

MECHANISMUS DER STRAHLENINDUZIERTEN PNEUMONITIS

Charakterisierung strahleninduzierter immunologischer Veränderungen in den Atemwegen von Patienten mit Bronchialkarzinomen als Grundlage für neue Therapieoptionen sowie Evaluierung individueller Risikofaktoren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Almuth Klippstein
geboren am 31.08.1974 in Bad Langensalza

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claus Kroegel
2. Prof. Dr. med. habil. Thomas G. Wendt
3. Prof. Dr. med. Christian Witt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.11.2002

In Christus liegen verborgen alle Schätze der Weisheit und der Erkenntnis.

Die Bibel, Brief an die Kolosser 2, 3

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. Kroegel für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation. Die Diskussionen mit ihm waren für mich stets gewinnbringend und überaus förderlich für das Vorankommen der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. R. Braun danke ich herzlich für seine tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Durchführung sowie der Auswertung der Daten. Durch seine freundschaftliche und kollegiale Hilfe wurde das Entstehen dieser Arbeit wesentlich gefördert.

Des weiteren sei Herrn Prof. Dr. med. habil. Th. Wendt, der diese Arbeit durch seine Revision und viele hilfreiche Hinweise wesentlich voran brachte, herzlich gedankt.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch allen Mitarbeitern des Pneumologischen Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin IV sowie Frau Dr. rer. nat. S. Franke, Herrn Dr. rer. nat. A. Müller und Herrn Dr. med. E. Lopatta für die vielfältige Hilfe bei der Anwendung der verschiedenen Untersuchungsmethoden aussprechen.

Von Herzen danke ich meinem Mann Markus und unseren Eltern für deren Unterstützung und Geduld, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit wesentlich schwieriger gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Klinik der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose.....	1
1.2	Risikofaktoren für die Entwicklung der strahleninduzierten Pneumonitis	3
1.3	Mögliche Pathogenesemechanismen der Entstehung der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose.....	4
1.3.1	Klassisches Entstehungsmodell der strahleninduzierten Lungenschädigung	4
1.3.2	Modifiziertes Entstehungsmodell der strahleninduzierten Lungenschädigung	6
1.3.2.1	Immunologisch vermittelter Entstehungsmechanismus – Hypersensitivitätspneumonitis.....	7
1.3.2.2	Einfluß von Zytokinen auf die inflammatorische und fibrotische pulmonale Reaktion nach Bestrahlung.....	7

2. Zielsetzung..... 13

3. Patienten, Materialien und Methoden..... 15

3.1	Patienten.....	15
3.1.1	Patientencharakteristika und zeitlicher Ablauf der Untersuchungen.....	15
3.1.2	Bestrahlung und Erfassung der räumlichen Dosisverteilung.....	19
3.1.3	Auftreten der strahleninduzierten Pneumonitis	20
3.2	Materialien.....	20
3.2.1	Geräte.....	20
3.2.2	Medikamente.....	21
3.2.3	Chemikalien und Biochemikalien.....	21
3.2.4	Antikörper.....	21
3.2.5	Zytokin-Assays.....	22
3.2.6	Labortechnische Hilfsmittel.....	22
3.2.7	Färbelösungen.....	22
3.2.8	Puffer und Lösungen für HPLC.....	23
3.2.9	Verwendete Software.....	24
3.3	Methoden.....	24

3.3.1 Bronchoskopie und Bronchoalveoläre Lavage.....	24
3.3.2 Aufarbeitung der Lavageflüssigkeit.....	24
3.3.2.1 Bestimmung der Zellzahl.....	25
3.3.2.2 Differenzierung der Zelltypen.....	25
3.3.2.3 Durchflußzytometrie.....	25
3.3.2.4 Zytokin-Assays.....	26
3.3.2.5 HPLC zur Bestimmung von Hydroxyprolin.....	27
3.3.3 Statistik.....	28
4. Resultate.....	29
4.1 Strahleninduzierte Veränderungen in der Bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit und ohne Pneumonitis.....	29
4.1.1 Rückgewinnungsrate der BAL-Flüssigkeit und Gesamtzellzahl.....	30
4.1.2 Differentialzytologie.....	31
4.1.2.1 Verteilung von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	33
4.1.2.1.1 Expression der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	34
4.1.2.1.2 Expression von CD103 auf CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	36
4.1.3 Zytokine in der Lavageflüssigkeit.....	38
4.1.3.1 Interleukin-4, Interleukin-6 und Interferon- γ	38
4.1.3.2 Transforming growth factor beta-1.....	41
4.1.3.3 Interleukin-2.....	42
4.1.3.4 Keratinocyte growth factor und Tumornekrosefaktor alpha.....	43
4.1.4 Matrixmetalloproteinase MMP-9 in der Lavageflüssigkeit.....	43
4.1.5 Neopterin in der Lavageflüssigkeit.....	44
4.1.6 Hydroxyprolin in der Lavageflüssigkeit.....	44
4.2 Einflußfaktoren auf die Entwicklung einer Pneumonitis.....	46
4.2.1 Bestrahlungsparameter.....	47
4.2.1.1 Gesamt- und Einzeldosis.....	47
4.2.1.2 Mean Lung Dose der höher bestrahlten Einzellunge.....	47
4.2.1.3 Zielvolumen.....	48
4.2.2 Patientenspezifische Einflußgrößen.....	48
4.2.2.1 Alter.....	48
4.2.2.2 Nikotinkonsum.....	48

4.2.2.3 Pulmonale Begleiterkrankungen.....	48
4.2.2.4 Tumorhistologie, Erkrankungsstadium, Chemotherapie, vorangegangene Tumorresektion.....	48
5. Diskussion.....	50
5.1 Einflußfaktoren auf die Entwicklung einer Pneumonitis.....	51
5.1.1 Bestrahlungsparameter.....	51
5.1.2 Patientenspezifische Einflußgrößen.....	52
5.1.2.1 Alter.....	53
5.1.2.2 Nikotinkonsum als protektiver Faktor.....	53
5.1.2.3 Pulmonale Begleiterkrankungen.....	54
5.1.2.4 Tumorhistologie, Erkrankungsstadium, Chemotherapie, vorangegangene Tumorresektion.....	55
5.2 Strahleninduzierte Veränderungen in der Bronchoalveolären Lavage nach Bestrahlung bei Patienten mit und ohne Pneumonitis.....	56
5.2.1 Bedeutung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten für die pulmonale Strahlenreaktion.....	56
5.2.1.1 Rolle von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	58
5.2.1.2 Bedeutung von CD103 ⁺ -T-Lymphozyten.....	60
5.2.2 Bedeutung humoraler Mediatoren für die pulmonale Strahlenreaktion.	61
5.2.2.1 Einfluß der Zytokine Interleukin-4, Interleukin-6 und Interferon- γ	61
5.2.2.2 Vermittlung der Fibrose durch Transforming growth factor beta-1.....	63
5.2.2.3 Tumornekrosefaktor alpha, Keratinocyte growth factor und Neopterin.....	66
5.2.3 Matrixmodulierende Funktion von MMP-9.....	67
5.2.4 Hydroxyprolin als Korrelat kollagener Strukturen.....	69
5.2.5 Methode der Bronchoalveolären Lavage.....	70
5.3 Dosis(un)abhängigkeit der untersuchten Parameter.....	72
5.4 Hypothesen zur Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose sowie zu Regulationsmechanismen auf Zell- und Mediatorenen- ebene.....	73
5.5 Definition neuer präventiver und therapeutischer Behandlungsansätze..	77
5.5.1 Zelloberflächen-Antikörper.....	78
5.5.2 Zytokin-Antikörper und Zytokin-Rezeptorantagonisten.....	79

5.5.3 Antiinflammatorische und/oder antifibrotische Zytokine.....	80
5.6 Ausblick.....	82
6. Zusammenfassung.....	85

Anhang

Literaturverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CD	Cluster of Differentiation, Nomenklatur zellulärer Oberflächenantigene
DA	Dosieraerosol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Enzymimmunoassay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
Gy	Gray (Energiedosis)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	kilo-Dalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
n.s.	nicht signifikant
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMN-Zellen	Polymorphonukleäre Zellen
py	Pack Years (1 py = 1 Packung Zigaretten pro Tag und Jahr)
RNA	Ribonukleinsäure
RP (+ / -)	Radiation Pneumonitis, Strahleninduzierte Pneumonitis (ja/nein)
SCLC	Small Cell Lung Cancer, kleinzelliges Bronchialkarzinom
SPECT	Single Photon Emissions Computertomographie
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor

Selten verwendete Abkürzungen werden an der jeweiligen Textstelle erläutert.

1. Einleitung

Die Bestrahlung maligner Tumoren im Thorax unterschiedlichster Histologie und Lokalisation als primäre oder (neo-)adjuvante Behandlungsintervention ist etablierter Standard im onkologischen Therapieregime. Die Effektivität einer Strahlentherapie wird jedoch durch die pulmonalen Komplikationen in Form einer strahleninduzierten Pneumonitis mit nachfolgender Fibrose limitiert. Trotz intensiver Forschung – hauptsächlich auf tierexperimentellem Gebiet – sind die genauen kausalpathogenetischen Zusammenhänge, die für die Entwicklung dieser Bestrahlungsreaktionen verantwortlich sind, nur unzureichend erkannt. Daher fehlen kausal wirkende prophylaktische und/oder therapeutische Maßnahmen, die neben einer verbesserten Lebensqualität die Steigerung der Tumorkontroll- und Heilungsrate durch Dosisescalation ermöglichen.

1.1 Klinik der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose

Das Auftreten einer strahleninduzierten Pneumonitis wird bei Mitbestrahlung gesunder Lungenanteile bei der Radiatio von Bronchialkarzinomen, Ösophaguskarzinomen, Mammakarzinomen, Mediastinaltumoren sowie Lymphomen beobachtet.

Das Zeitintervall zwischen Beendigung der Bestrahlung und dem Beginn dieser pulmonalen Reaktionen variiert von vier Wochen bis zu sechs Monaten mit einer Häufung nach ca. zwei bis drei Monaten [1-6].

Die Angaben zur mittleren Gesamtstrahlendosis, oberhalb derer sich pneumonitische Veränderungen entwickeln, schwanken zwischen 20 bis 40 Gy bei konventioneller Fraktionierung von 2 Gy pro Tag [2, 4, 5, 7-10].

Die radiologische Manifestation (vgl. Abb. 1c) mit Nachweis einer auf das bestrahlte Volumen begrenzten [2, 4, 9] fleckigen oder diffusen Zeichnungsvermehrung [4, 5] ist mit 40 bis 80% [1, 10, 11] wesentlich häufiger als eine symptomatische Pneumonitis, die in 5 bis 20% auftritt [1, 4, 6, 10, 11]. Daher wird zwischen radiologischer und klinischer Pneumonitis unterschieden. Letztere ruft Symptome wie Dyspnoe, unproduktiven Husten, febrile Temperaturen sowie einen reduzierten Allgemeinzustand hervor [1, 2, 4, 5, 10, 12, 13] und kann entsprechend der RTOG-Kriterien in Grad I bis IV eingeteilt werden [14].

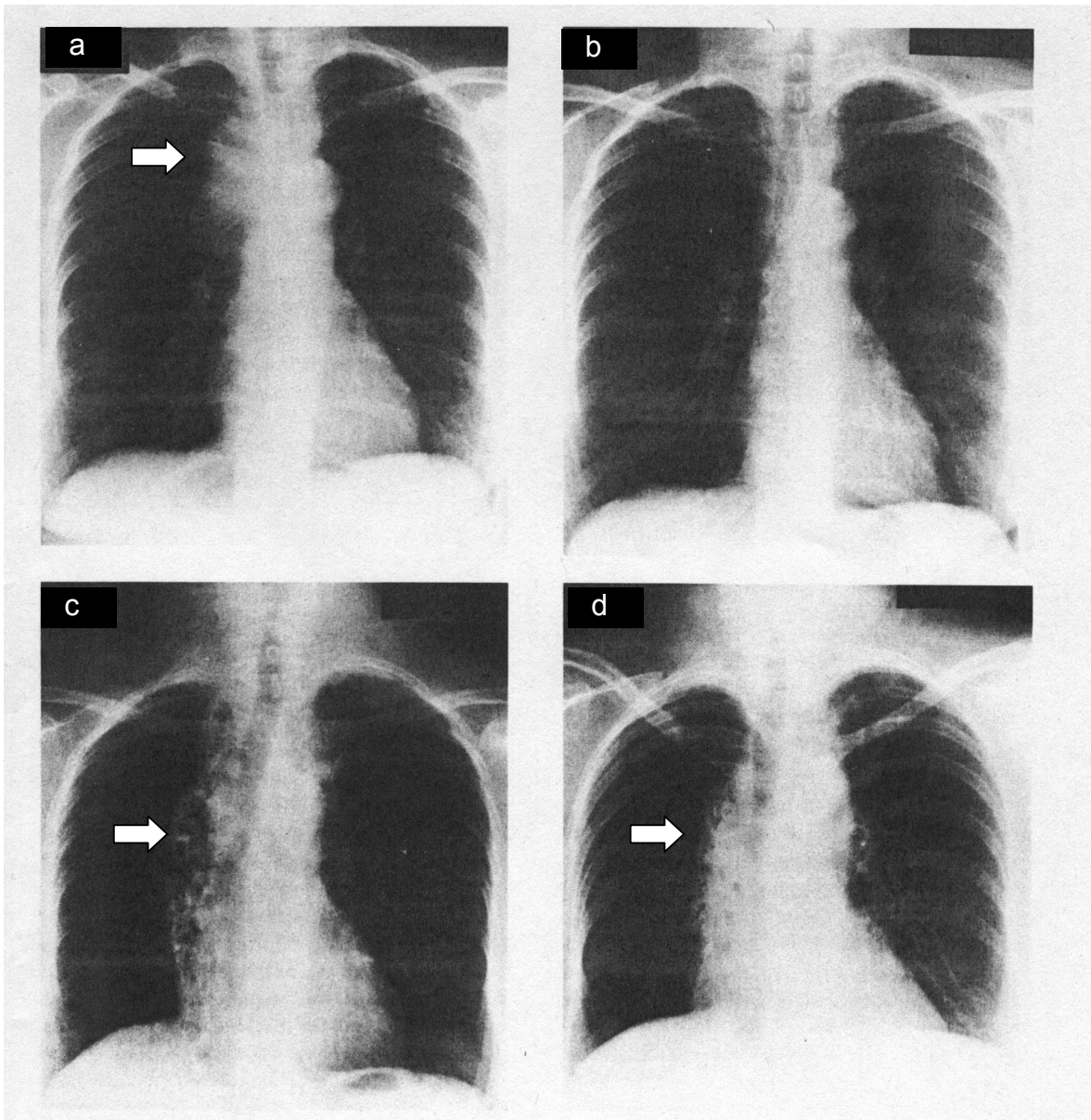


Abbildung 1: Radiologische strahleninduzierte Pneumonitis mit folgender Fibrose nach Bestrahlung eines mediastinalen Lymphoms [15].

Diese 61jährige Patientin wurde wegen eines Lymphoms mit 40 Gy mediastinal und supra-klavikulär über 4 Wochen bestrahlt. a) Die Aufnahme vor Therapie zeigt die rechts paratracheale Raumforderung. b) Drei Wochen nach Abschluß der Bestrahlung ist eine nahezu komplette Rückbildung des Malignoms ohne pathologische Veränderungen in der Lunge zu sehen. c) Nach neun Wochen stellt sich in den Grenzen des ehemaligen Bestrahlungsfeldes der rechten Lunge eine radiologische Pneumonitis dar. d) Neun Monate nach Strahlentherapie hat sich eine Fibrose im früheren Strahlenfeld entwickelt.

Als derzeit verfügbare symptomatische Therapie werden Kortikosteroide verabreicht [16, 17], die jedoch nicht das Fortschreiten zur Strahlenfibrose verhindern

können [4, 18, 19]. Die Strahlenfibrose (vgl. Abb. 1d) tritt nach ungefähr 6 bis 24 Monaten auf [1, 4, 6, 9] und geht mit restriktiven Ventilations- sowie Perfusionsstörungen [20] einher. Daraus kann für die betroffenen Patienten eine Minderung der Lebensqualität resultieren.

Die prophylaktische Gabe von Kortikosteroiden während oder nach Bestrahlung hat zwar tierexperimentell zu verminderter Mortalität und geringerer pulmonaler Schädigung geführt [21-25], konnte sich aber wegen klinisch nicht gesicherten Vorteils im Sinne einer Prävention von strahleninduzierter Pneumonitis und Fibrose beim Menschen nicht durchsetzen [26]. Eine andere am Tiermodell untersuchte Substanzgruppe ist die der nichtsteroidalen antiinflammatorischen Cyclooxygenase- und/oder Lipoxygenasehemmer. Hier zeigt sich am ehesten durch Beeinflussung der 5-Lipoxygenase eine reduzierte Mortalität nach Bestrahlung. Die Autoren vermuten als Wirkungsmechanismus die Verhinderung der strahleninduzierten vaskulären Dysfunktion mit daraus resultierender geringerer Gefäßpermeabilität [21, 27, 28].

Für den Menschen fehlen bisher effiziente präventive und therapeutische Mittel, die eine Steigerung der Gesamtdosis im Zielvolumen und damit eine Erhöhung der Tumorheilungsrate bzw. der Tumorkontrollrate ermöglichen. In durchgeführten Studien mit verschiedenen Dosis- und Fraktionierungsschemata resultiert aus einer höheren Gesamtstrahlendosis eine vermehrte Ansprechrate des Tumors [29] und daraus folgend eine verlängerte Überlebenszeit der betroffenen Patienten [30, 31].

1.2 Risikofaktoren für die Entwicklung der strahleninduzierten Pneumonitis

Mit zunehmender Gesamt- und Einzeldosis sowie Größe der Bestrahlungsfelder und damit Erhöhung an bestrahltem Lungenvolumen steigt das Risiko, diese pulmonale Bestrahlungskomplikation zu generieren [1, 2, 4, 5, 7, 8, 11, 15, 32, 34]. Außerdem hat sich gezeigt, daß eine vorangegangene oder die Strahlentherapie begleitende Chemotherapie die Toleranz des Lungengewebes vermindern kann [1, 2, 7, 15, 33, 35]. In einigen Studien haben vorbestehende Lungenerkrankungen

wie chronisch obstruktive Störungen und Emphysem das Auftreten einer Strahlenreaktion gefördert [1, 7, 11].

Zur Frage, ob Nikotinkonsum den pneumonitischen Verlauf unterbindet [36, 37] oder ebenfalls einen Risikofaktor darstellt [11], existieren derzeit kontroverse Angaben. Gleichmaßen ist ungeklärt, inwiefern das Patientenalter die Ausbildung einer Pneumonitis beeinflusst. Hierzu liegen sowohl Arbeiten vor, in denen Pneumonitispatienten jünger waren [38] als auch solche, wo diese Gruppe ein höheres Alter hatte [39] verglichen mit Patienten ohne diese Bestrahlungskomplikation. Monson et al. wiederum berichten, daß dieser Faktor bezüglich der Pneumonitisentwicklung unbedeutend sei [11].

