quantitative evaluation (fibrosis SIDS)

**Zusammenfassung:** Die vorliegende Pilotstudie befaßt sich mit der Untersuchung des Bindegewebes im interlobulären Lungeninterstitium. Die Lungen stammten von 45 Sektionsfällen von Kindern unter 2 Jahren, davon

waren 23 SIDS-Fälle und 22 Fälle mit bekannter Todesursache (Non-SIDS-Gruppe). Von den Lungen wurden großflächige Paraffinschnitte angefertigt und mit Solophenyl Rot 3 BL in gestättigter wässriger Pikrinsäurelösung gefärbt, wonach im polarisierten Licht die Typ-I-Kollagenfasern orange (Peak bei 590 nm), die Typ III-Kollagenfasern grün (Peak bei 490 nm) leuchten. Im Blindversuch wurde jeweils an mehreren Stellen des interlobulären Interstitiums in der unmittelbaren Umgebung von dilatierten Lymphgefäßen die Menge von Kollagen Typ I und Typ III gemessen und daraus das Mengenverhältnis von Kollagen I/III errechnet. Dieser Quotient I/III ist eine Meßgröße für fibrosierende Vorgänge und war infolge Vermehrung von Kollagen Typ I bei der SIDS-Gruppe signifikant höher als bei der Non-SIDS-Gruppe ( $\alpha = 0,001$ ). Es ist denkbar, daß bei den SIDS-Fällen ein lokaler Lymphstau zu einer schleichenden Fibrose geführt hat.

**Schlüsselwörter:** Plötzlicher Kindstod, Lungenfibrose – Kollagen Typ I und III, quantitative Bestimmung – Lungenfibrose, SIDS

Bei vielen fibrosierenden Lungenveränderungen ist eine absolute Zunahme des Gesamtgehaltes an Kollagen nicht obligat (Thomas 1978; Burkhardt und Gebbers 1983), charakteristisch sind jedoch Verschiebungen des Verhältnisses von Kollagen Typ I und Typ III (Crystal et al. 1978; Madri und Furthmayr 1980; Reiser und Last 1981). Deswegen gilt das Mengenverhältnis von Kollagen I und III als wichtige Meßgröße bei der Prüfung der Frage, ob fibrosierende Vorgänge abgelaufen sind.

Nachdem bei SIDS-Fällen bereits früher im Lungeninterstitium Ödeme beschrieben worden sind (Althoff 1980; Berg und Kijewski 1978; Valdes-Dapena 1986), fanden sich zusätzlich Hinweise auf fibrotische Vorgänge im ödematösen Lungengerüst. Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der Frage einer Faserneubildung durch quantitative Erfassung von Kollagen Typ I und Typ III. Sie beschränkt sich auf das interlobuläre Interstitium in der unmittelbaren Umgebung von dilatierten Lymphgefäßen.

## Material und Methode

Die untersuchten Lungen stammen von 45 Kindern unter 2 Jahren – 23 SIDS-Fälle (14 männlich und 9 weiblich) im Alter zwischen 21 und 605 Tagen sowie 22 Vergleichsfälle (11 männlich und 11 weiblich) im Alter zwischen 1 und 630 Tagen. Die Todesursachen der Vergleichsfälle sind in der Tabelle 1 (a) aufgelistet.

Die Lungen wurden in toto in 4% gepuffertem Formalin bei gleichzeitiger druckloser intrabronchialer Formalin-Instillation immersionsfixiert. Nach Durchfixation wurde von jedem Lungenlappen eine ganze Scheibe von etwa 5–8 mm Dicke herausgeschnitten und in einen hilusnahen und einen peripheren Teil geteilt. Beide Teile wurden zur Paraffineinbettung getrimmt und 5  $\mu$  dick geschnitten. Von beiden Schnitten wurden zusammen je etwa 3/4 der gesamten Lungenlappenscheibe erfaßt. Bei der überwiegenden Zahl der Fälle wurden sämtliche Lungenlappen in die Untersuchung einbezogen, so daß 10 Präparate vorlagen. Die Präparate wurden nach Färbung der elastischen Fasern mit Resorcin-Fuchsin und der Kerne mit Celestin Blau mit Solophenyl Rot 3 BL in gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung (0,1 g/100 ml)