1.3 Mögliche Pathogenesemechanismen der Entstehung der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose

Das Verständnis zur Pathogenese der strahleninduzierten Pneumonitis hat in den letzten Jahren eine grundsätzliche Wandlung erfahren. Ursprünglich wurde angenommen, die energiereiche Strahlung führe zur Schädigung strahlenempfindlicher Zellpopulationen mit nachfolgendem Zelluntergang und Ersatz durch Narbengewebe [1, 6, 12, 40]. In diesem Ansatz bleiben die auftretenden Veränderungen auf das strahlenexponierte Areal beschränkt [9, 12]. Heute finden sich einerseits Hinweise dafür, daß mehrere Zellgruppen unter Vermittlung diverser Mediatoren in die entzündlichen und fibrotischen Prozesse involviert sind [41-45] und andererseits, daß auch außerhalb des direkt bestrahlten Gewebes eine immunologische Reaktion induziert wird [39, 46, 47]. In den folgenden Ausführungen werden diese möglichen Entstehungsweisen näher betrachtet.

1.3.1 Klassisches Entstehungsmodell der strahleninduzierten Lungenschädigung

Hier steht die strahlenbedingte Alteration von *Kapillarendothelzellen* und *Typ-II-Pneumozyten* im Vordergrund. Diese beiden Zellgruppen gelten aufgrund ihrer hohen mitotischen Aktivität als die strahlenempfindlichsten Komponenten im pulmonalen Gewebsverband [4, 6, 10, 12, 48]. Infolge der Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit biologischen Strukturen treten direkte und über die

Bildung freier Radikale vermittelte indirekte Schäden an Zellbestandteilen (DNA, Membranen, etc.) auf, die zu Funktionsdefiziten führen [7, 40, 49].

Durch die Schädigung der Kapillarwände wird die Gefäßpermeabilität erhöht, was zur Exsudation einer proteinreichen Flüssigkeit in die Alveolarräume führt [1, 12, 18, 50-52]. Von manchen Autoren wird als Folge dieses Prozesses die Bildung hyaliner Membranen angeführt [1, 4, 32]. Funktionell verursacht dieser Vorgang eine Verminderung der Diffusionskapazität sowie der Lungenfunktionsparameter [12, 40, 53]. Des weiteren lösen sich geschädigte Kapillarendothelien von der Basalmembran ab, wodurch die Generierung fokaler Kapillarthromben mit folgender Perfusionsminderung begünstigt wird [32, 40, 54, 55]. Dieser liegt auch zum Teil die Verdickung der Kapillarwände durch ein intimales Ödem zugrunde [12, 56].

Kommt es nicht zur vollständigen Auflösung des abgelagerten proteinreichen Materials, erfolgt der Ersatz durch kollagenreiches Bindegewebe mit fibrotischer Umwandlung pulmonalen Gewebes [32, 54, 57, 58]. Dieser Prozeß kann Monate bis Jahre in Anspruch nehmen [1]. Sowohl das Vorhandensein von Fibrinogen im Exsudat, das zu Fibrin umgesetzt wird [59], als auch die durch Chemotaxis vermittelte Anreicherung von Fibroblasten im Interstitium mit Stimulation der Kollagenproduktion [3, 45, 60-63] werden für die Entwicklung der strahleninduzierten Fibrose verantwortlich gemacht. Außerdem bewirkt die Bestrahlung eine Veränderung des Verhältnisses von Fibroblasten zu Fibrozyten zugunsten der kollagenproduzierenden letzteren Zellgruppe [3]. Darüber hinaus ist die fibrinolytische Aktivität im geschädigten Gewebe reduziert [59]. In Folge davon schreitet die Verdickung von Alveolarsepten und die Sklerosierung der Gefäßwände fort [1, 3, 56, 64], was mit einer progressiven Funktionseinbuße einhergeht [20].

Neben diesem beschriebenen Mechanismus des Endothelzellenschadens verursacht die energiereiche Strahlung am Typ-II-Pneumozyten sowohl quantitative als auch qualitative Defizite. So führt die strahlenbedingte Schädigung zum Verlust intakter Typ-II-Pneumozyten [1, 13, 48]. Initial wird durch diesen Zelluntergang bzw. durch die strahleninduzierte Toxizität auf das Surfactantsystem eine vermehrte Surfactantabgabe beobachtet [1, 65-69]. Da jedoch die Regenerierung dieses Proteins verzögert ist, kommt es insgesamt zu einer Verminderung des Surfactantgehaltes in den Alveolen [4, 40]. Überdies produziert der geschädigte

Typ-II-Pneumozyt in seiner Zusammensetzung veränderten Surfactant [12, 48]. Infolge dieser Vorgänge wird die Ausbildung hyaliner Membranen [4] und atelektatischer Areale [65] gefördert. Neben diesen der pneumonitischen Phase zugrunde liegenden Prozessen soll der Typ-II-Pneumozyt auch bei der fibrotischen Reaktion mitwirken. Hier wird postuliert, daß diese Zellen Mediatoren generieren, die die Synthese der extrazellulären Matrix bzw. die Proliferation pulmonaler Fibroblasten beeinflussen [45].

Bei diesem klassischen Modell der strahleninduzierten Lungenschädigung, das die Alteration von Kapillarendothelzellen und Typ-II-Pneumozyten als zugrundeliegende Ursache ansieht, wird davon ausgegangen, daß die molekularen, zellulären und biochemischen Veränderungen auf die strahlenexponierte Region begrenzt sind [12].

Als mögliche Wirkungen verabreichter Kortikosteroide im Zusammenhang mit diesem Entstehungsmodell wurden im Tierexperiment die Senkung der Kapillarpermeabilität [22, 19, 70], Beschleunigung der Repopulation der Typ-II-Pneumozyten [21, 23] sowie die Steigerung der Surfactantproduktion [21, 70] dokumentiert.

1.3.2 Modifiziertes Entstehungsmodell der strahleninduzierten Lungenschädigung

Während das oben beschriebene Entstehungsmodell die direkte strahleninduzierte Gewebsverletzung mit Untergang von Kapillarendothelzellen und Typ-II-Pneumozyten als Ursache für eine Pneumonitis mit nachfolgender Fibrose ansieht, mehren sich in letzter Zeit Hinweise dafür, daß die Pathogenese auf komplexen Zellinteraktionen mit vermittelnden Zytokinkaskaden basiert, die schon vor morphologisch sichtbaren Veränderungen in Aktion treten. Diese Vorgänge bleiben nicht auf das Bestrahlungsfeld begrenzt, sondern rufen auch in nicht bestrahlten Arealen Modifikationen auf Zell- und Mediatorenebene hervor [5, 12]. Dieser erweiterte Ansatz könnte erklären, warum bislang kein effektiver medikamentöser Zugang zur Behandlung der Strahlenpneumonitis und folgender Fibrose etabliert werden konnte.

1.3.2.1 Immunologisch vermittelter Entstehungsmechanismus – Hypersensitivitätspneumonitis

Mit dem Nachweis einer bilateralen Lymphozytose in der Lavageflüssigkeit von Mammakarzinom-Patientinnen mit klinischer Pneumonitis nach unilateraler Thoraxbestrahlung [39, 47] ergaben sich erste Anzeichen dafür, daß strahlenbedingte Veränderungen auch außerhalb der Strahlenfeldgrenzen ablaufen [12, 42]. Bei den sowohl prozentual als auch absolut vermehrten Lymphozyten handelte es sich um CD4⁺-T-Zellen [39]. Als mögliche Ursache wird eine durch den strahlenbedingten Gewebeschaden hervorgerufene Antigenfreisetzung diskutiert, die zur Aktivierung von Lymphozyten führt, welche durch Zytokinkaskaden in allen Bereichen der Lunge eine Reaktion bewirken. Diese Vorgänge werden als eine immunologisch vermittelte Hypersensitivitätspneumonitis betrachtet. Bereits im Jahre 1977 ist diese vorstellbare Genese in der Literatur beschrieben worden [5]. Ob dieses Konzept eine grundsätzlich andere Entstehung der strahleninduzierten Lungenschädigung oder eine Ergänzung zum klassischen Konzept darstellt, ist derzeit unklar.

Einige Autoren gehen davon aus, daß zwei verschiedene Formen der Strahlenpneumonitis existieren: 1.) eine klassische – auf das Bestrahlungsfeld begrenzte – strahleninduzierte Pneumonitis und 2.) eine sporadische strahleninduzierte Pneumonitis, entsprechend einer Hypersensitivitätspneumonitis [11, 42] mit einer bilateralen lymphozytendominierten Alveolitis. Die Frage, ob es sich im Falle der Hypersensitivitätspneumonitis um eine individuelle Variante, zum Beispiel bei genetischer Disposition, handelt [47], kann ebenfalls mit den bisher vorliegenden Untersuchungen nicht beantwortet werden.

1.3.2.2 Einfluß von Zytokinen auf die inflammatorische und fibrotische pulmonale Reaktion nach Bestrahlung

Neuere Untersuchungen an Tiermodellen und Zellkulturen haben gezeigt, daß eine Bestrahlung von Gewebe die Synthese verschiedener Zytokine und anderer Mediatoren induziert, welche die Infiltration von Entzündungszellen fördern und durch Stimulation von Fibroblasten die Kollagensynthese verstärken [43, 71-73]. Eine vermehrte Zytokinproduktion konnte schon direkt nach der Bestrahlung, also vor morphologisch sichtbaren Veränderungen nachgewiesen werden [43, 74]. Im Gegensatz dazu liegen momentan nur wenige Arbeiten am Menschen vor, die sich

mit der Rolle Zytokin-vermittelter Interaktionen bei der Pathogenese der strahlenbedingten Gewebeschädigung beschäftigen [75, 76]. Im folgenden sollen die an dieser Reaktion beteiligten Mediatoren näher in ihrer möglichen Funktion bei der Entwicklung einer Strahlenreaktion beschrieben werden.

Die meisten Untersuchungen liegen diesbezüglich zu *TGF- β* vor, einem ubiquitär vorkommenden und multifunktionellen Homodimer von 25 kDa, dem ein fibrogenes Potential zugeschrieben wird. Nach seiner Freisetzung als inaktives, hochmolekulares Protein bedarf es einer Aktivierung, um über Bindung an den entsprechenden Rezeptor wirksam zu sein. Dieser Aktivierungsprozeß stellt einen wichtigen Faktor bei der Kontrolle und Regulierung der Aktionen dieses Zytokins dar [77]. In vitro sind unter anderen extreme pH-Werte, proteolytische Enzyme [77] und reaktive Sauerstoffspezies [78] als Aktivatoren beschrieben. Vermutlich löst energiereiche Strahlung über letzteren Mechanismus die Aktivierung von *TGF- β* in vivo nach Applikation einer Bestrahlung aus [79]. Im Lungengewebe wird dieser Mediator von einer Reihe von Zellarten, wie Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und auch Fibroblasten, produziert [80]. Weiterhin sezernieren Lymphozyten dieses Molekül [81]. Als Induktionsmechanismen werden parakrin und autokrin vermittelte Transduktionswege diskutiert [82].

Eine erhöhte Konzentration von *TGF- β* korreliert im Tiermodell mit der Entstehung einer Lungenfibrose, ausgelöst durch verschiedene Faktoren, wie Bleomycin [83-85], Cyclophosphamid [86] und Bestrahlung [80, 87].

Neuere Studien, welche die Rolle von *TGF- β* bei der strahleninduzierten Gewebeschädigung beim Menschen untersuchen, weisen ebenfalls auf dessen Beteiligung am pathogenetischen Geschehen hin. So wurden von Anscher et al. die *TGF- β* -Plasmaspiegel im Blut von Patienten mit Bronchialkarzinom vor und nach erfolgter Strahlentherapie bestimmt. Bei denen, die eine Strahlenpneumonitis entwickelten, blieb ein Abfall der initial erhöhten *TGF- β* -Plasmaspiegel auf Normalwertniveau aus im Gegensatz zu denen, die diese Komplikation nicht zeigten [76, 88]. Die Autoren schließen aus diesen Resultaten, daß eine anhaltende erhöhte *TGF- β* -Konzentration die Entstehung einer strahleninduzierten Pneumonitis fördert. Eine andere Arbeitsgruppe um Cannay wies dieses Zytokin immunhistochemisch im strahlengeschädigten Gewebe von Patienten mit malignem Darmtumor nach, während nicht bestrahlte Patienten keine Färbung boten [75].

Die Theorien der zugrunde liegenden fibrogenetischen Prozesse wurden vorwiegend anhand von Zellkulturtechniken gewonnen. Danach führt die Stimulation von Fibroblasten durch TGF- β zu einer verstärkten Produktion von Kollagen [89], Fibronectin [90] und Hydroxyprolin [91], ohne die Proliferation dieser Zellgruppe zu akzelerieren [89, 91, 98]. Darüber hinaus hemmt dieses Zytokin die Synthese von Kollagenasen und verstärkt die Freisetzung von Protease-Inhibitoren [77, 92]. Außerdem erwies sich TGF- β als chemotaktische Substanz für Fibroblasten [93] und fördert deren Differenzierung zugunsten der postmitotischen Fibrozyten [94, 95]. In der Summe resultiert aus diesen Vorgängen eine Zunahme der extrazellulären Matrix als Korrelat einer fibrotischen Gewebearchitektur.

IL-1 geht aus den bisher veröffentlichten Arbeiten als Mediator mit radioprotektivem Potential hervor [4]. Das wurde durch verschiedene Tierexperimente nachgewiesen. Mäuse, die vor Bestrahlung dieses Zytokin erhielten, wiesen eine geringere Letalität gegenüber jenen auf, die ohne diese Maßnahme der Strahlung ausgesetzt wurden [96]. Eine andere Arbeit beschreibt ebenfalls eine verminderte Sterblichkeit bei den Tieren, welchen vor einer Behandlung mit Cyclophosphamid und Bestrahlung *IL-1* appliziert worden ist [97]. Als möglicher Wirkungsmechanismus wird die Stimulierung mesenchymaler Zellen diskutiert, die darauf hin verstärkt Kollagenasen sowie Proteasen synthetisieren und freisetzen, wodurch die Formation der extrazellulären Matrix modifiziert wird [98]. In der Zellkulturtechnik ließ sich für dieses Interleukin allerdings auch eine Proliferationsaktivierung für Fibroblasten nachweisen [99, 100].

IL-4 stellt neben TGF- β ein weiteres Zytokin mit förderndem Einfluß auf die strahleninduzierten Pathomechanismen von Inflammation und Fibrose dar. Büttner et al. zeigten in einer Studie an Ratten, daß dieses Protein nach Bestrahlung einer Lunge hier vermehrt exprimiert wird, während es im Lungengewebe der kontralateralen Seite nicht nachweisbar ist. *IL-4*-mRNA ließ sich ausschließlich in Makrophagen und Lymphozyten der bestrahlten Lunge detektieren [73]. Dieses 25 kDa schwere, glykosilierte Protein wird ebenfalls von aktivierten Th2-Zellen produziert [101]. In einer Zellkultur von Lungenfibroblasten induzierte *IL-4* sowohl die Fibroblastenproliferation als auch deren Sekretion von Kollagen und anderen Proteinen [102].

IFN- γ , ein Produkt aktivierter Th1-Lymphozyten, hemmt die Kollagensynthese von Fibroblasten *in vitro* wie *in vivo* und attenuiert die akute Entzündungsreaktion, so daß dieses Zytokin mit antifibrotischen und antientzündlichen Wirkungen in Verbindung gebracht wird. So zeigten beispielsweise mit *IFN- γ* behandelte Mäuse eine verminderte Narbenbildung im Bereich traumatisierter Haut [103]. In der Zellkultur inhibiert dieses Zytokin die Synthese von Typ-II-Kollagen durch Chondrozyten [104]. Im Tiermodell konnte durch die Applikation von *IFN- γ* die Ausprägung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose reduziert werden [105, 106]. Rosiello et al. beschrieben an thoraxbestrahlten Ratten mit anschließender Untersuchung der bronchoalveolären Lavage, daß die Applikation von *IFN- γ* sowohl den Influx von PMN-Zellen als auch den Proteineinstrom reduzierte, während die durch die Bestrahlung hervorgerufene Lymphozytose nicht beeinflusst wurde. Außerdem wiesen die in der Lavage befindlichen neutrophilen Granulozyten eine reduzierte chemotaktische Aktivität auf [107]. Ferner ist für *IFN- γ* eine Inhibition der akuten Entzündung beschrieben. Im Tiermodell hemmt *IFN- γ* die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in Hautwunden [108].

Hat *TNF* seinen Namen initial wegen der Fähigkeit erhalten, *in vivo* hämorrhagische Nekrosen in verschiedenen Tumoren zu induzieren, sind bislang eine Vielzahl weiterer Funktionen nachgewiesen. So verstärkt es entzündliche und immunologische Prozesse, aktiviert PMN-Zellen und moduliert die B-Zell-Differenzierung. Weiterhin stimuliert *TNF* die Produktion diverser Zytokine, wie *IL-1*, *IL-6* und *GM-CSF* [109]. Im Tiermodell der Bleomycin-induzierten Fibrose dokumentierte Piguet einen deutlichen Anstieg der *TNF- α* -mRNA in der manipulierten Lunge; darüber hinaus führte eine *TNF*-Gabe zu einer drastischen Aggravation der Fibrose, während die Applikation von anti-*TNF*-Antikörpern die Fibroseentwicklung fast komplett verhinderte [110]. Dieses Zytokin wird von Makrophagen [111] und T-Lymphozyten [109] sezerniert. Daneben können auch Mediatoren aus dem Überstand proliferierender T-Zellen die Freisetzung dieses Proteins durch Monozyten stimulieren [112]. In der Zellkultur zeigt *TNF* einen stimulierenden Einfluß auf die Fibroblastenaktivität [99]. Hampson et al. belegten anhand kultivierter humaner Zellen, daß *TNF* die Adhärenz von T-Lymphozyten an Fibroblasten steigert [113]. Die Autoren interpretieren dieses Phänomen als mögliche Folge einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen, zum Beispiel

ICAM-1, entweder auf den T-Lymphozyten oder den Fibroblasten. Diese Arbeit legt eine enge mediatorsvermittelte Verbindung zwischen immunologischen bzw. entzündlichen und fibrotischen Reaktionen nahe.

KGF weist in tierexperimentellen Arbeiten – im Gegensatz zum vermutlich fibroseverstärkenden TNF – eine protektive Funktion bezüglich der Fibroseentstehung auf. Die intratracheale Applikation von *KGF* bei Ratten reduzierte die Mortalität sowohl bei der alleinigen Bleomycin-induzierten Lungenschädigung als auch in Kombination mit einer Bestrahlung. Wurden die Tiere nur bestrahlt, ergab sich kein Überlebensvorteil, aber eine histologisch nachweisbare geringere Schädigung in Form einer Pneumonitis und Fibrose [114]. Für diesen Effekt verantwortlich ist wahrscheinlich die Eigenschaft von *KGF*, als Wachstumsfaktor für Typ-II-Pneumozyten zu fungieren [115]. Weiterhin ist *in vitro* nach Zugabe dieses Faktors zu alveolaren Typ-II-Zellen die vermehrte Bildung von mRNA, welche die Surfactant-Apoproteine A und B kodiert, nachgewiesen worden [116]. Beide *KGF*-vermittelten Mechanismen könnten die Regenerierung strahlendefekten Lungengewebes fördern und somit die Entwicklung von pulmonalen Strahlenschäden verhindern.