60 min bei pH 1,25 gefärbt. Es handelt sich um eine normierte Färbemethode für die Polarisationsmikroskopie zur quantitativen Erfassung der Mengenverhältnisse von Kollagen Typ I: Typ III. Einzelheiten der Methode sind an anderer Stelle beschrieben (Ogbuishi et al. 1988). Für die Messung wurden die Präparate in den Strahlengang eines Leitz Orthoplan Mikroskops bei vollständig gekreuzten Nicols gebracht, als Lichtquelle diente eine Halogenlampe (FCR 12 V 100 W) bei Trafoeinstellung 11 Volt. Von dem in den Phototubus eintretenden Gesamtlicht wurden mit einem Interferenzverlauffilter (S-200 Schott) die für die Messung nötigen Wellenlängenbereiche herausgeschnitten und deren Lichtintensität mit einem Photomultiplier (RCA Typ 4832) in einen elektrischen Strom umgesetzt, der mit einem Mikrovoltmeter (Keithley Typ 177) gemessen wurde.

Pro Fall wurden 120–240 mal folgende Messungen vorgenommen:

1. Intensität des orangen Lichtes bei 590 nm, die der Menge des Kollagen I im gewählten Ausschnitt entspricht, und jeweils im selben Bildausschnitt
2. Intensität des grünen Lichtes bei 490 nm, die der Menge des Kollagen III entspricht.

Zur histologischen Untersuchung und Messung wurden die Präparate in der Weise codiert, daß zu jedem Fall eine Nummer gehörte. Die Codierung wurde bis zum Abschluß der Messungen unter Verschuß gehalten. Von jedem Fall (Codenummer) wurden 3–4 einzelne Präparate zufällig ausgewählt. An diesen Präparaten wurde im interlobulären Interstitium die unmittelbare Umgebung von 6–12 Lymphgefäßen untersucht, die in ödematösem Bindegewebe eingebettet lagen und ein deutliches Lumen erkennen ließen. Nach Kline 1969 sind in formalfixierten und paraffineingebetteten Präparaten Lymphgefäße dann als gestaut anzusehen, wenn ein Lumen zu beobachten ist; nicht gestaute Lymphgefäße sind dagegen kollabiert. Um jedes dieser Lymphgefäße wurden stets an 20 verschiedenen Stellen bei 40-facher Objektivvergrößerung die Lichtintensitäten in den Wellenlängenbereichen von 490 und 590 nm gemessen. Auf diese Weise wurden pro Fall 120–240 Messpaare (490/590 nm) erhalten, die gemittelt wurden und in der Tabelle aufgeführt sind.

Die Meßwerte sind der durchschnittlichen Menge von Kollagen I bzw. Kollagen III im perilymphangischen Bindegewebe der Präparate proportional. Die Menge Kollagen im histologischen Schnitt hängt auch von der Schnittdicke und Schrumpfungsvorgängen beim Fixieren und Aufarbeiten ab. Bei der hier gewählten standardisierten Technik der Schnittherstellung dürften diese Faktoren auf die Höhe der Meßwerte allerdings keinen bedeutsamen Einfluß haben, wie sich auch aus der verhältnismäßig geringen Streuung der Meßwerte ergab. Nach den Messungen wurde der Code entschlüsselt und die Meßwerte den Sektionsnummern zugeordnet. Aus den Mittelwerten der Intensitäten der grünen Polarisation für das Kollagen Typ III und der orangen Polarisation für das Kollagen Typ I wurde je Sektionsfall das Verhältnis Kollagen I/III berechnet.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle aufgeführt. Es handelt sich um Meßwerte, die ausschließlich aus der topographischen Region des interlobulären pulmonalen Interstitiums stammen. Die ausgewählten Abschnitte lagen stets in der unmittelbaren Umgebung von dilatierten Lymphgefäßen.

## Diskussion der Ergebnisse

Bei der vorliegenden Arbeit geht es um die Frage, ob bei den SIDS-Fällen am Lungeninterstitium Hinweise für fibrotische Vorgänge objektiviert werden können.

Dabei lag der Gedanke zugrunde, daß fokale Lymphostasen die Ursache für schleichende Faserneubildung sein könnten, wie bei den parasitären Lymphangiomen oder beim Zustand nach Lymphknotenextirpationen. Lymphgefäße finden sich in verschiedenen topographischen Lokalisationen innerhalb des pulmonalen Interstitiums – pleural, interlobulär, peribronchial, periarteriell und perivenös. Für die Untersuchung wurde die topographische Region ausgewählt, die die stärksten Lymphbahndilationen zeigte, nämlich das interlobuläre Interstitium (Ogbuihi und Zink 1987). Das interlobuläre Interstitium zieht praktisch radiär vom Hilus bis zur Pleura durch das Lungengewebe. Um einen repräsentativen Anteil des interlobulären Interstitiums der Untersuchung zugrundelegen zu können, wurden große hilusnahe und distale Flachschnitte verwendet, die jeweils etwa 3/4 der Schnittfläche der Lungenlappen abdeckten und entsprechend lange Strecken bzw. Segmente des interlobulären Interstitiums enthielten.

Die Suche nach fibrotischen Veränderungen erfolgte mittels histologischer in-situ-Darstellung von Kollagenfasern (Junqueira et al. 1979; Rocycka et al. 1982; Dziedic-Goclawska et al. 1982) und Quantifizierung der Menge von Kollagen Typ I und Typ III. Normale Lungen enthalten relativ mehr Kollagen Typ III als Typ I (Huang 1977; Minor 1980; Bateman et al. 1981; Rinaldo und Rogers 1982; D'Ardenne et al. 1983), während bei fibrosierenden Prozessen Kollagen Typ I überwiegt (Madri und Furthmayr 1980).

Die Untersuchung hat ergeben, daß der Meßwert für Typ-I-Kollagen bei der SIDS-Gruppe mit  $0,54 \pm 0,10$  gegenüber dem Wert der Kontrollgruppe mit  $0,27 \pm 0,03$  deutlich erhöht war. Dieser Unterschied ist hochsignifikant  $\alpha = 0,001$  (Mann-Whitney-Wilcoxon Rangsummentest; Lienert 1973). Dagegen fand sich kein Unterschied für Kollagen Typ III, dessen Meßwerte mit  $0,31 \pm 0,03$  bei der Kontrollgruppe und  $0,32 \pm 0,03$  bei der SIDS-Gruppe praktisch gleich sind. Diese Befunde sprechen dafür, daß bei den SIDS-Fällen im interlobulären Interstitium um die Lymphgefäße die Menge an Kollagen Typ I erhöht war, während die Menge an Kollagen Typ III keine Veränderungen erkennen ließ. Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens von Kollagen Typ I und III fanden sich weder bei der Kontrollgruppe noch bei der SIDS-Gruppe. Da sich die Kollagenbestimmung auf das interlobuläre Interstitium beschränkte, konnten Veränderungen an oder um die kleinen stets intralobulär liegenden Pulmonalarterienäste (Weiler und de Haardt 1983; Wilske 1984) die Ergebnisse nicht beeinflussen.

Der Quotient der Mengen Kollagen Typ I und Typ III liegt bei normalen Lungen unter 1, bei fibrosierenden Prozessen verschiebt sich dieser Quotient zu Werten über 1, wobei das Ausmaß der Verschiebung von der Art der Affektion abhängig zu sein scheint (Huang 1977; Minor 1980; Madri und Furthmayr 1980; Bateman et al. 1981; Rinaldo et al. 1982; D'Ardenne 1983).

Wie aus den Daten ersichtlich ist, lagen sämtliche Werte des Kollagen I/III-Quotienten bei der SIDS-Gruppe über 1 (Tabelle 1b) während in der Non-SIDS-Gruppe die Werte durchwegs unter 1 lagen (Tabelle 1a). Auch in der Abbildung ist bezüglich des Quotienten Kollagen I/III eine deutliche Trennung der SIDS-Gruppe von der Non-SIDS-Gruppe erkennbar. Die Kollagen I/III-Quotienten der beiden Gruppen wurden mittels eines verteilungsfreien (nicht-para-

**Tabelle 1a and b.** Mittelwerte der jeweils pro Fall 120–240 Messungen der Intensität der orangenen Polarisation des Typ I-Kollagens bei 590 nm und der grünen Polarisation des Typ III-Kollagens bei 490 nm im interlobulären Interstitium in der Umgebung von Lymphgefäßen. Die Werte sind getrennt nach beiden Geschlechtern aufgegliedert. Die letzte Spalte zeigt das aus den beiden vorhergehenden Spalten errechnete Verhältnis Kollagen I/III, dessen Verschiebungen für fibrosierende Veränderungen charakteristisch sind.