Nach Betrachtung der einzelnen in den letzten Jahren mit der Pathogenese der strahleninduzierten Lungenschädigung in Verbindung gebrachten Zytokine ist anzumerken, daß diese je nach verwendeten Materialien und Untersuchungsmethoden teilweise verschiedene Reaktionen zeigen können [44]. Außerdem wirken diese Mediatoren im Organismus eher nach dem Muster eines dynamischen Netzwerkes mit sich ergänzenden stimulierenden und inhibierenden Aktionen als nach einem starren System, welches nur nacheinander stattfindende Reaktionen zuläßt [43, 117]. Daraus resultiert die Möglichkeit, daß die Kombination verschiedener Mediatoren andere Effekte hat als die Wirkung einzelner Komponenten. So führen beispielsweise IL-1 und TNF individuell zu einer Stimulierung der Fibroblastenproliferation, während beide Zytokine in Gegenwart von IFN- γ einen hemmenden Einfluß ausüben [117].

Derzeit sind noch viele Fragen bezüglich des Wirkungsspektrums isolierter Proteine sowie der Modulation bekannter Reaktionen durch das Wechselspiel im Informationsgefüge des Organismus unbeantwortet. Daraus ergeben sich Schwierigkeiten bei der korrekten Interpretation bestimmter Untersuchungs-

ergebnisse betreffs ursächlicher und resultierender Veränderungen. Sie machen die Notwendigkeit eines (experimentellen) Modells deutlich, in dem alle verantwortlichen Mediatoren integriert beurteilt werden können.

Anhand der bisher durchgeführten Untersuchungen am humanen System kann keine generelle Aussage hinsichtlich der Mediatorenexpression und -funktion in Abhängigkeit unterschiedlicher Strahlendosen getroffen werden, da bislang keine Studien im Hinblick auf unterschiedlich stark bestrahlte Organbereiche existieren. Im Tiermodell finden sich Hinweise für eine Dosisabhängigkeit der Zytokinfreisetzung. Eine unter dieser Fragestellung von Yi et al. veröffentlichte Arbeit [80], bei der Ratten mit 15 bzw. 30 Gy im Bereich des Thorax bestrahlt wurden, deutet auf eine dosisabhängige Expression von TGF- β hin. Dieses Zytokin lag in der BAL-Flüssigkeit der stärker bestrahlten Tiere in höherer Konzentration vor im Vergleich zu den Ratten, die der niedrigeren Dosis ausgesetzt waren.

Wurden in jüngster Zeit auch Fortschritte im Verständnis möglicher Pathomechanismen der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose gemacht, so sind doch die genauen zugrunde liegenden kausalen Vorgänge in ihrer Gesamtheit unklar. Dies liegt einerseits darin begründet, daß zu wenig Untersuchungen – insbesondere am humanen System – vorliegen, andererseits die komplexen Interaktionen zwischen den beteiligten zellulären und humoralen Faktoren noch nicht verstanden sind. Weiterhin ist die Frage offen, inwiefern Patientencharakteristika, wie zum Beispiel Alter, Nikotinkonsum, Tumorphistologie und Erkrankungsstadium, die Entwicklung einer pulmonalen Strahlenreaktion beeinflussen.

2. Zielsetzung

Die Effektivität einer Strahlentherapie im Bereich des Thorax wird durch die pulmonalen Komplikationen in Form einer strahleninduzierten Pneumonitis mit Fibrose limitiert. Die diesen Reaktionen zugrunde liegenden komplexen Prozesse auf zellulärer, biochemischer und molekularer Ebene sind bislang insbesondere am Menschen nur wenig untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollen daher an einem neu etablierten humanen Modell die eine strahleninduzierte pulmonale Schädigung verursachenden Mechanismen analysiert werden. Dabei soll folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Finden sich Hinweise für Veränderungen auf zellulärer und humoraler Ebene in Abhängigkeit von der applizierten Strahlendosis ?
2. Bestehen Einflüsse individueller Faktoren wie Alter, Nikotinkonsum, pulmonale Begleiterkrankungen, Tumorhistologie und -stadium auf die Entwicklung einer Strahlenpneumonitis und lassen sich mögliche Risikofaktoren identifizieren ?
3. Ergeben sich Perspektiven zur Modulation der zugrunde liegenden Prozesse im Hinblick auf eine kausale Therapieoptimierung, zum Beispiel mit Zytokin-Rezeptorantagonisten, Zytokin-Antikörpern oder Zelloberflächen-Antikörpern ?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollen an dem humanen Modell

- A. die beteiligten Zellen und Zellsubpopulationen nach phänotypischen und funktionellen Eigenschaften sowie
- B. die Expression und Funktion von Zytokinen wie TGF- β , IL-6, IFN- γ und anderer Mediatoren wie Metalloproteinasen als Vermittler der pneumonitischen und fibrotischen Lungenreaktion untersucht werden.

Aus dem besseren Verständnis dieser Prozesse könnten sich neue präventive und therapeutische Strategien ableiten lassen, welche die Voraussetzungen für eine

wirksame Behandlung und die Vermeidung dieser Strahlenreaktion schaffen. Daraus würde sich einerseits die Verbesserung der Lebensqualität der Tumorpatienten ergeben, andererseits wäre dies die Grundlage für eine intensiviertere Bestrahlung mit Erhöhung der Tumorkontroll- und Heilungsrate.

3. Patienten, Materialien und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1 Patientencharakteristika und zeitlicher Ablauf der Untersuchungen

In die Evaluierung wurden 16 Patienten (13 Männer, 3 Frauen; mittleres Alter 65 (45 - 77) Jahre) mit Bronchialkarzinomen unterschiedlicher Histologie (14 NSCLC, 2 SCLC) und primärer oder adjuvanter Strahlentherapie (4 bzw. 12 Patienten) aufgenommen. Zwei Patienten hatten vor Bestrahlungsbeginn eine Chemotherapie erhalten. Voraussetzung waren ein Karnofsky-Index $\geq 70\%$ sowie eine statistische Lebenserwartung von mindestens sechs Monaten. Die Patienten wurden ausführlich über den Studiencharakter der Untersuchung unterrichtet und gaben ihr Einverständnis. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Patientendaten ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Das Studienprotokoll sah den in Abbildung 2 schematisch dargestellten Ablauf von Untersuchungen vor Beginn und am Ende der Bestrahlung sowie sechs Wochen und drei bis vier Monate nach Beendigung der Strahlentherapie vor. Zu jedem dieser Zeitpunkte wurde eine eingehende klinische Untersuchung der Patienten durchgeführt und eine Röntgenthoraxaufnahme in zwei Ebenen angefertigt. Dabei ist insbesondere auf klinische Zeichen einer strahleninduzierten Pneumonitis geachtet worden, die mit Verschlechterung des Allgemeinbefindens, Fieber oder subfebrilen Temperaturen, unproduktivem Husten und Dyspnoe ohne Anhalt für ein infektiöses Geschehen einhergeht. Die Beurteilung der Röntgenaufnahmen bezüglich einer strahleninduzierten Pneumonitis erfolgte durch einen klinisch erfahrenen Radiologen sowie einen Strahlentherapeuten. Eine Bronchoskopie mit BAL fand vor Bestrahlung sowie drei bis vier Monate nach Beendigung der Strahlentherapie statt. Die 16 Patienten nahmen wie folgt an den bronchoskopischen Untersuchungen teil: sechs Patienten vor Bestrahlung, acht Patienten drei bis vier Monate nach Bestrahlung sowie zwei Patienten zu beiden Untersuchungszeitpunkten.

Da bis Ende 1998 die Applikation einer medikamentösen Pneumonitisprophylaxe (atemur[®] N forte 250 DA 2 x 2 Hübe, Doxycyclin[®] 100 mg Kapseln 1 x 1 pro Tag) für die Dauer der Bestrahlung einschließlich vier Wochen nach Bestrahlungsende üblich war, haben die untersuchten Patienten – bis auf eine nach diesem Zeitpunkt eingeschlossene Patientin – diese Medikation erhalten.

Tabelle 1: Patientencharakteristik

Patient	Bronchoskopie und BAL	Alter	Geschlecht	TNM Stadium	Histologie	Tumor-lokalisation	RP	Therapie vor Bestrahlung	Bestrahlung	Begleit-Pulmonale Erkrankungen
1	a	68	m	pT2N2M0 III A	PE-Ca	li LOL		Pneumektomie li	adjuvant	Chronisch obstruktive Bronchitis
2	a	62	w	ED	SCLC	re Hilus		Chemotherapie	adjuvant	keine
3	a	58	m	pT2N1M0 II	PE-Ca	re LOL		LOL-Resektion re	adjuvant	keine
4	a	65	m	T3-4N3Mx III B	PE-Ca	re LOL			primär	Chronisch obstruktive Bronchitis
5	a	65	m	pT2N2M0 III A	Adeno-Ca	re LOL		LOL-Resektion re	adjuvant	keine
6	a	66	m	pT2N2M0 III A	PE-Ca	li LUL		LUL-Resektion li	adjuvant	Pneumokoniose
7	a, b	66	w	pT2N3M0 IV	Adeno-Ca	re LOL	RP ki	Segmentresektion im re LOL	adjuvant	keine
8	b	62	m	T2N2M0 III A	PE-Ca	re Hilus	RP ki		primär	Chronisch obstruktive Bronchitis, Pulmonale Hypertonie
9	b	77	w	T4N0Mx III B	PE-Ca	re LOL	RP ki	Segmentresektion im re LOL	adjuvant	Lungentuberkulose 1959
10	b	45	m	pT1N1M0 II	Adeno-Ca	re LML	RP rad	LML-Resektion re	adjuvant	keine
11	b	55	m	LD	SCLC	re LOL	RP rad	Chemotherapie	adjuvant	keine

Fortsetzung Tabelle 1

Patient	Bronchoskopie und BAL	Alter	Geschlecht	TNM Stadium	Histologie	Tumor-lokalisierung	RP	Therapie vor Bestrahlung	Bestrahlung	Begleit-Pulmonale Erkrankungen
12	b	67	m	pT2N1Mx II	PE-Ca	re LUL	RP rad	LUL-Resektion re	adjuvant	Chronische Bronchitis
13	b	69	m	pT2N2M0 III A	PE-Ca	li LOL	keine	LOL- u. LUL-Resektion li	adjuvant	keine
14	b	76	m	pT3N1M0 III A	PE-Ca	li Hilus	keine	Pneumektomie li	adjuvant	Chronische Bronchitis
15	b	71	m	T4N2M0 III B	PE-Ca	re LOL	keine		primär	keine
16	a, b	61	m	T2N3M1(HEP) IV	Adeno-Ca	re LOL	keine		primär	Chronisch obstruktive Bronchitis

Abkürzungen:

a vor Bestrahlung
b 3-4 Monate nach Bestrahlung
m männlich
w weiblich
ED extensive disease
LD limited disease
PE Pattenepithel
Ca Karzinom

SCLC

re rechts
li links
LOL Lungenoberlappen
LML Lungenmittellappen
LUL Lungenunterlappen
RP Radiation Pneumonitis,
Strahleninduzierte Pneumonitis
kl klinisch und radiologisch nachweisbar
rad radiologisch nachweisbar

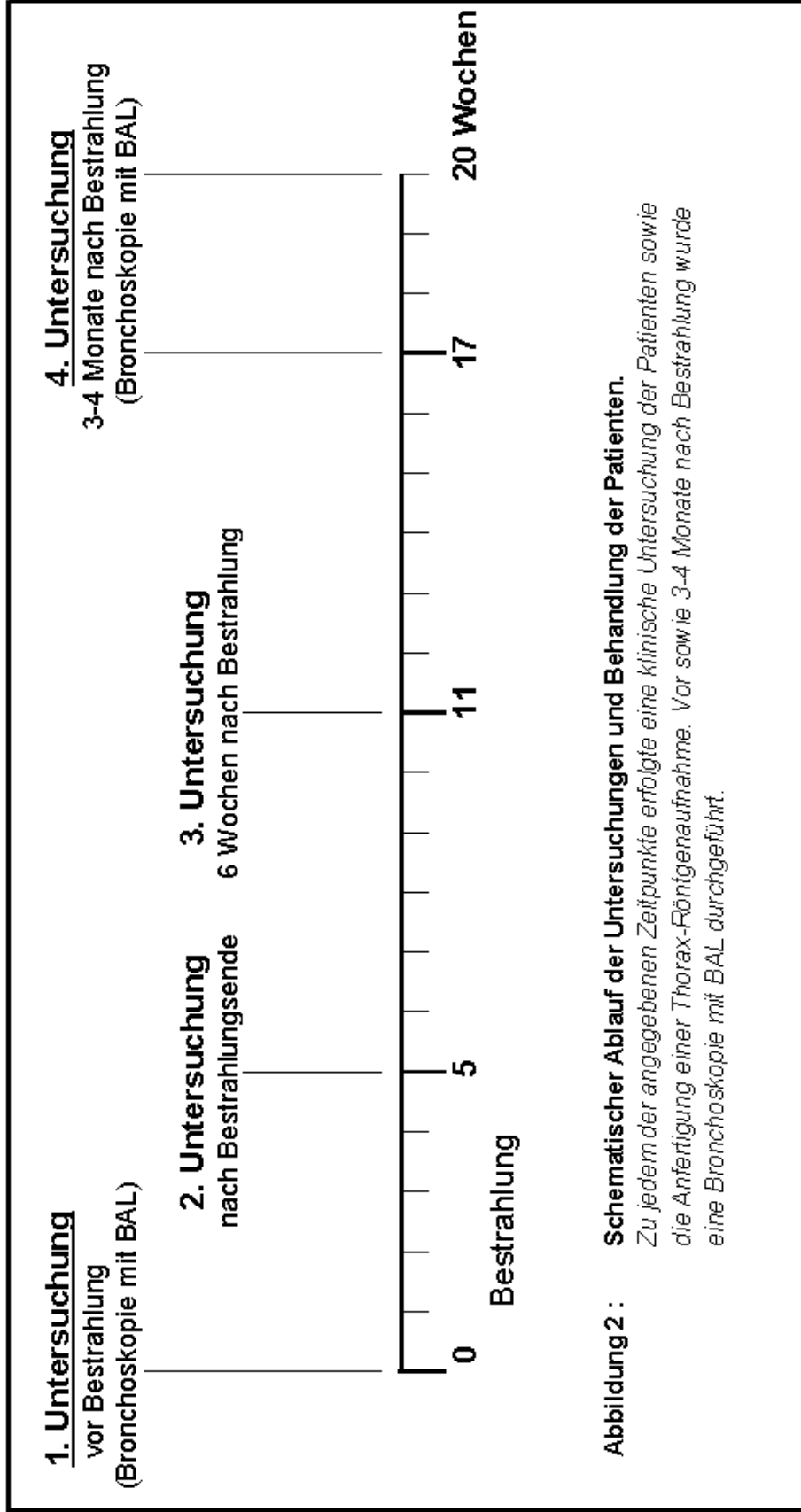


Abbildung 2 : Schematischer Ablauf der Untersuchungen und Behandlung der Patienten.
Zu jedem der angegebenen Zeitpunkte erfolgte eine klinische Untersuchung der Patienten sowie die Anfertigung einer Thorax-Röntgenaufnahme. Vor sowie 3-4 Monate nach Bestrahlung wurde eine Bronchoskopie mit BAL durchgeführt.

3.1.2 Bestrahlung und Erfassung der räumlichen Dosisverteilung

Die applizierte Gesamtstrahlendosis im Zielgebiet lag bei allen Patienten zwischen 50 und 60 Gy, die fraktioniert mit zwei Gy pro Tag an fünf Tagen der Woche verabreicht wurde. Die Bestrahlung erfolgte in Form einer Dreifeldertechnik mit einem Linearbeschleuniger (Siemens KD2). Mit dem Planungssystem Helax-TMS (Version 3.1.), das eine dreidimensionale Bestrahlungsplanung gewährleistet, ist es möglich, die Dosisverteilung der Strahlung im gesamten Lungengewebe und damit auch räumlich quantitativ zu erfassen. Auf dieser Technik basiert die Zuordnung von bestimmten Strahlendosen (<5 Gy, 20-30 Gy, >40 Gy) zu entsprechenden Lungensegmenten, die im Rahmen der Bronchoskopie lavagiert wurden (vgl. Abb. 3).

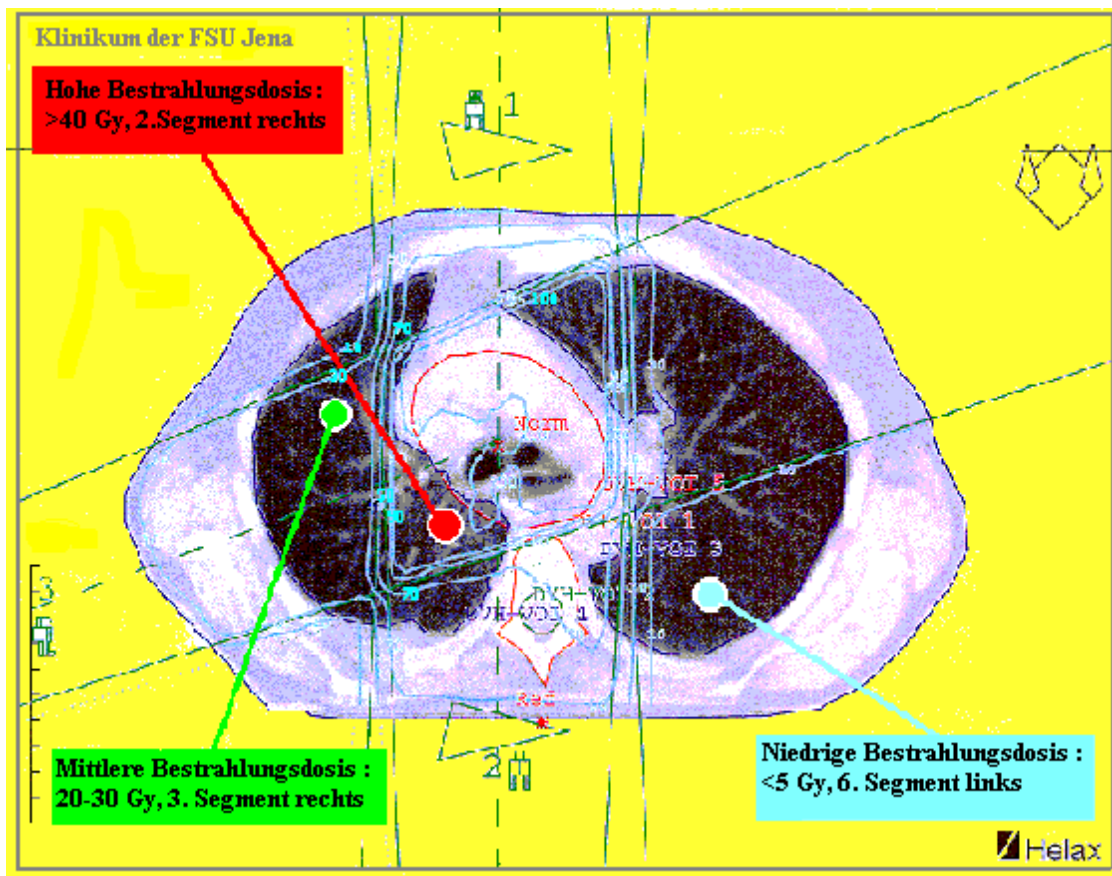


Abbildung 3: Dreidimensionale Bestrahlungsplanung mit CT-gestützter Definition des klinischen Zielvolumens und Darstellung der Isodosen.

Das Bestrahlungsplanungssystem Helax-TMS ermöglicht eine dreidimensionale Bestrahlungsplanung, so daß die Dosisverteilung der Strahlung im gesamten Lungengewebe räumlich quantitativ erfaßt werden kann. Dadurch ist die Zuordnung von bestimmten Strahlendosen zu entsprechenden Lungensegmenten möglich, die bei der Bronchoskopie lavagiert wurden.

3.1.3 Auftreten der strahleninduzierten Pneumonitis

Drei der zehn Patienten, die sich drei bis vier Monate nach Beendigung der Strahlentherapie einer Bronchoskopie mit BAL unterzogen, hatten eine klinische Pneumonitis entwickelt, welche im Zeitraum von vier, sieben bzw. elf Wochen nach Ende der Bestrahlung aufgetreten war. Die mehrwöchige Therapie beinhaltete die Kombination aus einem Kortikosteroid sowie einem Antibiotikum zur Prävention möglicher bakterieller Superinfektionen.

Drei weitere Patienten wiesen nach sechs bzw. zwölf Wochen pneumonistypische Veränderungen im Röntgenthoraxbild auf, hier lag eine radiologische Pneumonitis vor. Diese sechs Patienten bildeten in der vorliegenden Studie die Gruppe der Patienten mit strahleninduzierter Pneumonitis.

Vier Patienten boten während des Beobachtungszeitraumes von insgesamt sechs Monaten keinen klinischen oder radiologischen Anhalt für diese Bestrahlungsfolge.

3.2 Materialien

Die folgende Aufstellung gibt die in den durchgeführten Untersuchungen verwendeten Laborgeräte und Substanzen an, deren Einsatz im Abschnitt Methoden (vgl. 3.3.) detailliert beschrieben wird.

3.2.1 Geräte

Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
Flexibles Bronchoskop (BF-1T240, BF-1T40)	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, D
Reversed Phase 18-Column für Flüssigkeitschromatographen	Merck Co., Darmstadt, D
Kühlzentrifuge Rotanta 96 RS	Hettich, Tuttlingen, D
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Jena, D
Mikrotiterplatten-Reader	SLT SPECTRA, Crailsheim, D
Vortex-Schüttler	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Pittsburgh, USA

3.2.2 Medikamente

atemur [®] N forte 250 DA	Glaxo Wellcome, Bad Oldesloe, D
Dicodid [®] Injektionslösung	Knoll Deutschland, Ludwigshafen, D
Doxycyclin [®] 100 mg	Jenapharm, Jena, D
Xylocain [®] Pumpspray Lösung	AstraZeneca, Wedel, D

3.2.3 Chemikalien und Biochemikalien

3,4-Dehydroprolin	Merck Co., Darmstadt, D
Dinatriummonohydrogenphosphat	Merck Co., Darmstadt, D
Dowex [®] 50 WX 8	Merck Co., Darmstadt, D
Essigsäure	Merck Co., Darmstadt, D
Ethanol	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, D
FCS	Gibco BRL Life Technologies, Rockville, USA
Light Green	Fluka Chemie, Buchs, CH
Methanol	Sigma, St. Louis, USA
Natriumacetat-Trihydrat	Merck Co., Darmstadt, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, D
PBS	Bio Concept, Allschwil, CH
Saponin	Sigma, St. Louis, USA
Toluidinblau	Fluka Chemie, Buchs, CH
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Merck Co., Darmstadt, D
Zitronensäure	Merck Co., Darmstadt, D

3.2.4 Antikörper

CD103-FITC	Immunotech, Marseille, F
CD103-PE	Dako, Glostrup, DK
CD25-FITC	Pharmingen, San Diego, USA
CD3-Cy5	Pharmingen, San Diego, USA
CD4-PE	Pharmingen, San Diego, USA
CD8-APC	Pharmingen, San Diego, USA

CD8-FITC	Pharmingen, San Diego, USA
CD8-FITC/ CD4-PE/ CD3-Cy5	Dako, Glostrup, DK
HLA-DR-FITC	Pharmingen, San Diego, USA
IgG1-APC	Immunotech, Marseille, F
IgG1-Cy5	Immunotech, Marseille, F
IgG1-FITC	Immunotech, Marseille, F
IgG1-PE	Immunotech, Marseille, F

3.2.5 Zytokin-Assays

human GM-CSF	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
human IFN- γ	IBL, Hamburg, D
human IL-2	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
human IL-4	IBL, Hamburg, D
human IL-5	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
human IL-6	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
human KGF	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
human MMP-9	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
human TGF- β 1	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
human TNF- α	R&D SYSTEMS, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Neopterin	IBL, Hamburg, D

3.2.6 Labortechnische Hilfsmittel

Gaze 10x10 mm	Rauscher, Oberdorf, D
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim, D
5 ml-Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, Heidelberg, D
50 ml-Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, Heidelberg, D

3.2.7 Färbelösungen

Kimuralösung:

- 11,0 ml Toluidinblau-Lösung 0,05%
- 5 ml PBS, pH 6,4; 0,1 M
- 0,8 ml Light Green 0,03%

- 0,5 ml Saponin, gesättigt in 50% Ethanol

Nach dem Ansetzen wurde die Lösung gut gemischt und steril filtriert.

May-Grünwald Sigma, St. Louis, USA

- Verwendung der Stammlösung

Giemsa Sigma, St. Louis, USA

- Verdünnung der Stammlösung 1:20 mit destilliertem Wasser

3.2.8 Puffer und Lösungen für HPLC

Acetatpuffer:

- 50 mM Natriumacetat; pH 7,0 (6,005 g Essigsäure gelöst in 1950 ml Wasser, pH-Adjustierung mit NaOH)

Acetat-Zitrat-Zitronensäure-Puffer:

- hergestellt durch Lösen von 58,7 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 57,1 g Natriumacetat-Trihydrat und 5,5 g Zitronensäure in 800 ml; pH 6,0

Extraktionspuffer:

- 80% Methanol und 20% Acetatpuffer

Interner Standard:

- 8 mg 3,4-Dehydroprolin in 100 ml Wasser gelöst

Phosphat-Zitronensäure-Puffer:

- 0,2 M Dinatriummonohydrogenphosphat und 0,1 M Zitronensäure; pH 5,0

Standardlösungen:

- je 100, 300, 500 µmol/l Hydroxyprolin gelöst in Wasser; Herstellung aus entsprechender Stocklösung

3.2.9 Verwendete Software

easy WIN fitting Version 3.3a, 1995-1997 SLT-TECAN

FACS-Auswertungssoftware CellQuest Version 3.1, 1997, USA

HPLC-Software: HSM Manager, Merck Co., Darmstadt, D

SigmaPlot 5.0, 1999, USA

SPSS 10.0 for Windows, 1999, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Bronchoskopie und Bronchoalveoläre Lavage

Nach Prämedikation mit einer Ampulle Dicodid[®] Injektionslösung sowie unter Rachen-Lokalanästhesie mit Xylocain[®] Pumpspray erfolgte die Untersuchung der Patienten mit einem flexiblen Bronchoskop. Die vorher definierten Lungen-segmente (vgl. 3.1.2) sind jeweils mit 100 ml körperwarmer, physiologischer Kochsalzlösung, unterteilt in fünf Aliquots zu je 20 ml, lavagiert worden. Aufgrund vorangegangener Resektionen (vgl. Tab. 1) oder tumorbedingter veränderter anatomischer Gegebenheiten war dieses Vorgehen nicht immer möglich, wodurch sich die differenten n-Zahlen in den Gruppen ergeben. Die Flüssigkeit wurde nach jeder Fraktion vorsichtig abgesaugt, in 50 ml-Reaktionsgefäße transferiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

3.3.2 Aufarbeitung der Lavageflüssigkeit

Nach Filtration der BAL durch eine feinporige, dreilagige Gaze zur Elimination grober Schleim- und Verunreinigungspartikel erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 300g und 4° C. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Untersuchung in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen zu je 500 µl aliquotiert bei -70° C tiefgefroren. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 0,2 - 5 ml PBS/ 2%FCS resuspendiert. FCS ist zur Verbesserung der Zellviabilität sowie zur Reduktion von Adhärenzen (Zell-Zell; Zell-Plastik) zugesetzt worden. Während der gesamten Bearbeitung wurde streng darauf geachtet, die Zellsuspensionen bei 4° C aufzubewahren.

3.3.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Quantifizierung der Zellzahl wurde ein Volumenteil Zellsuspension mit neun Volumenteilen Kimuralösung gemischt. Die Auszählung ist in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop durchgeführt worden. Dabei entsprach ein mittleres Zählfeld 1×10^5 Zellen. Durch Multiplikation der so ermittelten Zellzahl pro Milliliter mit dem Volumen, das dem Zellpellet nach Abnahme der Überstände zugesetzt wurde, erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl. Nach Ermittlung der vorhandenen Zellen pro Milliliter wurde die Suspension mit dem entsprechenden Volumen PBS/ 2%FCS auf eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen pro Milliliter für die folgenden Analysen eingestellt.

3.3.2.2 Differenzierung der Zelltypen

Zur Zelldifferenzierung wurde ein Cytospin-Präparat mit nachfolgender May-Grünwald/Giemsa-Färbung angefertigt. Dazu wurden 100 μ l PBS/ 2%FCS mit 100 μ l der auf 1×10^6 /ml eingestellten Zellsuspension in einem Zytozentrifugen-Röhrchen vermischt und in der Zytozentrifuge bei 300g für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Präparat für 20 Minuten in die Färbelösung nach May-Grünwald getaucht, mit destilliertem Wasser gespült und für weitere 10 Minuten in die Giemsa-Farblösung gestellt. Nach Trocknung erfolgte die differentielle Auszählung von 200 nichtepithelialen Zellen im Lichtmikroskop.

3.3.2.3 Durchflußzytometrie

Mit Durchflußzytometrie wird eine Technik bezeichnet, die es erlaubt, eine Zellpopulation simultan hinsichtlich mehrerer physikalischer Eigenschaften der beteiligten Einzelzellen zu analysieren. Dies ermöglicht eine schnelle und exakte Unterscheidung sowie Phänotypisierung verschiedenster Zellen. Auf Einzelzellebene liefert sie Informationen bezüglich der Größe, Granularität sowie Fluoreszenzintensität. Die zur Markierung der Zellen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind an monoklonale Antikörper, die gegen zu untersuchende Oberflächenantigene gerichtet sind, gebunden. Die auf diese Weise markierten Zellen werden im Durchflußzytometer in einer dünnen Kapillare angesaugt, so daß ein Strom einzelner Zellen entsteht, der mit Laserlicht der Wellenlänge von 488 nm in Kontakt tritt. Über Photodetektoren erfolgt die Messung des Vorwärtsstreulichtes als Maß für die Zellgröße und des Seitwärtsstreulichtes als Maß für die Granu-

larität sowie die Erfassung der emittierten Fluoreszenzintensität, die ein Korrelat der zellulären Bindungsstellen des entsprechenden Oberflächenantigens darstellt. Nach dem Meßvorgang können die gespeicherten Daten mit der speziellen FACS-Software (CellQuest®) ausgewertet werden.

Mit dem verwendeten Durchflußzytometer war die gleichzeitige Messung auf vier verschiedenen Fluoreszenzen möglich: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert grünes Licht der Wellenlänge 519 nm, Phycoerythrin (PE) gelbes Licht von 578 nm, Cytochrom 5 (Cy5) rotes Licht von 670 nm und Allophycocyanin (APC) rotes Licht von 660 nm.

Die Probenzubereitung geschah folgendermaßen: 100 µl der auf 1×10^6 pro Milliliter eingestellten Zellsuspension wurden mit je 10 µl Fluoreszenz-markiertem Antikörper in 5 ml-Reaktionsgefäßen für eine halbe Stunde im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 2 ml PBS/ 2%FCS gewaschen, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 300 µl PBS/ 2%FCS aufgenommen. Die durchflußzytometrische Messung erfolgte innerhalb der nächsten halben Stunde. Es wurden 1×10^5 Zellen gezählt. Während der Verarbeitung und Messung sind die Proben gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt worden.

Bei der Auswertung wurde eine Region R1 definiert, die im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht der Lymphozytenpopulation entsprach. Diese ist auf das Vorhandensein der markierten Oberflächenmoleküle untersucht worden.

3.3.2.4 Zytokin-Assays

Die ELISA-Technik (vgl. Abb. 4) ermöglicht es, Proteine in einer Konzentration von weniger als ein Nanogramm (10^{-9} g) in einer Probe durch den Einsatz von Antikörpern nachzuweisen. Der für das betreffende Protein spezifische Antikörper ist an eine polymere Matrix, zum Beispiel eine Polyvinylchloridplatte, gebunden. Nach Zugabe der zu untersuchenden Lösung, im vorliegendem Fall BAL-Flüssigkeit, erfolgt die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen. Nicht gebundene Moleküle werden im folgenden Waschschrift entfernt. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Antigen-Moleküls gerichtet ist, hinzugefügt. Auch hier werden ungebundene Teilchen durch einen Waschschrift beseitigt. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, durch dessen katalytische Aktivität ein zugegebenes farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umgewandelt wird, dessen Farbintensität proportional zur Antigen-Konzentration

ist. Die Extinktionen werden mit einem Mikrotiterplatten-Reader gegen einen Referenzwert gemessen und die in der Probe enthaltenen Antigen-Konzentrationen anhand einer Standardkurve – erstellt durch mitgeführte Standardlösungen – berechnet.

Die Testdurchführung erfolgte mit kommerziell erhältlichen Assays von R&D SYSTEMS sowie IBL. Die Berechnungen sind mit Hilfe des Computerprogrammes easy WIN fitting (Version 3.3a) durchgeführt worden.

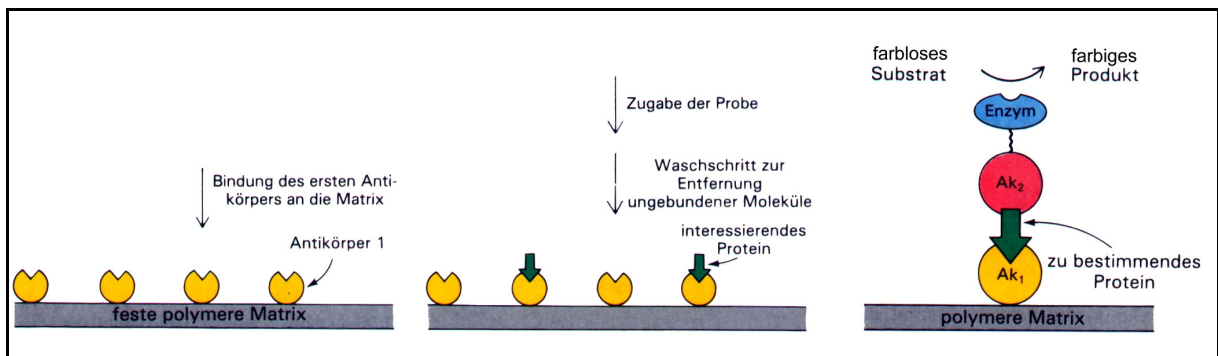


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), modifiziert nach [118].

Der gegen das zu ermittelnde Protein gerichtete erste Antikörper (Ak_1) ist an eine feste polymere Matrix gebunden. Nach Zugabe der BAL-Flüssigkeit erfolgt die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen, nicht gebundene Moleküle werden durch einen Waschschritt entfernt. Der zweite Antikörper (Ak_2) ist mit einem Enzym gekoppelt, dessen katalytische Aktivität ein zugegebenes farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt. Die Farbintensität ist proportional zur Antigen-Konzentration.

3.3.2.5 HPLC zur Bestimmung von Hydroxyprolin

Die Chromatographie stellt eine biochemisch-analytische Technik zur Proteinfractionierung dar. Basierend auf unterschiedlicher Affinität der Probenmoleküle (mobile Phase) zur entsprechenden Säulenmatrix (stationäre Phase) erfolgt hier die Trennung der einzelnen Komponenten. Insbesondere die HPLC hat sich als exzellente Methode einer Peptidseparation erwiesen, welche sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und schnelle Analysezeiten auszeichnet.

Die Probenzubereitung umfaßte folgende Schritte: In die entsprechende Anzahl brauner Reagenzgläser wurden je 200 mg Dowex[®] 50 WX 8 (H⁺)-Harz vorgelegt. Dann erfolgte die Zugabe von 250 µl BAL-Flüssigkeit bzw. Standardlösungen zu 100, 300 und 500 µmol/l Hydroxyprolin sowie jeweils 250 µl internem

Standard. Dieses Gemisch wurde mit je 1,5 ml Phosphat-Zitronensäure-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei ca. 400g geschüttelt. Nach der anschließenden Zentrifugation (800g, 5 Minuten) ist der Überstand abgesaugt worden. Nun wurde das Harz in 6 ml Wasser aufgenommen, mit einem Vortex-Schüttler gut gemischt und wiederum bei 800g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach ist der Überstand so quantitativ wie möglich abgesaugt worden. Die verschlossenen Reagenzgläser wurden für 16 Stunden in einem Heizblock bei 115° C erhitzt. Nachdem das Harz abgekühlt war, wurde es mit 1 ml Acetat-Zitrat-Zitronensäure-Puffer versetzt, kurz aufgemischt und für 10 Minuten bei 400g geschüttelt. Nach der anschließenden 5minütigen Zentrifugation bei 800g wurden 400 µl des Überstandes als Probe abgenommen, in entsprechende Reaktionsgefäße transferiert und mit 600 µl Extraktionspuffer verdünnt. Die folgende Messung der Hydroxyprolinkonzentration ist mit einem vollautomatischen Flüssigkeitschromatographen (Reversed Phase 18-Säule; Ex 470 nm, Em 530 nm) durchgeführt worden, das Injektionsvolumen betrug 40 µl. Für die Auswertung wurde das Software-Programm HSM-Manager verwendet.

3.3.3 Statistik

Alle statistischen Berechnungen sind mit Hilfe eines Computerprogrammes (SPSS 10.0 for Windows, 1999, USA) durchgeführt worden. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden non-parametrisch mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen und Wahrscheinlichkeiten mit einem $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Ebenfalls vermerkt sind p-Werte zwischen 0,05 und 0,1, die eine marginale Signifikanz anzeigen und auch als empirische Tendenz in eine Richtung interpretiert werden [119].

Die Daten in den Diagrammen wurden, sofern nicht gesondert vermerkt, in Form von Boxplots unter Verwendung eines weiteren Computerprogrammes (SigmaPlot 5.0, 1999, USA) dargestellt. In den Tabellen sowie im Text sind die Werte als Median, der ebenso wie die Boxplots wegen der kleinen Stichprobenumfänge gewählt wurde, zuzüglich Minimum und Maximum verzeichnet.

4. Resultate

4.1 Strahleninduzierte Veränderungen in der Bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit und ohne Pneumonitis

Während zum Zeitpunkt vor Bestrahlung je Patient ein Segment bei der Bronchoskopie lavagiert wurde, ist versucht worden, nach applizierter Strahlentherapie je Patient Lungensegmente unterschiedlicher Strahlenexposition, nämlich Areale geringer (<5 Gy), mittlerer (20-30 Gy) und hoher Dosis (>40 Gy) dieser Untersuchung zu unterziehen. Aufgrund vorangegangener Resektionen oder tumorbedingter veränderter anatomischer Gegebenheiten war dieses Vorgehen nicht immer möglich, wodurch sich differente n-Zahlen in den Gruppen ergeben.