**Tabelle 1a**

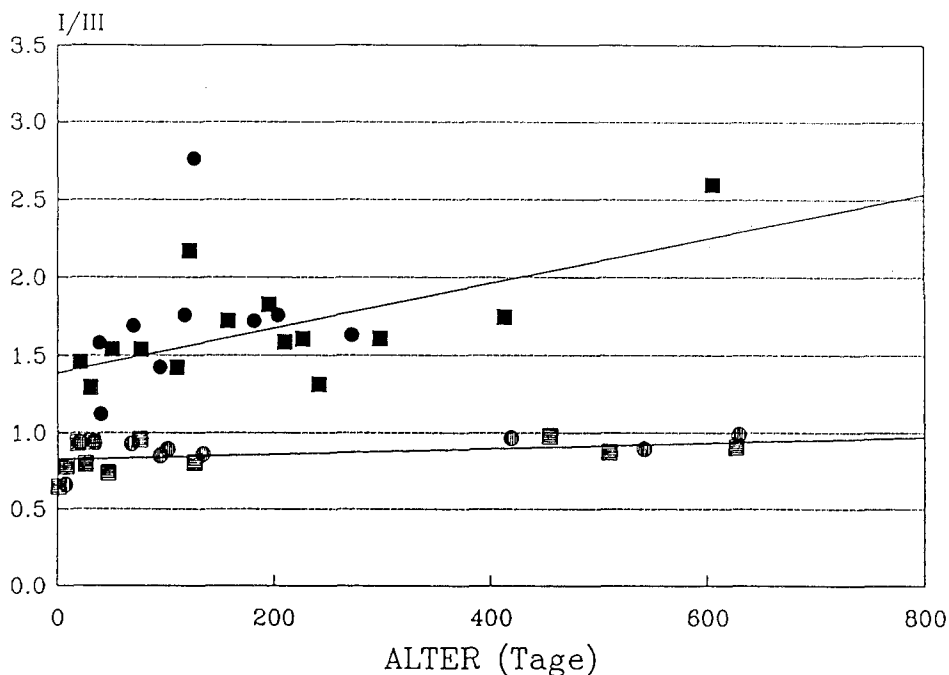
Fall	Lebensalter (Tage)	Geschlecht	Todesursache	Mittelwerte der Intensität bei 590 nm = Typ I	Mittelwerte der Intensität bei 490 nm = Typ III	Verhältnis Kollagen I/III
1	28	m	Leberriß	0,24	0,27	0,89
2	455	m	Fallot'sche Tetralogie	0,29	0,30	0,97
3	18	m	Hydronephrose bds.	0,26	0,32	0,81
4	1	m	Mechanische Asphyxie	0,20	0,31	0,65
5	45	m	Aspiration	0,22	0,30	0,73
6	508	m	Schädel-Hirn-Trauma	0,25	0,29	0,86
7	70	m	Subakut.-chron. Pancarditis	0,25	0,26	0,96
8	8	m	Sinusthrombose	0,26	0,33	0,79
9	25	m	Thrombose der V. cava inf.	0,24	0,30	0,80
10	127	m	Broncho-pulmon. Dysplasie	0,33	0,41	0,80
11	626	m	Ertrinken	0,31	0,34	0,91
1–11	174 ± 224			0,26	0,31	0,83
S.D.				± 0,04	± 0,04	± 0,09
12	540	w	Ertrinken	0,28	0,32	0,88
13	94	w	Pneumonie	0,26	0,31	0,84
14	28	w	Ventrikel-Septum-Defekt	0,28	0,30	0,93
15	630	w	Verbrennung	0,33	0,34	0,97
16	418	w	Hochsitzender VSD	0,29	0,30	0,97
17	102	w	Menningokokkensepsis	0,27	0,31	0,87
18	7	w	Diffuse exsudat. Alveolitis	0,21	0,32	0,66
19	68	w	Pneumonie	0,24	0,26	0,92
20	19	w	Fallot'sche Tetralogie	0,30	0,32	0,94
21	135	w	Hydrocephalus	0,26	0,31	0,84
22	20	w	Vitium cordis	0,29	0,31	0,94
12–22	187 ± 218			0,27	0,31	0,89
S.D.				± 0,03	± 0,02	± 0,0
1–22	181 ± 221			0,27	0,31	0,86
S.D.				± 0,03	± 0,03	± 0,09