Die statistische Analyse aller erhobenen Daten von Zellen, Zellsubpopulationen und gelösten Mediatoren in der BAL-Flüssigkeit erbrachte keine markanten Unterschiede in Bezug zur Bestrahlungsdosis, wenn die Segmente dreier verschiedener Dosisgruppen (<5 Gy, 20-30 Gy, >40 Gy) miteinander verglichen wurden. Daher erfolgte als nächster Schritt die Reduktion auf zwei Dosisgruppen, indem eine Zusammenfassung der geringen (<5 Gy) mit der mittleren (20-30 Gy) bzw. der mittleren (20-30 Gy) mit der hohen (>40 Gy) Dosisgruppe durchgeführt wurde. Diese Vorgehensweise ist in Tabelle 2 veranschaulicht.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Dosisgruppen als Basis der statistischen Analyse

3 Dosisgruppen	2 Dosisgruppen (a)	2 Dosisgruppen (b)	1 Dosisgruppe
<5 Gy	} <30 Gy	<5 Gy	- nach Bestrahlung -
20-30 Gy		} >20 Gy	
>40 Gy	>40 Gy		

Auch die Auswertung auf der Grundlage zweier Dosisgruppen ergab für fast alle untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede in Bezug zur Bestrahlungsdosis. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht stellen IL-4, IL-6 und IFN- γ dar, daher wird bei deren Darstellung explizit auf die Dosisrelevanz eingegangen. In Folge der so nachgewiesenen Dosisunabhängigkeit wurden für die meisten Größen die verschiedenen Dosisgruppen nicht mehr berücksichtigt und es erfolgt, sofern

nicht anders angegeben, keine Darstellung in Abhängigkeit der Strahlendosis, sondern ausschließlich im Hinblick auf die Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis.

4.1.1 Rückgewinnungsrate der BAL-Flüssigkeit und Gesamtzellzahl

Nach Inspektion des Bronchialsystems mit einem flexiblen Bronchoskop erfolgte die bronchoalveoläre Lavage. Dazu sind die zuvor definierten Lungensegmente (vgl. 3.1.2) jeweils mit 100 ml körperwarmer, physiologischer Kochsalzlösung lavagiert worden. Die Lavageflüssigkeit wurde vorsichtig aspiriert und das auf diese Weise rückgewonnene Gesamtvolumen ("recovery") erfaßt. Ferner wurde die Gesamtzellzahl nach dem unter 3.3.2.1 beschriebenen Vorgehen ermittelt. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse für diese beiden Parameter.

Tabelle 3: Rückgewonnenes BAL-Flüssigkeitsvolumen und Gesamtzellzahl bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung

		vor Bestr.	RP+	RP-
Recovery (ml)	Median	40	34	15
	Min	11	9	11
	Max	46	71	54
Gesamtzellzahl (x 10 ⁶ pro 100 ml)	Median	15,9	25,8	4,0
	Min	5,5	4,3	0,5
	Max	35,9	70,0	66,7
	n	8	13	9
RP+ vs. RP- : p<0,1				

Die Daten sind als Median zuzüglich des Minimums und Maximums angegeben.

Im Gegensatz zur rückgewonnenen Lavageflüssigkeit (recovery), die keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit (RP+) und ohne (RP-) strahleninduzierte Pneumonitis zeigte, wiesen die von dieser Komplikation betroffenen Patienten eine vermehrte Gesamtzellzahl im Vergleich zu solchen ohne Pneumonitis auf (p<0,1).

Während die recovery zwischen den betrachteten Gruppen auf Grund einer großen Streubreite nicht signifikant differierte, wiesen Patienten mit einer Pneu-

monitis als Ausdruck der entzündlichen Infiltration tendenziell mehr Zellen in der Spülflüssigkeit im Vergleich zu denjenigen ohne diese Bestrahlungskomplikation auf ($25,8 \times 10^6/100$ ml versus $4,0 \times 10^6/100$ ml; $p < 0,1$). Diese Zunahme war durch einen Anstieg der Neutrophilen- und Lymphozytenzahl bedingt (vgl. 4.1.2 bzw. Abb. 5).

4.1.2 Differentialzytologie

Wie vorstehend beschrieben ging eine strahleninduzierte Pneumonitis mit einer vermehrten Gesamtzellzahl einher. Betrachtete man die Beteiligung der einzelnen Zelltypen nach Anfertigung eines Cytospin-Präparates und May-Grünwald/Giemsa-Färbung (vgl. 3.3.2.2), so läßt sich schlußfolgern, daß diese Zunahme in erster Linie auf einen erhöhten Anteil neutrophiler Granulozyten zurückging. Daneben zeigte sich auch eine Vermehrung der Lymphozyten. In Abbildung 5 ist die Differentialzytologie der BAL-Zellen zusammengefaßt.

Die Zellgruppe mit den deutlichsten Veränderungen stellte die der neutrophilen Granulozyten dar (vgl. Abb. 5a). Diese waren bei Patienten mit strahleninduzierter Pneumonitis stark vermehrt ($1,3 \times 10^6/100$ ml). Daraus ergaben sich hochsignifikante Unterschiede sowohl im Vergleich dieser Gruppe zu Patienten ohne Pneumonitis ($1,3 \times 10^6/100$ ml versus $0,28 \times 10^6/100$ ml; $p < 0,01$) als auch gegenüber den Werten vor Bestrahlung ($1,3 \times 10^6/100$ ml versus $0,04 \times 10^6/100$ ml; $p < 0,01$). Stellte man den Zeitpunkt vor Bestrahlung der Gruppe der Patienten ohne Pneumonitis gegenüber, zeigte sich hier eine tendenzielle Zunahme dieser Zellen nach Bestrahlung ($0,04 \times 10^6/100$ ml versus $0,28 \times 10^6/100$ ml; $p < 0,1$).

Analoge Veränderungen im Hinblick auf eine Vermehrung bei Patienten mit Pneumonitis wies die Population der Lymphozyten auf (vgl. Abb. 5b). Aufgrund einer großen Streubreite der Werte lag gegenüber den Patienten ohne Pneumonitis keine statistische ($9,1 \times 10^6/100$ ml versus $2,9 \times 10^6/100$ ml) und im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung eine marginale Signifikanz ($9,1 \times 10^6/100$ ml versus $1,5 \times 10^6/100$ ml; $p < 0,1$) vor.

Die Makrophagen (vgl. Abb. 5c) sowie die eosinophilen Granulozyten (vgl. Abb. 5d) ließen keine Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen erkennen.

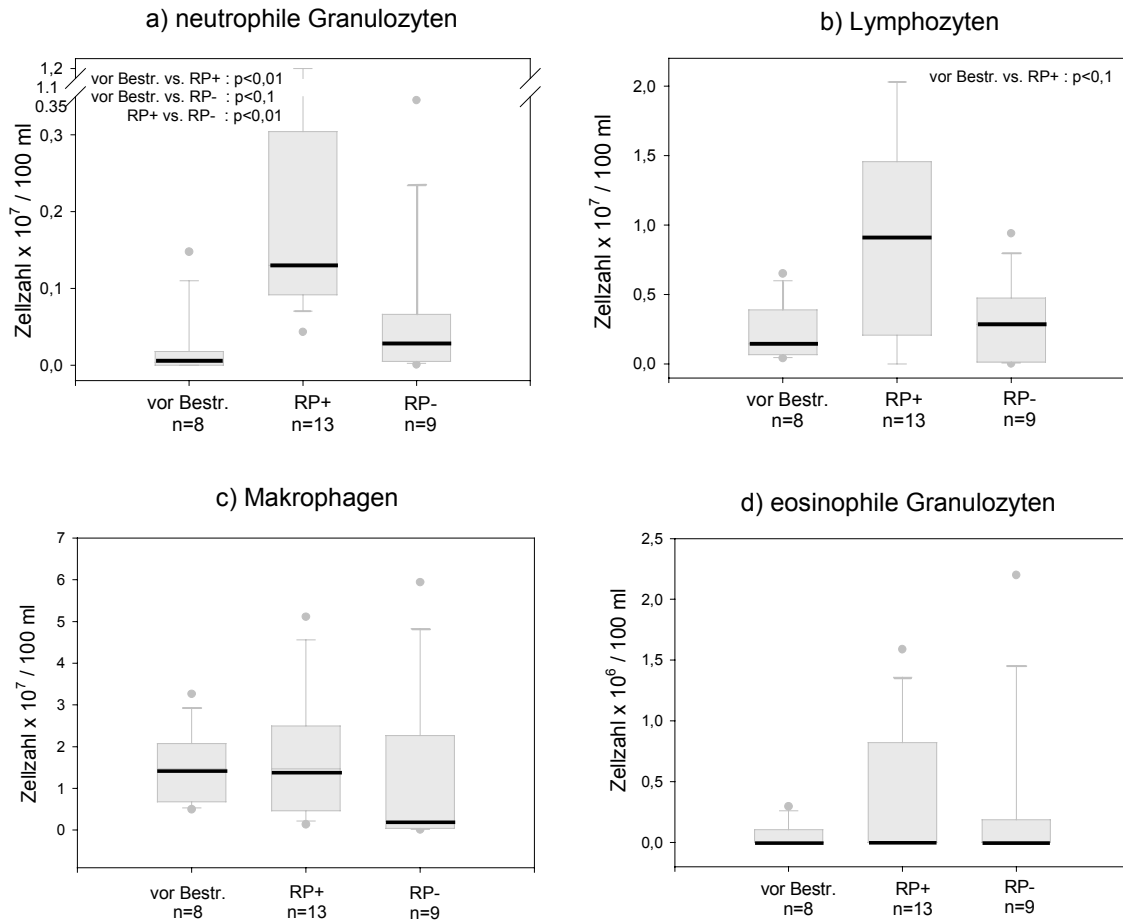


Abbildung 5: Differentialzytologie der BAL-Zellen bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

Das angefertigte Cytospin-Präparat wurde nach May-Grünwald/Giemsa angefärbt. Während Patienten mit Pneumonitis erhöhte Werte für neutrophile Granulozyten (a) und Lymphozyten (b) aufwiesen, zeigten Makrophagen (c) und eosinophile Granulozyten (d) keine Veränderungen zwischen den betrachteten Gruppen. Die Zellzahl der neutrophilen Granulozyten in der Pneumonitisgruppe war sowohl im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung als auch zur pneumonitisnegativen Gruppe hochsignifikant vermehrt (jeweils $p < 0,01$). Patienten ohne Pneumonitis hatten gegenüber denen vor Bestrahlung eine tendenziell erhöhte Neutrophilenzahl ($p < 0,1$). Die bei Patienten mit Pneumonitis ebenfalls vermehrten Lymphozyten ließen zwischen der Gruppe vor Bestrahlung und Patienten mit Pneumonitis eine marginale Signifikanz erkennen ($p < 0,1$).

4.1.2.1 Verteilung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten

Nach Erstellung des Differentialzellbildes der BAL, das eine vermehrte Zahl an Lymphozyten bei Patienten mit Pneumonitis aufwies, folgte die Analyse beteiligter Lymphozyten-Subpopulationen. Diese wurde mittels durchflußzytometrischer Messung der fluoreszenzmarkierten Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD8 durchgeführt. Diese Methode ist unter Punkt 3.3.2.3 ausführlich beschrieben. Dabei stellt CD3 einen Marker für die Gruppe der T-Lymphozyten dar, CD4 wird von T-Helfer-Zellen exprimiert, und CD8 findet sich auf T-Suppressor-Zellen. In der Auswertung wurde jeweils der relative Anteil CD4⁺- und CD8⁺-Zellen an CD3⁺-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Für Patienten mit Pneumonitis fanden sich nahezu unveränderte Zahlen für beide Lymphozyten-Subpopulationen verglichen mit den Werten zum Zeitpunkt vor Bestrahlung. So betrug der Anteil CD4⁺-Zellen (vgl. Abb. 6a) vor Strahlenexposition 69,3%, der für Patienten mit pulmonaler Bestrahlungskomplikation 74,3%. Die entsprechenden Zahlen für die CD8⁺-Zellen (vgl. Abb. 6b) waren 26,1% bzw. 20,9%. Daraus resultierte ein annähernd gleiches Verhältnis von CD4⁺- zu CD8⁺-Zellen (vgl. Abb. 6c) zum Zeitpunkt vor Bestrahlung und bei Patienten mit Pneumonitis (2,77 und 3,67).

Im Gegensatz dazu fand sich bei Patienten ohne strahleninduzierte Pneumonitis eine Abnahme des Anteils CD4⁺-T-Lymphozyten auf 29,0%, der sich somit signifikant vom Wert der pneumonitispositiven Gruppe unterschied (29,0% versus 74,3%; $p < 0,05$). Pneumonitisnegative Patienten zeigten jedoch eine Zunahme der CD8⁺-T-Lymphozytenpopulation auf 57,5%. Diese Veränderung war im Vergleich zu Patienten mit Pneumonitis hochsignifikant (57,5% versus 20,9%; $p < 0,01$). Auch der Quotient beider Lymphozytensubpopulationen verringerte sich durch die oben beschriebene Dynamik der Zellverteilung auf 0,46 und erwies sich damit signifikant verschieden zwischen den Patienten mit und ohne Pneumonitis (3,67 versus 0,46; $p < 0,05$).

Verglich man die Zahlen der CD4⁺-T-Lymphozyten von Patienten vor Strahlentherapie mit denen der Patienten ohne Ausbildung einer Pneumonitis, ergab sich eine signifikante Abnahme von 69,3% auf 29,0% ($p < 0,05$). Für die CD8⁺-T-Lymphozyten, für die ein Zuwachs von 26,1% auf 57,5% im Vergleich dieser beiden Gruppen beobachtet wurde sowie das Verhältnis beider Zelltypen, welches

sich von 2,77 auf 0,46 änderte, ließ sich jeweils eine empirische Tendenz ($p < 0,1$) nachweisen.

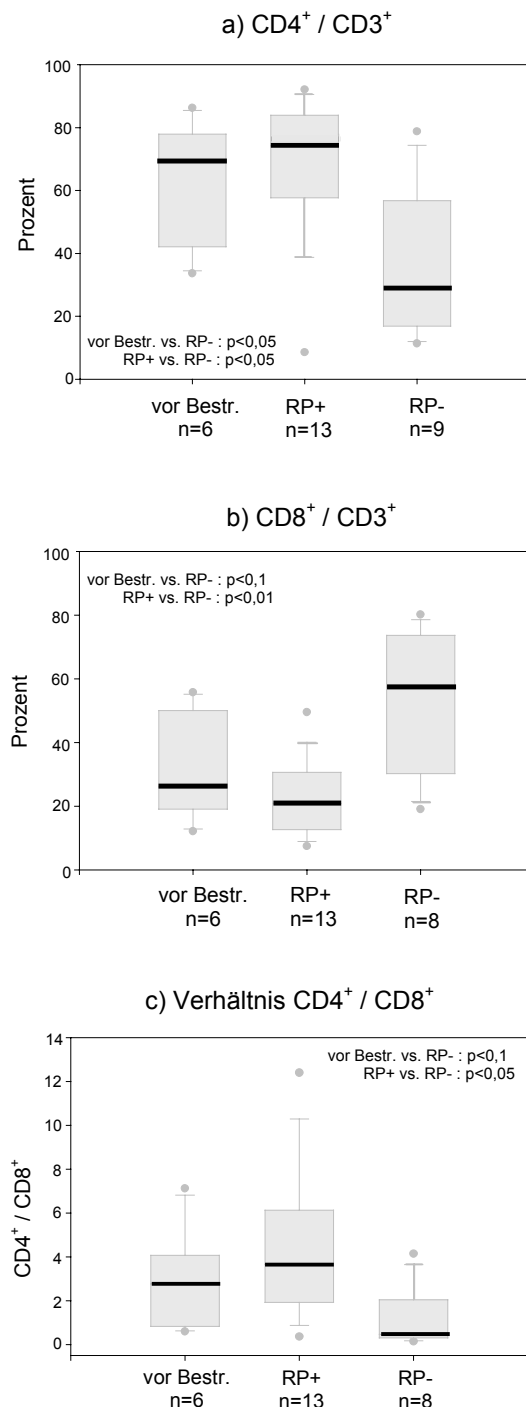


Abbildung 6: Relative Anteile $CD4^+$ - und $CD8^+$ - Zellen an $CD3^+$ -T-Lymphozyten sowie deren Verhältnis in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung. Mittels durchflußzytometrischer Messung der fluoreszenzmarkierten Oberflächenantigene $CD3$, $CD4$ und $CD8$ erfolgte die Ermittlung der relativen Verteilung dieser Lymphozyten-Subpopulationen in der Lavageflüssigkeit. Hier zeigte sich bei Patienten mit Pneumonitis ein erhöhter relativer Anteil $CD4^+$ -T-Lymphozyten (a) im Vergleich zur pneumonitisnegativen Gruppe ($p < 0,05$), welche entgegengesetzt einen gesteigerten Anteil $CD8^+$ -Zellen (b) aufwies ($p < 0,01$). Während zwischen der Gruppe vor Bestrahlung und Patienten mit Pneumonitis kein wesentlicher Unterschied in der Verteilung beider Lymphozytensubgruppen bestand, erwies sich die Abnahme der $CD4^+$ - (a) bzw. die Zunahme der $CD8^+$ -Zellen (b) bei Patienten ohne Pneumonitis verglichen zu den Werten vor Bestrahlung als markant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,1$).

4.1.2.1.1 Expression der Aktivierungsmarker $CD25$ und $HLA-DR$ auf $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten

Um die Frage des Aktivierungsgrades der in der Lavageflüssigkeit vorhandenen Lymphozyten-Subpopulationen von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen zu klären, wurden

die Oberflächenantigene CD25 und HLA-DR auf diesen beiden Zellgruppen bestimmt. Das Antigen CD25, auch als IL-2-Rezeptor bezeichnet, ist ein Marker der frühen Aktivierung, während das HLA-DR-Oberflächenantigen im Rahmen chronischer Entzündungsvorgänge exprimiert wird [120]. Die Messung erfolgte durchflußzytometrisch nach Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, CD8, CD25 und HLA-DR (vgl. 3.3.2.3). Die Resultate dieser Untersuchung sind in Tabelle 4 vermerkt.

Tabelle 4: Relativer Anteil der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR an CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung

		vor Bestr.	RP+	RP-
CD25⁺ / CD4⁺ (Prozent)	Median	5,5	3,1	11,8
	Min	0,4	0,2	0,0
	Max	20,0	12,0	41,4
HLA-DR⁺ / CD4⁺ (Prozent)	Median	2,4	2,7	13,2
	Min	0,0	0,0	1,5
	Max	10,1	57,7	55,6
vor Bestr. vs. RP- : p<0,1 RP+ vs. RP- : p<0,1				
CD25⁺ / CD8⁺ (Prozent)	Median	0,9	0,0	0,0
	Min	0,0	0,0	0,0
	Max	1,6	1,4	2,7
HLA-DR⁺ / CD8⁺ (Prozent)	Median	1,8	1,7	6,6
	Min	0,6	0,0	0,0
	Max	7,7	18,6	11,5
n		6	12	6

Die Daten sind als Median zuzüglich des Minimums und Maximums angegeben.

Die durchflußzytometrische Messung ergab, daß die in der BAL-Flüssigkeit vorhandenen CD4⁺-Zellen einen erhöhten relativen Anteil HLA-DR-exprimierender Zellen bei Patienten ohne Pneumonitis im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung wie auch gegenüber den Patienten mit Pneumonitis aufwiesen (jeweils p<0,1). Unwesentliche Veränderungen mit allenfalls geringer Zunahme in der pneumonitisnegativen Gruppe zeigte das die akute Entzündung kennzeichnende Antigen CD25. Während die CD8⁺-T-Lymphozyten fast kein CD25 exprimierten, war der relative Anteil HLA-DR⁺-Zellen bei Patienten ohne Pneumonitis verglichen mit den beiden anderen Gruppen gering vermehrt.

Insgesamt exprimierten CD8⁺-Zellen beide Aktivierungsmarker in geringerem Ausmaß als CD4⁺-Zellen. Weiterhin zeigte sich für CD25 bei den CD4⁺-T-Lymphozyten kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen. Allenfalls gering vermehrt war der Anteil CD25⁺/CD4⁺-Zellen bei den Patienten ohne strahleninduzierte Pneumonitis mit 11,8% im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung (5,5%) sowie zur Gruppe der Pneumonitispatienten (3,1%). Bei den CD8⁺-T-Lymphozyten ließ sich das CD25-Oberflächenantigen in allen Gruppen gar nicht oder nur in einem sehr geringen Prozentsatz nachweisen (0% - 2,7%).

Im Gegensatz dazu zeigten Patienten ohne pulmonale Strahlenreaktion sowohl im Vergleich zur Gruppe vor Bestrahlung als auch gegenüber Pneumonitispatienten einen gesteigerten Anteil HLA-DR⁺/CD4⁺-Zellen, der eine statistisch empirische Tendenz erkennen ließ (13,2% versus 2,4%; $p < 0,1$ bzw. 13,2% versus 2,7%; $p < 0,1$). Innerhalb der CD8⁺-T-Lymphozyten wurde das HLA-DR-Antigen ebenfalls bei Patienten ohne Pneumonitis verglichen zu den beiden anderen Gruppen vermehrt exprimiert, allerdings erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz (6,6% versus 1,8% bzw. 1,7%).

Betrachtet man nun die Ergebnisse aus den Untersuchungen der beteiligten Lymphozytenpopulationen, also CD4- und CD8-Zellen, in Verbindung mit den Resultaten der gemessenen Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR, läßt sich zusammenfassend ableiten, daß eine strahleninduzierte Pneumonitis zwar mit einem erhöhten Anteil CD4⁺-T-Lymphozyten im Vergleich zur Gruppe ohne Pneumonitis (vgl. Abb. 6a) einhergeht, diese Zellgruppe auf der Grundlage der untersuchten Antigene aber nur ein sehr geringes Aktivierungsniveau aufweist (vgl. Tabelle 4). Im Gegensatz dazu sind bei Patienten ohne strahleninduzierte Lungenreaktion wenige CD4⁺-Zellen nachweisbar, die jedoch Zeichen einer Aktivierung zeigen. Darüber hinaus findet sich die Zahl der CD8⁺-T-Lymphozyten relativ vermehrt (vgl. Abb. 6b), welche nur in geringem Maße CD25 und HLA-DR exprimieren (vgl. Tabelle 4).

4.1.2.1.2 Expression von CD103 auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten

Zur weiteren Charakterisierung der in der Lavageflüssigkeit befindlichen CD4- und CD8-Zellen wurde auch das CD103-Oberflächenantigen analysiert. Dieses Antigen gilt als "homing"-Rezeptor für die Verankerung im Oberflächenepithel. Die ver-

mehrte Expansion dieser Subpopulation ist außerdem mit fibrogenen Prozessen assoziiert [121].

Analog zu den anderen analysierten Zellantigenen erfolgte die Messung durchflußzytometrisch nach Markierung der BAL-Zellen mit fluoreszenztragenden Antikörpern, welche gegen CD4, CD8 und CD103 gerichtet waren. Da dieser Oberflächenmarker erst im Verlauf der experimentellen Phase auf Grund der oben erwähnten neuen Erkenntnisse in das zu untersuchende Parameterspektrum aufgenommen worden ist, liegen nicht für alle Patienten Werte vor; dies erklärt die geringeren n-Zahlen. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

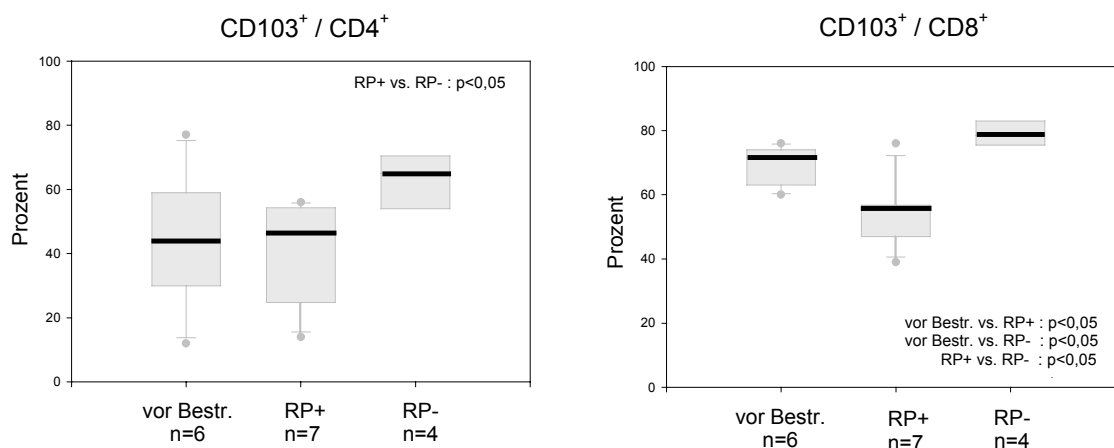


Abbildung 7: Relativer Anteil CD103⁺- an CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

Die durchflußzytometrische Ermittlung ergab sowohl in der Population der CD4⁺- (a) als auch in jener der CD8⁺-T-Zellen (b) eine signifikante Zunahme des relativen Anteils CD103⁺-Zellen bei Patienten ohne Pneumonitis gegenüber denen, die diese Komplikation erlitten (jeweils $p<0,05$). Im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung zeigte sich bei den CD8⁺-T-Lymphozyten (b) eine signifikante Abnahme des Anteils CD103⁺-Zellen in der Pneumonitisgruppe ($p<0,05$) mit einer entsprechenden Zunahme dieser Zellgruppe bei Patienten ohne Pneumonitis ($p<0,05$).

In der Gruppe der CD103⁺/CD4⁺-Zellen (vgl. Abb. 7a) zeigte sich kein Unterschied im relativen Anteil bei Patienten vor Bestrahlung und solchen, die eine Pneumonitis entwickelten (44,5% bzw. 45,8%). Dem gegenüber erfolgte bei Patienten

ohne diese Bestrahlungskomplikation eine Zunahme CD103⁺-Zellen in der Population der T-Helfer-Zellen auf 65,1%, was statistisches Signifikanzniveau im Vergleich zur Pneumonitisgruppe erreichte (65,1% versus 45,8%; $p < 0,05$).

Noch deutlichere Veränderungen wies die Population der CD103⁺/CD8⁺-T-Zellen auf (vgl. Abb. 7b). Hier kam es – jeweils verglichen zum Wert vor Bestrahlung – zu einer Abnahme des Anteils CD103⁺-Zellen bei den Patienten mit strahleninduzierter Pneumonitis (71,7% versus 55,7%; $p < 0,05$) sowie zu einer Zunahme dieser Subpopulation bei Patienten ohne diese Bestrahlungskomplikation (71,7% versus 78,9%; $p < 0,05$). Zwischen der Gruppe mit und ohne Pneumonitis bestand ein statistisch signifikanter Unterschied (55,7% versus 78,9%; $p < 0,05$).

4.1.3 Zytokine in der Lavageflüssigkeit

4.1.3.1 Interleukin-4, Interleukin-6 und Interferon- γ

IL-4 wird auf der Grundlage bislang durchgeführter tierexperimenteller Arbeiten eine Rolle bei der Fibroseentstehung nach Bestrahlung zugesprochen. IL-6 hingegen stellt ein multifunktionelles Protein dar, das von den verschiedensten Zelltypen produziert werden kann und im Rahmen entzündlicher Vorgänge freigesetzt wird. Die interzellulären Wechselwirkungen dieses Moleküles sind zahlreich, heterogen und bislang nicht vollständig geklärt. IFN- γ gilt als Protein mit antiinflammatorischen und antifibrotischen Wirkungen. Um die Frage zu klären, welche Rolle diese Mediatoren im humanen System bei den ablaufenden pathologischen Veränderungen nach Strahlentherapie spielen, erfolgte deren Nachweis in der Lavageflüssigkeit mittels ELISA-Technik (vgl. 3.3.2.4).

Wie eingangs bereits erwähnt (vgl. 4.1) fand sich für die meisten untersuchten Parameter keine Dosisabhängigkeit – ausgenommen IL-4, IL-6 und IFN- γ . Die Zusammenfassung zu zwei Dosisgruppen zeigte für die Konzentrationen dieser Zytokine signifikante Unterschiede zwischen den verglichenen applizierten Strahlendosen bei Patienten mit Pneumonitis (vgl. Abb. 8).

Da bei der Auswertung der Daten von Patienten ohne strahleninduzierte Pneumonitis die obenstehend beschriebene Dosisabhängigkeit nicht nachgewiesen werden konnte und deshalb bei diesen Patienten nur eine Gruppe existiert,

wurde diese mit den oben definierten Dosisgruppen statistisch verglichen. Die erhobenen Daten sind der Abbildung 8 zu entnehmen.

IL-4 (vgl. Abb. 8a) zeigte eine deutlich erhöhte Konzentration in den mit niedriger Dosis bestrahlten Segmenten bei Patienten mit Pneumonitis. Diese erwies sich als signifikant verschieden zu den Werten vor Bestrahlung sowie zur pneumonitisnegativen Gruppe (11,1 pg/ml versus 0 pg/ml; $p < 0,01$ bzw. 11,1 pg/ml versus 0 pg/ml; $p < 0,05$). Im Vergleich der Dosisgruppe < 5 Gy mit jener > 20 Gy in der Gruppe der Patienten mit Pneumonitis bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied (11,1 pg/ml versus 0 pg/ml; $p < 0,05$).

Im Gegensatz dazu fand sich für IL-6 (vgl. Abb. 8b) eine gesteigerte Konzentration in der höchsten Dosisgruppe (> 40 Gy) der Pneumonitispatienten, welche sich signifikant sowohl vom Wert vor Bestrahlung als auch gegenüber dem der pneumonitisnegativen Gruppe unterschied (52,8 pg/ml versus 1,9 pg/ml; $p < 0,01$ bzw. 52,8 pg/ml versus 5,2 pg/ml; $p < 0,05$). Wurden die IL-6-Konzentrationen zwischen den Dosisbereichen < 30 Gy und > 40 Gy verglichen, ergab sich auch hier eine Signifikanz (4,5 pg/ml versus 52,8 pg/ml; $p < 0,05$). Des Weiteren zeigte sich eine tendenziell erhöhte Menge dieses Zytokins bei Bestrahlungsdosen < 30 Gy im Vergleich zum Zeitpunkt vor Strahlentherapie (4,5 pg/ml versus 1,9 pg/ml; $p < 0,1$).

Hierzu parallele Veränderungen fanden sich bei IFN- γ (vgl. Abb. 8c), welches ebenfalls in höchster Konzentration in den stärker bestrahlten Lungenarealen von Pneumonitispatienten nachzuweisen war. Daraus ergaben sich signifikante Unterschiede sowohl im Vergleich zu den mit niedrigerer Dosis bestrahlten Segmenten als auch zu den Patienten ohne diese Bestrahlungskomplikation (34,5 pg/ml versus 14,5 pg/ml; $p < 0,05$ bzw. 34,5 pg/ml versus 12,7 pg/ml; $p < 0,05$). Statistisch nicht belegen ließ sich die Differenz zwischen der erhöhten Konzentration in der Gruppe der Pneumonitispatienten und dem Zeitpunkt vor Bestrahlung, obwohl die ermittelten Werte dieser Kollektive auf einen Unterschied hindeuten (34,5 pg/ml versus 13,5 pg/ml).

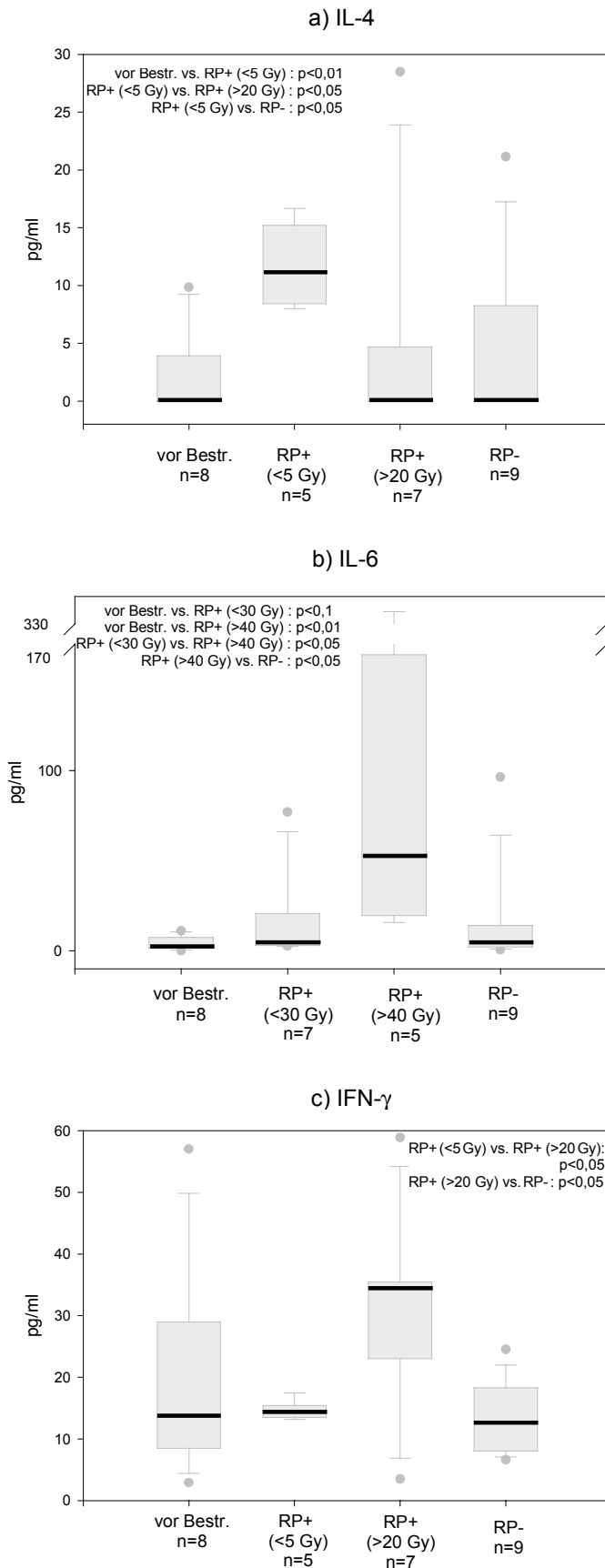


Abbildung 8: Konzentrationen von IL-4, IL-6 und IFN- γ in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

Die Grafik stellt die Konzentrationen von IL-4 (a), IL-6 (b) und IFN- γ (c) sowie deren Beziehungen zur Strahlendosis dar. Die Ermittlung dieser Zytokine erfolgte durch ELISA-Technik. Die untere Nachweisgrenze betrug für IL-4 1,5 pg/ml, für IL-6 0,7 pg/ml und für IFN- γ 1,5 pg/ml.

Während IL-4 eine deutlich erhöhte Konzentration in den mit niedrigerer Dosis bestrahlten Arealen von Pneumonitispatienten aufwies, ließen sich IL-6 und IFN- γ jeweils bei höheren Strahlendosen (>40 Gy bzw. >20 Gy) in gesteigerter Konzentration bei Patienten mit Pneumonitis nachweisen.

Für die genannten Mediatoren können darauf basierend grobe Dosisschwellwerte abgeleitet werden, oberhalb (IL-6, IFN- γ) bzw. unterhalb (IL-4) derer markante Veränderungen der Zytokinkonzentrationen auftreten. Diese Schwellenwerte sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Vermutete Dosisschwellen für die Freisetzungsaktivität der Zytokine bei Patienten mit strahleninduzierter Pneumonitis

Zytokin	Dosisschwelle
IL-4	≤ 20 Gy
IL-6	≥ 30 Gy
IFN- γ	≥ 5 Gy

4.1.3.2 Transforming growth factor beta-1

Für dieses Zytokin liegen bislang die meisten, überwiegend tierexperimentellen Studien vor, die dessen Beteiligung bei der Pathogenese der strahleninduzierten Gewebeveränderungen prüfen und bestätigen. Ursächlich wird dafür die Fähigkeit dieses Faktors, Fibroblasten zur Produktion extrazellulärer Matrix zu aktivieren und den Abbau dieser zu inhibieren, verantwortlich gemacht (vgl. 1.3.2.2). Außer bei fibrotischen vermittelt TGF- β 1 aber auch in entzündlichen Prozessen [122].

Um festzustellen, ob dieses Protein auch während der inflammatorischen Phase der pulmonalen Bestrahlungsreaktion in der BAL-Flüssigkeit beim Menschen vorhanden ist, erfolgte dessen Bestimmung im Rahmen der durchgeführten Studie mittels ELISA-Technik (vgl. 3.3.2.4). Die ermittelten Resultate sind der Abbildung 9 zu entnehmen.

Es zeigte sich, daß dieses Zytokin nach erfolgter Bestrahlung sowohl bei Patienten mit als auch bei denjenigen ohne Pneumonitis in höherer Konzentration vorlag. Die detektierte Menge in der letzteren Gruppe unterschied sich signifikant zum Wert vor Bestrahlung (24,0 pg/ml versus 10,8 pg/ml; $p < 0,05$). Patienten mit Pneumonitis wiesen im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung eine tendenziell gesteigerte Konzentration auf (20,2 pg/ml versus 10,8 pg/ml; $p < 0,1$).

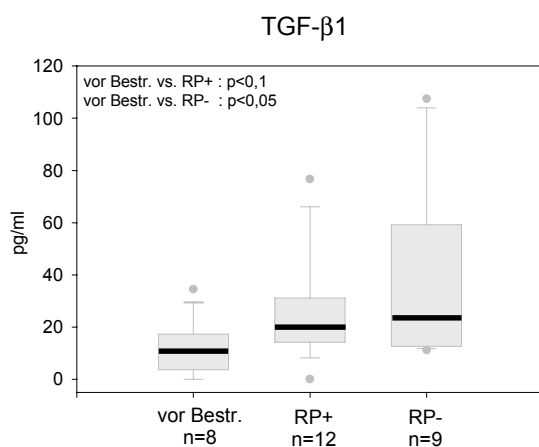


Abbildung 9: Konzentration von TGF- β 1 in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

Die Ermittlung dieses Zytokins erfolgte durch ELISA-Technik, die untere Nachweisgrenze betrug 7 pg/ml. TGF- β 1 ließ sich nach Strahlentherapie sowohl bei Patienten mit als auch bei denen ohne Pneumonitis in erhöhter Konzentration nachweisen. Der Unterschied gegenüber dem Zeitpunkt vor Bestrahlung ist bei ersteren tendenziell ($p < 0,1$), bei letzteren signifikant ($p < 0,05$).