Tabelle 1b

Fall	Lebensalter (Tage)	Ge- schlecht	Todes- ursache	Mittel- werte der Intensität bei 590 nm = Typ I	Mittel- werte der Intensität bei 490 nm = Typ III	Ver- hältnis Kollagen I/III
1	30	m	SIDS	0,37	0,29	0,128
2	157	m	SIDS	0,55	0,31	1,77
3	110	m	SIDS	0,50	0,35	1,43
4	120	m	SIDS	0,53	0,25	2,12
5	21	m	SIDS	0,43	0,29	1,48
6	412	m	SIDS	0,52	0,30	1,73
7	225	m	SIDS	0,52	0,32	1,63
8	50	m	SIDS	0,53	0,34	1,56
9	210	m	SIDS	0,51	0,32	1,59
10	76	m	SIDS	0,53	0,34	1,56
11	195	m	SIDS	0,58	0,31	1,87
12	241	m	SIDS	0,42	0,32	1,31
13	605	m	SIDS	0,80	0,31	2,58
14	297	m	SIDS	0,51	0,32	1,59
1-14	206 ± 157			0,52	0,31	1,68
S.D.				± 0,09	± 0,02	± 0,33
15	39	w	SIDS	0,33	0,29	1,14
16	180	w	SIDS	0,67	0,39	1,72
17	37	w	SIDS	0,54	0,34	1,59
18	203	w	SIDS	0,58	0,32	1,81
19	117	w	SIDS	0,68	0,39	1,74
20	70	w	SIDS	0,56	0,34	1,65
21	125	w	SIDS	0,67	0,25	2,68
22	93	w	SIDS	0,48	0,34	1,41
23	270	w	SIDS	0,52	0,32	1,63
15-23	127 ± 74			0,56	0,33	1,71
S.D.				± 0,11	± 0,04	± 0,39
1-23	169 ± 134			0,54	0,32	1,69
S.D.				± 0,10	± 0,03	± 0,36

metrischen) Verfahrens statistisch miteinander verglichen. Es wurde wiederum der Rangsummentest nach Wilcoxon-Mann-Whitney angewandt. Als Null-Hypothese galt, daß die Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammten, als Alternativ-Hypothese, daß die Grundgesamtheiten unterschiedlich waren. Es ergab sich auf hochsignifikantem Niveau ( $\alpha = 0,001$ ), daß die Werte des Kollagen I/III-Quotienten der SIDS-Gruppe und der Non-SIDS-Gruppe nicht zur selben Grundgesamtheit gehören.

## KOLLAGEN I/III - QUOTIENT



**Abb. 1.** Kollagen - Typ I/III-Quotient und Lebensalter bei SIDS- und Non-SIDS-Gruppe. Eingezeichnet sind die Regressionslinien für die SIDS-Gruppe ( $r = 0,49$ ) und die Kontrollgruppe ( $r = 0,46$ ). ◻ Non-SIDS (m); ◉ Non-SIDS (w); ◼ SIDS (m); ● SIDS (w)

Die Befunde passen zu der Annahme, daß bei den SIDS-Fällen im Lungeninterstitium fibrotische Vorgänge abgelaufen sind. Die räumliche Nähe der Veränderungen zu gestauten Lymphgefäßen stützt die Vermutung, daß Lymphostasen Ursache der Faserneubildung sein könnten.