4.1.3.3 Interleukin-2

IL-2 wird hauptsächlich von mitogen- oder antigenstimulierten T-Lymphozyten sezerniert und vermittelt in einer Reihe multipler Immunreaktionen [123, 124]. Weiterhin hält dieses Zytokin – vermutlich mittels Modifikation von Adhäsionsmolekülen – aktivierte inflammatorische Zellen im Gewebe zurück [125]. Somit ist IL-2 vorwiegend in entzündliche Abläufe involviert.

Ob und in wie fern sich dieses Zytokin an der pulmonalen Bestrahlungreaktion beim Menschen beteiligt, bleibt zu klären. Im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte dessen Bestimmung in der Lavageflüssigkeit mit einem Zytokin-Assay in ELISA-Technik (vgl. 3.3.2.4). In Abbildung 10 sind die Ergebnisse dieses Tests dargestellt. IL-2 ließ sich nur in relativ geringer Menge nachweisen, und es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich der untersuchten Gruppen.

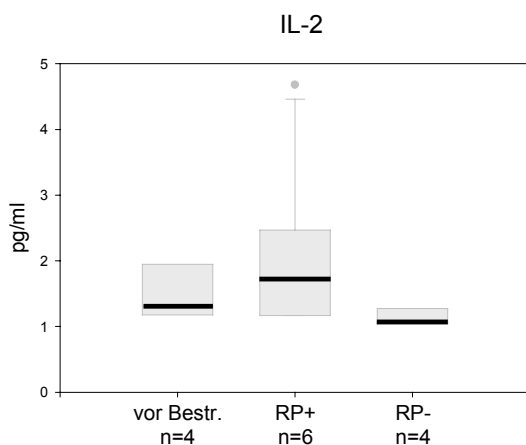


Abbildung 10: Konzentration von IL-2 in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

Die Grafik stellt die Konzentration von IL-2, welche mit ELISA-Technik ermittelt wurde, dar. Die untere Nachweisgrenze betrug 1 pg/ml. Dieses Zytokin lag nur in geringer Menge vor und wies keine Veränderungen im Vergleich der untersuchten drei Gruppen auf.

4.1.3.4 Keratinocyte growth factor und Tumornekrosefaktor alpha

Im Gegensatz zum vermutlich fibroseverstärkenden TNF weisen tierexperimentelle Arbeiten zu KGF dessen protektive Funktion bezüglich der Fibroseentstehung nach (vgl. 1.3.2.2).

Mit der in der vorliegenden Studie angewandten ELISA-Methode ließen sich beide Mediatoren in der BAL-Flüssigkeit nicht detektieren, alle Werte lagen also unterhalb der Sensitivitätsgrenze der vorgeschriebenen Verdünnungsreihe.

4.1.4 Matrixmetalloproteinase MMP-9 in der Lavageflüssigkeit

Matrixmetalloproteinasen gehören zur großen Familie proteolytischer Enzyme, die an der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix beteiligt sind [126]. Während diese Enzyme im gesunden Individuum physiologische Funktionen, zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung, ausüben [127], wird deren Überexpression oder fehlerhafte Aktivierung mit einer Reihe pathologischer Prozesse in Verbindung gebracht, die mit der Destruktion bindegewebiger Formationen einhergehen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis [128] oder Tumordinvasion [129, 130]. Arbeiten, die sich mit der Rolle von MMPs innerhalb der pathogenetischen Abläufe bei der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose beschäftigen, liegen bislang nicht vor. Da diese Enzyme aber potenziell an der Entstehung oder durch die Fähigkeit der Degradation bei der Unterbindung einer Fibrose beteiligt sein können, wurde MMP-9 mittels Zytokinassay in ELISA-Technik bestimmt (vgl. 3.3.2.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Während dieses Enzym zum Zeitpunkt vor Bestrahlung und bei Patienten mit Pneumonitis nur in geringer Konzentration oder gar nicht vorlag, zeigte es bei Patienten ohne Pneumonitis eine deutliche Zunahme. Daraus resultierten signifikante Unterschiede sowohl im Vergleich zum Wert vor Bestrahlung (33,8 ng/ml versus 0,0 ng/ml; $p < 0,05$) als auch gegenüber der pneumonitispositiven Gruppe (33,8 ng/ml versus 0,0 ng/ml; $p < 0,01$).

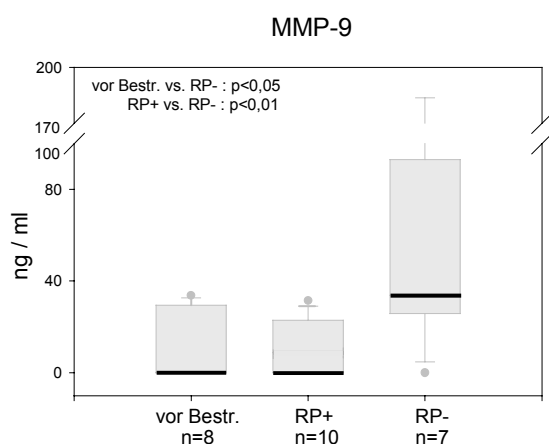


Abbildung 11: Konzentration von MMP-9 in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

Die Ermittlung dieses Enzyms erfolgte durch ELISA-Technik, die untere Nachweisgrenze betrug 0,156 ng/ml. Patienten ohne Pneumonitis wiesen eine deutlich erhöhte Konzentration von MMP-9 auf, die sich statistisch signifikant von den Werten vor Bestrahlung ($p < 0,05$) und von denen der Pneumonitispatienten unterschied ($p < 0,01$).

4.1.5 Neopterin in der Lavageflüssigkeit

Die Messung erfolgte mit dem Ziel festzustellen, ob dieser Indikator der Aktivierung des zellulären Immunsystems und unspezifische Entzündungsmarker [131] im Rahmen der – inflammatorischen – pulmonalen Bestrahlungsreaktion beim Menschen in der BAL-Flüssigkeit nachweisbar ist. Dies gelang mit der in der vorliegenden Studie angewandten Methode eines kompetitiven Enzymimmunoassays nicht. Alle ermittelten Werte waren kleiner als die minimale Konzentration der vorgeschriebenen Verdünnungsreihe.

4.1.6 Hydroxyprolin in der Lavageflüssigkeit

Hydroxyprolin ist eine nicht essentielle Aminosäure des menschlichen Organismus, die durch Hydroxylierung von Prolin gebildet wird. Sie stellt als

Bestandteil des Kollagens eine Komponente der extrazellulären Matrix dar und ist somit Element bindegewebiger Strukturen.

Im Rahmen der bisher bekannten Pathomechanismen bei der Entstehung der strahleninduzierten Fibrose kommt es – wie im Einleitungskapitel beschrieben – zur vermehrten Bildung extrazellulärer Matrix mit dem Resultat einer fibrotischen Gewebearchitektur. So führt beispielsweise die Stimulation humaner Lungenfibroblasten durch TGF- β zu einer verstärkten Produktion von Kollagen [89], Fibronectin [90] und Hydroxyprolin [91]. Letzteres liegt auch in bestrahlten Rattenlungen in einer linear mit der Strahlendosis zunehmenden Konzentration vor [58]. Auf diesem Hintergrund basiert der Versuch, diese Substanz in der BAL-Flüssigkeit nachzuweisen. Als angewandte Methode diente eine hochsensitive Reversed Phase-HPLC, die unter 3.3.2.5 näher erläutert ist. Mit Hilfe dieser Technik können schon geringste Mengen eines Proteins detektiert werden (vgl. Abb. 12).

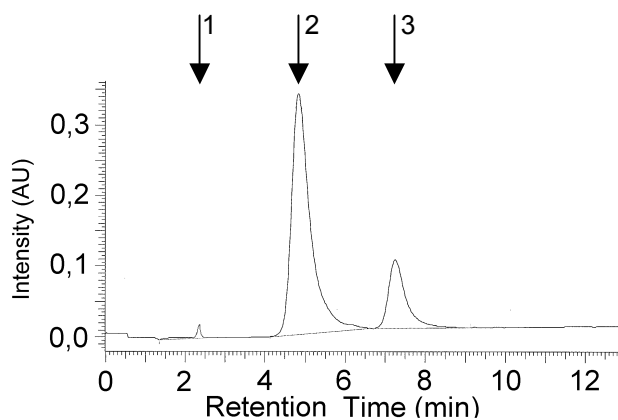


Abbildung 12: Analyse der Aminosäure Hydroxyprolin in der BAL-Flüssigkeit mittels Reversed Phase-HPLC.

Die Proteine der BAL-Proben wurden über Nacht (16 h) einer Harz-katalysierten Hydrolyse unterzogen. Die anschließende Messung erfolgte durch Gradientenseparation mit einer RP-18-Säule und Fluoreszenzdetektion (Ex 470 nm, Em 530 nm). 1-Hydroxyprolin, 2-Derivatisierungssubstanz, 3-Dehydroprolin als interner Standard.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Hier zeigte sich, daß Patienten mit einer Pneumonitis eine erhöhte Konzentration von Hydroxyprolin in der Lavageflüssigkeit aufwiesen. Diese unterschied sich signifikant von der Menge, die bei Patienten ohne Pneumonitis ($0,33 \mu\text{mol/l}$ versus $0,0 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) zu detektieren war. Auf Grund eines deutlich erhöhten Wertes in der Gruppe vor Be-

strahlung ließ sich im statistischen Vergleich zur Pneumonitisgruppe nur eine marginale Signifikanz feststellen (0,0 $\mu\text{mol/l}$ versus 0,33 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,1$).

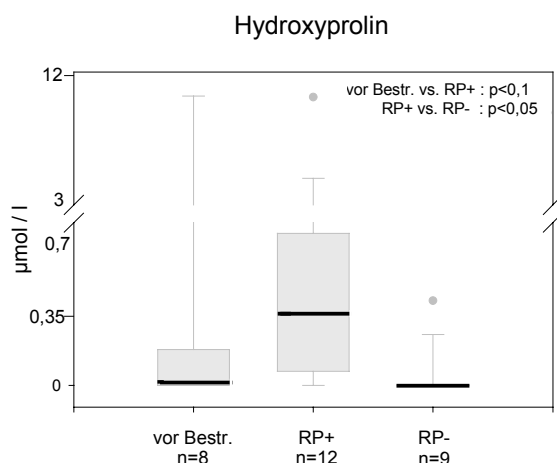


Abbildung 13: Konzentration von Hydroxyprolin in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

Die Bestimmung erfolgte mittels einer Reversed Phase-HPLC. Bei den Patienten mit Pneumonitis ließ sich eine erhöhte Konzentration von Hydroxyprolin sowohl gegenüber der pneumonitisnegativen Gruppe ($p < 0,05$) als auch tendenziell im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung ($p < 0,1$) nachweisen.

4.2 Einflußfaktoren auf die Entwicklung einer Pneumonitis

Einen Überblick über die evaluierten Einflußfaktoren vermittelt Tabelle 6. Im folgenden wird näher auf die einzelnen Parameter eingegangen.

Tabelle 6: Evaluierete Parameter bezüglich der Entstehung einer strahleninduzierten Pneumonitis (Die Daten sind als Median zuzüglich Minimum und Maximum verzeichnet.)

Evaluierte Parameter	RP+ (n=6)	RP- (n=4)	p
Gesamtdosis (Gy)	50 (50 - 58)	50 (50 - 60)	n.s.
Einzeldosis (Gy)	2	2	n.s.
Mean Lung Dose* (Gy)	23 (19 - 28)	18 (8 - 25)	$p < 0,1$
Zielvolumen (cm^3)	557 (332 - 1125)	573 (257 - 855)	n.s.
Alter (y)	64 (45 - 77)	70 (61 - 76)	n.s.
Nikotinkonsum (py)	10 (0 - 40)	50 (20 - 75)	$p < 0,05$
Pulmonale Begleiterkrankungen	3 / 6	2 / 4	n.s.
Tumorresektion	4 / 6	2 / 4	n.s.

* der höher bestrahlten Einzellunge

4.2.1 Bestrahlungsparameter

4.2.1.1 Gesamt- und Einzeldosis

Bisher durchgeführte Untersuchungen zeigen, daß das Risiko, eine strahleninduzierte Pneumonitis zu entwickeln, mit zunehmender Gesamt- und Einzeldosis steigt (vgl. 1.2). Da die Gesamtbestrahlungsdosis im Zielgebiet aller untersuchten Patienten mit 50 bis 60 Gy keine erheblichen Schwankungen aufwies (vgl. Tab. 6), unterschied sich diese auch nicht signifikant zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis. Ebenso betrug die täglich applizierte Einzeldosis in allen Fällen zwei Gy, so daß dieser Parameter in dieser Studie keine weitere Analyse zuließ.

4.2.1.2 Mean Lung Dose der höher bestrahlten Einzellunge

Mittels Erstellung der Dosis-Volumen-Histogramme und Überführung der Daten in ein spezielles Computerprogramm ist es möglich, die Mean Lung Dose der höher bestrahlten Einzellunge zu ermitteln (vgl. Tab. 6). Haben sich hinsichtlich der Gesamt- und Einzeldosis keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis gezeigt, so wies dieser betrachtete Parameter doch tendenziell erhöhte Werte bei solchen mit einer pulmonalen Strahlenreaktion auf (23 Gy versus 18 Gy; $p < 0,1$).

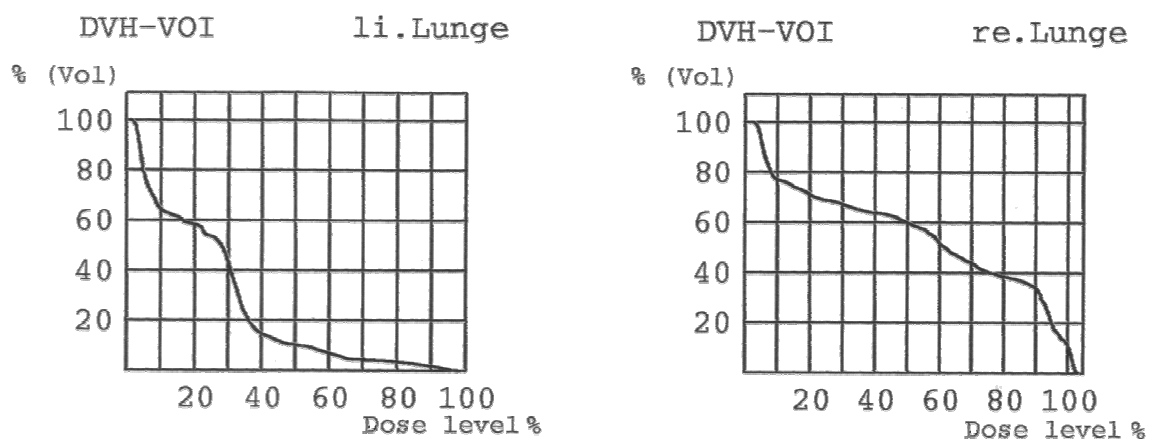


Abbildung 14: Dosis-Volumen-Histogramme mit der Dosisverteilung beider Einzellungen.

Die Dosis-Volumen-Histogramme (DVH) zeigen die Dosisverteilungen (in Prozent) für die rechte und linke Lunge eines einzelnen Patienten mit einem Bronchialkarzinom des rechten Oberlappens. In diesem Fall erhält die rechte Lunge im Mittel eine erhöhte Strahlendosis. Nach Überführung der DVH-Daten in ein spezielles Computerprogramm konnten die Werte zur Dosisverteilung im Lungengewebe ermittelt werden.

4.2.1.3 Zielvolumen

Hinsichtlich der Größe des Zielgebietes zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis (vgl. Tab. 6).

4.2.2 Patientenspezifische Einflußgrößen

4.2.2.1 Alter

Über den Einfluß dieses Faktors existieren kontroverse Aussagen bezüglich der Ausbildung einer Pneumonitis (vgl. 1.2). Die erhobenen Daten betreffs der in dieser Studie untersuchten Patienten sind in Tabelle 6 dargestellt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich somit hinsichtlich des Alters der Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen jenen mit und solchen ohne eine strahleninduzierte Pneumonitis.

4.2.2.2 Nikotinkonsum

Patienten ohne strahleninduzierte Pneumonitis wiesen im Gegensatz zu jenen mit dieser Bestrahlungskomplikation eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl von pack years auf (50 py versus 10 py; $p < 0,05$, vgl. Tab. 6).

4.2.2.3 Pulmonale Begleiterkrankungen

Ebenso wie eine zunehmende Gesamtdosis im Zielvolumen sollen sich – wie unter 1.2 bemerkt – pulmonale Begleiterkrankungen fördernd auf die Entstehung einer strahleninduzierten Pneumonitis auswirken.

Auf Grund der erhobenen Daten im Patientenkollektiv dieser Arbeit, bei dem jeweils die Hälfte der Patienten mit und ohne Pneumonitis vorbestehende Lungenerkrankungen aufwies, ließ sich kein Einfluß auf die Entwicklung dieser Bestrahlungskomplikation nachweisen.

4.2.2.4 Tumorhistologie, Erkrankungsstadium, Chemotherapie, vorangegangene Tumorresektion

Auf der Basis der vorliegenden Arbeit ließ sich keine Aussage zu der Frage machen, ob die Histologie des Bronchialkarzinoms oder das Krankheitsstadium das Entstehen einer strahleninduzierten Pneumonitis beeinflusst. Grund hierfür ist

die relativ geringe Patientenzahl, die den verschiedenen Stadien und histologischen Formen der Erkrankung gegenübersteht.

Da nur ein Patient eine Chemotherapie vor Bestrahlung erhielt, läßt sich auch für diesen Parameter keine Aussage treffen.

Eine der Strahlentherapie vorangegangene Tumorresektion erwies sich in der durchgeführten Studie nicht als Risikofaktor für die Entwicklung einer Pneumonitis (vgl. Tab. 6).