In der Abbildung ist für beide Gruppen das Verhalten der individuellen Quotienten I/III in Abhängigkeit vom Lebensalter dargestellt. Die eingezeichneten beiden Linien entsprechen den für die SIDS- bzw. Non-SIDS-Gruppe errechneten Regressionsgeraden für die Altersabhängigkeit. Die Korrelation ist gesichert ( $\alpha = 0,05$ ). Bei der SIDS-Gruppe zeigte sich ein steigender Trend der Kollagen- I/III-Quotienten mit dem Lebensalter.

Sowohl aus den Meßdaten als auch aus der Darstellung lassen sich bei beiden Gruppen keine geschlechtsgebundenen Unterschiede der I/III-Quotienten feststellen.

### Literatur

- Althoff H (1980) Sudden infant death syndrom. Fischer, Stuttgart New York  
 Bateman ED, Turner-Warwick M, Adelman-Grill B (1981) Immunochemical study of collagen types in human fetal lung and fibrotic lung disease. Thorax 36:645-653

- Berg S und Kijewski S (1978) Histologische Befunde an 224 Fällen von plötzlichem Säuglingstod im norddeutschen Raum. *Beitr Gerichtl Med* 36: 154–160
- Burkardt A und Gebbers J-O (1983) Spezielle pathologische Anatomie Band 16/II Pathologie der Lunge. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Crystal RG, Fulmer JD, Baum BJ, Bernardo J, Bradley KH, Bruel SD, Elson NE, Fells GA (1978) Cells, collagen and idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 155: 199–224
- D'Ardenne AJ, Burns J, Sykes BC, Kirkpatrick P (1983) Comparative distribution of fibronectin and type III collagen in normal human tissues. *J Pathol, Edinburgh* 141: 55–69
- Dziedic-Goclawska A, Rocycka M, Czyba JC, Moutier R, Lenczowski S, Ostrowski K (1982) Polarizing microscopy of picosirius stained bone sections as a method for analysis of spatial distribution of collagen fibers by optical diffractometry. *Ba Appl Histochem* 26: 227–239
- Huang TW (1977) Chemical and histochemical studies on human alveolar collagen fibres. *Am J Pathol* 86: 81–93
- Junqueira LCU, Bignolas TG, Brentani R (1979) Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *J Histochem Cytochem* 11: 447–455
- Kline IK (1969) Lymphatic Pathways in the heart. *Arch Pathol Lab Med* 88: 638–644
- Lienert GA ED. (1973) Verteilungsfreie Methode in der Biostatistik Bd I und II: 230 ff. Verlag Anton Hain, Meisenheim am Glan
- Madri JA & Furthmayr H (1980) Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Human Pathology* 11 (Nr. 4) : 353–366
- Minor RR (1980) Collagen Metabolism. A Comparison of Diseases of Collagen and Diseases affecting Collagen. *Am J Pathol* 98: 227–280
- Ogbuihi S, Zink P (1987) Lungengerüstveränderungen beim plötzlichen Kindstod (SIDS). *Z Rechtsmed* 98: 191–205
- Ogbuihi S, Müller Z, Zink P (1988) Zur quantitativen polarimetrischen Darstellung von Kollagen Typ I und Typ III an histologischen Paraffinschnitten. *Z Rechtsmed* 100: 101–111
- Reiser KM, Last JA (1981) Pulmonary fibrosis in experimental acute respiratory disease. *Am Rev Respir Dis* 123: 58–63
- Rinaldo JE, Rogers RM (1982) Adult respiratory distress syndrom. Changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 306: 900–909
- Rocycka M, Lenczowski S, Sawicki W, Baranska W, Ostrowski K (1982) Optical diffraction as a tool for semi-automatic quantitative analysis of tissue specimens. *Cytometry* 2: 244–248
- Thomas P (1978) Fibrosing Alveolitis. *Can Med Assoc J* 119: 1211–1216
- Valdes-Dapena MA (1986) Sudden infant death syndrom. Morphology update for forensic pathologists – 1985. *Forensic Sci Int* 30: 177–186
- Weiler G, de Haardt J (1983) Morphometrical investigations into alterations of the wall thickness of small pulmonary arteries after birth and in case of sudden infant death syndrome (SIDS). *Forensic Sci Int* 21: 33–42
- Wilske J (1984) Der plötzliche Säuglingstod. Springer, Berlin Heidelberg New York 158–186

Eingegangen am 4. März 1988