5. Diskussion

Die Auffassung zur Pathogenese der strahleninduzierten Pneumonitis hat in den letzten Jahren einen grundlegenden Wandel erfahren. Ursprünglich verstand man hierunter eine auf das Strahlenfeld begrenzte, durch strahlenbedingte Schädigung der Kapillarendothelzellen und Typ-II-Pneumozyten hervorgerufene Anreicherung fibrinreichen Exsudates in den Alveolen mit nachfolgender fibrotischer Umwandlung [1, 40, 48, 54, 59]. Diese beschriebenen Vorgänge werden als *klassisches* Entstehungsmodell bezeichnet. Trotz dieser in vielen, vor allem tierexperimentellen Arbeiten nachgewiesenen Mechanismen lassen sich mit diesem Konzept allein nicht alle Charakteristika der pulmonalen Strahlenreaktion erklären. So können mit diesem Modell beispielsweise bilaterale, also auch außerhalb des Bestrahlungsfeldes auftretende radiologische [11, 42] und zelluläre [39, 46, 47] Veränderungen nicht kausal begründet werden. Des Weiteren ist es bislang nicht gelungen, wirkungsvolle Präventions- oder Therapieoptionen zu etablieren. Seit ca. zehn Jahren mehren sich Hinweise dafür, daß an den zugrunde liegenden pathogenetischen Prozessen mehrere Zellgruppen (u. a. Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten) beteiligt sind, deren Interaktionen und Funktionen durch eine Reihe von Zytokinen, insbesondere TGF- β 1, vermittelt und reguliert werden [43, 42, 132]. Diese Abläufe des *modifizierten* Entstehungsmodells bleiben nicht auf das strahlenexponierte Gebiet beschränkt und deuten auf eine mögliche Immunpathogenese hin [39, 133]. Obgleich dieser neuen Erkenntnisse ist die Gesamtheit aller beteiligten Prozesse, speziell im humanen System, in ihrer Kausalität noch unverstanden. Weitestgehend ungeklärt ist auch die Frage, welche patientenspezifischen Faktoren die Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis beeinflussen können. Aus diesen Unklarheiten resultiert einerseits das Fehlen kausaler Therapien sowie andererseits die Limitierung strahlentherapeutischer Möglichkeiten bei malignen Thoraxtumoren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Bronchialkarzinomen vor sowie drei bis vier Monate nach Bestrahlung bronchoskopiert und lavagiert und verschiedene zelluläre und humorale Parameter in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Des Weiteren erfolgte die Evaluierung von Bestrahlungsparametern sowie indi-

vidueller Faktoren, wie Alter, Nikotinkonsum, pulmonale Begleiterkrankungen und Tumorresektionen bezüglich der Pneumonitisentwicklung.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die strahleninduzierte Pneumonitis mit einer Akkumulation neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten, insbesondere $CD4^+$ -T-Lymphozyten, in den tiefen Atemwegen einhergeht. Während diese zellulären Veränderungen von der einwirkenden Strahlendosis unabhängig sind, ist die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-6 und IFN- γ bei Pneumonitispatienten in bestimmten Dosisbereichen erhöht. Hydroxyprolin als Bestandteil bindegewebiger Strukturen ließ sich bei diesen Patienten ebenfalls in erhöhter Menge in der Lavageflüssigkeit nachweisen. Patienten mit Pneumonitis wiesen außerdem eine erhöhte Mean Lung Dose der stärker bestrahlten Einzellunge und eine geringere Anzahl von pack years gegenüber jenen auf, welche diese Bestrahlungskomplikation nicht entwickelten. Bei letzteren fanden sich ein erhöhter Anteil $CD8^+$ -T-Lymphozyten, $CD103^+$ -T-Zellen, HLA-DR-exprimierender $CD4^+$ -T-Lymphozyten sowie eine vermehrte MMP-9-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit. TGF- β 1 lag sowohl bei Patienten mit als auch bei denen ohne Pneumonitis im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung in erhöhter Menge vor. Bezüglich des Patientenalters, pulmonaler Begleiterkrankungen sowie vorangegangener Tumorresektionen bestanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

5.1 Einflußfaktoren auf die Entwicklung einer Pneumonitis

5.1.1 Bestrahlungsparameter

In bislang durchgeführten Studien zeigt sich, daß die Wahrscheinlichkeit, eine strahleninduzierte Pneumonitis zu entwickeln, mit zunehmender Gesamtdosis steigt [11, 134]. Hier ist anzumerken, daß die in diesen Untersuchungen applizierten Gesamtstrahlendosen im Zielgebiet zwischen 25 und 69 Gy lagen und somit ein Einfluß auf die Pneumonitisgenerierung plausibel erscheint. Da die Gesamtdosis in der vorliegenden Arbeit für alle eingeschlossenen Patienten zwischen 50 und 60 Gy im Zielvolumen lag und daher keine wesentliche Schwankung aufwies, ließ sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis feststellen (vgl. Tab. 6).

Roach et al. berichten weiterhin über ein deutlich gesteigertes Pneumonitisrisiko bei einer täglichen Einzeldosis von $>2,67$ Gy [134]. Da diese in der vorliegenden Studie für alle Patienten konstant zwei Gy betrug, ließ sich für diesen Dosisparameter bezüglich der Pneumonisentstehung in dieser Arbeit keine Aussage treffen.

Ein anderer von Kwa et al. 1998 vorgeschlagener Parameter zur prätherapeutischen Abschätzung des Pneumonitisrisikos ist die Mean Lung Dose, die das Integral über das kumulative Dosis-Volumen-Histogramm bezeichnet und mit der Pneumonitisinzidenz korreliert [135-137]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Betrachtung dieses Aspektes die Mean Lung Dose der höher bestrahlten Einzelleunge herangezogen (vgl. Tab. 6), da die Dosiswerte für das Gesamtorgan bei der angewandten Dreifeldertechnik weniger aussagekräftig sind. Hier zeigte sich, daß die stärker bestrahlte Einzelleunge der Patienten mit Pneumonitis im Vergleich zu denen ohne diese Komplikation im Mittel eine tendenziell höhere Bestrahlungsdosis erhalten hat. Somit kann dieser Parameter als Risikofaktor für die Entstehung einer Pneumonitis gelten.

Bezüglich der Größe des bestrahlten Zielvolumens existierten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis. Die Werte für diesen Parameter wiesen allerdings eine erhebliche Schwankungsbreite auf (vgl. Tab. 6), so daß im Zusammenhang mit der geringen Patientenzahl keine definitive Aussage hinsichtlich des Einflusses dieses Faktors auf die Pneumonitisentwicklung möglich ist. Publierte Untersuchungen legen nahe, daß mit zunehmendem Zielvolumen das Risiko einer Pneumonisentstehung steigt [11, 34] bzw. die vom Lungengewebe tolerierte Dosis abnimmt [138, 139].

5.1.2 Patientenspezifische Einflußgrößen

Neben den oben genannten objektiven und durch die dreidimensionale Bestrahlungsplanung relativ gut zu erfassenden Parametern finden sich in der Literatur Hinweise, daß daneben auch individuelle Patientenfaktoren die Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis beeinflussen können.

5.1.2.1 Alter

Zur Einflußgröße 'Alter' liegen verschiedene, z.T. divergierende Aussagen vor. In einer von Roberts et al. durchgeführten Studie an Mammakarzinom-Patientinnen sind diejenigen mit einer symptomatischen Pneumonitis älter als jene ohne diese Komplikation [39]. Umgekehrte Altersverhältnisse weisen Patientinnen mit Mammakarzinom in einer Untersuchung von Martin et al. auf [38]. In einer von Marks et al. publizierten Arbeit, die Patienten mit verschiedenen Thorax Tumoren einschließt, liegt das Alter der Pneumonitispatienten geringgradig höher gegenüber denen ohne Pneumonitis [140]. Weitere Studien, die Patienten mit Bronchialkarzinomen untersuchen, zeigen keine Altersunterschiede zwischen der pneumonitispositiven bzw. -negativen Gruppe [11, 17, 141].

Auch in der vorliegenden Arbeit ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Altersverteilung zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis finden (vgl. Tab. 6), so daß dieser Parameter – zumindest die Bronchialkarzinompatienten betreffend – keinen Risikofaktor für die Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis darzustellen scheint. Dafür könnte unter anderem das relativ homogene Erkrankungsalter mit einem Maximum zwischen 60 und 70 Jahren [142] verantwortlich sein. Andere Tumorentitäten können durch differente tumorbiologische Faktoren und Befall einer vom Alter her inhomogeneren Patientengruppe diesen Parameter als Einflußfaktor auf die Pneumonisentstehung möglich erscheinen lassen.

5.1.2.2 Nikotinkonsum als protektiver Faktor

In der Genese des Bronchialkarzinoms stellt der Nikotinabusus den größten Risikofaktor dar [143, 144]. So lassen sich 90% der malignen Lungentumoren bei Männern und 80% bei Frauen auf diesen Faktor zurückführen [142]. Um so kontroverser muten die Ergebnisse verschiedener Studien an, bei denen Patienten mit Nikotinkonsum ein geringeres Risiko für die Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis aufweisen [36-38].

Es wird angenommen, daß Nikotin bzw. im Tabak enthaltene Substanzen ein protektives, möglicherweise antiinflammatorisches Potential hinsichtlich der Pneumonisentstehung besitzen. So wiesen Franzen et al. sowie Bjerner et al. bei postoperativ bestrahlten Mammakarzinom-Patientinnen mit Tabakkonsum einen deutlich verminderten Anstieg der Lymphozyten in der BAL-Flüssigkeit im Ver-

gleich zu nicht rauchenden Patientinnen nach [36, 37]. Fernerhin zeigt eine von Garipagaoglu et al. durchgeführte SPECT-Untersuchung zur Evaluierung patientenspezifischer Faktoren auf die regionale Lungendurchblutung nach Radiotherapie verschiedener maligner Thoraxtumoren eine etwas verminderte Anfälligkeit für eine strahlenbedingte Schädigung bei Nikotinkonsum [145].

Die These des protektiven Effektes von Nikotin unterstützen auch die erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit, wo Patienten ohne Pneumonitis signifikant mehr pack years aufwiesen als solche, die diese Komplikation erlitten haben (vgl. Tab. 6). Wichtig diesbezüglich scheint der aktuelle, also während der Strahlentherapie fortgesetzte hohe Nikotinkonsum zu sein. Welche Rolle frühere Rauchgewohnheiten spielen, ist dagegen unklar. Da in der jetzt durchgeführten Untersuchung lediglich je ein Patient aus der Gruppe mit bzw. ohne Pneumonitis angab, seit mehreren Jahren nicht mehr zu rauchen, war hierzu keine weitere Analyse möglich.

In der BAL-Flüssigkeit der pneumonitisnegativen Gruppe fanden sich weniger neutrophile Granulozyten und Lymphozyten sowie geringere Konzentrationen von IL-4 und IL-6, so daß der Nikotinkonsum offenbar Einfluß auf die in der Lunge ablaufenden inflammatorischen Prozesse nimmt. Möglicherweise gehen diese Veränderungen auf eine geringere Gefäßpermeabilität (vgl. [145]) mit vermindertem Eintritt von Entzündungszellen in das Lungenparenchym und/oder geringere Sekretion inflammatorischer Zytokine zurück.

Zu einem anderen Ergebnis kommt eine von Monson et al. durchgeführte Studie bei Patienten mit Bronchialkarzinomen, in der Nikotinkonsum einen Risikofaktor für die Pneumonitisentstehung darstellt [11]. Hier geht allerdings nicht eindeutig hervor, wieviele solcher Patienten auch eine Chemotherapie erhalten haben.

5.1.2.3 Pulmonale Begleiterkrankungen

Vorbestehende Lungenerkrankungen, wie chronisch obstruktive und emphysematische Veränderungen sowie Pneumokoniosen, wurden in Studien bezüglich der Pneumonitisentwicklung als prädisponierende Faktoren nachgewiesen [7, 11, 17, 146]. Nach Auffassung der Autoren toleriert Lungengewebe, das durch diese Erkrankungen in seiner Funktions- und Regenerationskapazität eingeschränkt ist, additiven Schaden im Sinne der einwirkenden Bestrahlung schlechter als

diesbezüglich gesundes. Diese Tatsache erscheint pathogenetisch sinnvoll und relativiert die in der vorliegenden Arbeit evaluierten Daten. Diese wiesen nämlich keinen Unterschied in der Verteilung pulmonaler Begleiterkrankungen zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis auf (vgl. Tab. 1 und Tab. 6). Am ehesten ist diese Diskrepanz auf die doch relativ geringe Patientenzahl mit möglicher Verzerrung der realen Verhältnisse zurückzuführen.

5.1.2.4 Tumorhistologie, Erkrankungsstadium, Chemotherapie, vorangegangene Tumorresektion

Einige Arbeiten zeigen, daß sowohl die Tumorhistologie als auch das Erkrankungsstadium keinen Risikofaktor für die Entstehung einer strahleninduzierten Pneumonitis darstellen [11, 17, 134]. Die Erhebungen der vorliegenden Arbeit lassen keine Stellungnahme diesbezüglich zu, da eine relativ geringe Patientenzahl den verschiedenen Stadien und histologischen Formen der Erkrankung gegenübersteht.

Über den Einfluß einer applizierten Chemotherapie hinsichtlich der Entwicklung einer pulmonalen Strahlenreaktion existieren unterschiedliche Studienergebnisse. Im Gegensatz zu Patienten mit Morbus Hodgkin und Mammakarzinomen, bei denen eine Chemotherapie das Auftreten einer Pneumonitis begünstigt [33, 147], läßt sich dieser Zusammenhang bei Bronchialkarzinompatienten bislang nicht finden [11, 17, 134]. Dem könnten die je nach Tumorentität unterschiedlichen Chemotherapieprotokolle zugrunde liegen. Insbesondere eine simultane Radiochemotherapie scheint die Sensibilität des Lungenparenchyms zu erhöhen und eine Pneumonitis zu begünstigen [33, 35]. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich einer der Patienten, die sich drei bis vier Monate nach Bestrahlung einer Bronchoskopie mit BAL unterzogen, eine Chemotherapie bei kleinzelligem Karzinom erhalten hat, kann mit dieser Studie keine Aussage zum Risiko einer Chemotherapie für die Pneumonitiserstehung getroffen werden. Dieser Patient wies zwölf Wochen nach Strahlentherapie eine radiologische Pneumonitis auf. In Anbetracht des Einsatzes neuer chemotherapeutischer Substanzen sowie neuer innovativer Therapiekonzepte sind weitere Studien, welche die Effekte einer kombinierten Radiochemotherapie bezüglich der pulmonalen Toxizität untersuchen, erforderlich.

Bislang wurde nur in einer Studie der Einfluß einer Tumorresektion auf die Pneumonitisentwicklung evaluiert. Hierin berichten Monson et al., daß Bronchialkarzinompatienten ohne Tumorresektion vor Strahlentherapie ein höheres Risiko haben, eine Pneumonitis zu entwickeln [11]. Das wird darauf zurückgeführt, daß dieses Patientengut überwiegend ein fortgeschrittenes Tumorstadium aufweist, was bei großem Primärtumor ein größeres Strahlenfeld erfordert. Außerdem wird angeführt, daß die Gesamtdosis einer primären Strahlentherapie meist höher liegt als bei einem adjuvanten Therapiekonzept.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden (vgl. Tab. 6). Neben der relativ kleinen Patientenzahl differierten aber auch die Bestrahlungsdosen nur unwesentlich zwischen primärer und adjuvanter Strahlentherapie. Fernerhin müssen inoperable Erkrankungsstadien nicht zwingend einen solchen Primärtumor aufweisen, der ein größeres Bestrahlungsvolumen erfordert, als es bei einem – inkomplett – resezierten Tumor nötig ist. In Anbetracht multimodaler Therapiekonzepte bedarf diese Fragestellung durch weitere Studien der Klärung.

5.2 Strahleninduzierte Veränderungen in der Bronchoalveolären Lavage nach Bestrahlung bei Patienten mit und ohne Pneumonitis

5.2.1 Bedeutung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten für die pulmonale Strahlenreaktion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine strahleninduzierte Pneumonitis mit einer Erhöhung der Gesamtzellzahl in der BAL-Flüssigkeit einhergeht (vgl. Tab. 3). Dafür ist ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten verantwortlich, Makrophagen und eosinophile Granulozyten hingegen weisen keine wesentlichen zahlenmäßigen Veränderungen auf (vgl. Abb. 5). Diese Ergebnisse entsprechen weitestgehend den bereits publizierten Studiendaten.

Im Tiermodell verursacht die Einwirkung toxischer Strahlendosen ebenso eine Vermehrung dieser beiden Zellgruppen in Lavage- [22, 80, 148] oder Gewebeproben [41] wie bei Studien am humanen System. Hier findet sich sowohl bei Patientinnen mit Mammakarzinomen [39, 47] als auch bei Bronchialkarzinom-

patienten [149], die eine Pneumonitis erleiden, eine vermehrte Gesamtzellzahl in der BAL-Flüssigkeit, welche durch eine Lymphozytose bedingt ist. Martin et al. beschreiben eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bei postoperativ bestrahlten Mammakarzinom-Patientinnen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis zeigten sich allerdings keine wesentlichen Unterschiede [38]. Hierbei ist anzumerken, daß die BAL bereits 15 Tage nach Ende der Strahlentherapie erfolgte. Roberts et al. stellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom vier bis sechs Wochen nach Strahlentherapie ebenfalls keine Veränderung der Neutrophilenzahl in der Lavageflüssigkeit zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis fest [39].

Die Diskrepanz zur festgestellten signifikanten Erhöhung der Neutrophilenzahl bei Pneumonitispatienten im Gegensatz zu denen ohne Strahlenkomplikation in der vorliegenden Studie könnte durch den im Protokoll festgelegten späteren Zeitpunkt der BAL begründet sein. So ist denkbar, daß die pathogenetischen Prozesse nach drei bis vier Monaten deutlicher in Erscheinung treten als zu einem früheren Zeitpunkt. Hinzu kommt, daß die strahleninduzierte Pneumonitis meist erst nach zwei bis drei Monaten auftritt und somit eine Untersuchung, die vier bis sechs Wochen nach Bestrahlung stattfindet, Patienten außer Acht läßt, die diese Komplikation noch später entwickeln. Wahrscheinlicher erscheint allerdings die Vermutung, daß nicht eine bestimmte Zellpopulation per se der Pathogenese der Pneumonitis zugrunde liegt, sondern daß noch andere Faktoren, wie beispielsweise Zytokine – entsprechend dem *modifizierten Entstehungsmodell* – eine wesentliche Rolle spielen.

Zum Verhalten der Makrophagen nach Bestrahlung bzw. im Rahmen einer Pneumonitis existieren divergierende Studiendaten. Hierbei sind die verschiedenen Zeitpunkte der Untersuchungen, die differenten Bestrahlungsdosen sowie der Speziesunterschied zu beachten. So fanden Roberts et al. in der Lavage von Pneumonitispatienten, die vier bis sechs Wochen nach Strahlentherapie durchgeführt wurde, eine Verminderung dieser Zellpopulation [39]. Das gleiche Phänomen tritt bei Patienten zwei Monate nach Radiatio unabhängig von einer Pneumonitisentwicklung auf [36]. Zwei tierexperimentelle Arbeiten an Ratten zeigen sowohl eine Abnahme [148] als auch eine Zunahme der Makrophagenzahl [22] in der BAL-Flüssigkeit ca. sechs Wochen nach Strahlenexposition. Vergara et al. be-

richten über eine unveränderte Zahl an Makrophagen im Lungengewebe von Ratten, das zwölf Wochen nach Bestrahlung mit 30 Gy untersucht wurde [41].

In der vorliegenden Arbeit wies diese Zellgruppe drei bis vier Monate nach Strahlentherapie keine Unterschiede sowohl zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis als auch im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung auf. Es könnte vermutet werden, daß zu diesem späteren Zeitpunkt eine Erholung dieser Zellpopulation nach initialem Strahlenschaden und resultierender Zellzahlverminderung stattgefunden hat [150]. Aufgrund der oben erwähnten Studienergebnisse ist es sehr unwahrscheinlich, daß die Makrophagen im Rahmen der Strahleneinwirkung nicht alteriert werden. Des weiteren stellen sie eine wichtige Quelle zahlreicher inflammatorischer und fibrogener Mediatoren dar [73, 98, 111, 151, 208], welche durch die strahlenbedingte Zellschädigung freigesetzt werden könnten.

Die Population der eosinophilen Granulozyten findet in den bisherigen Studien zur Pathogenese der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose wenig Beachtung. Lediglich Bjermer et al. differenzierten diese Zellgruppe in der BAL-Flüssigkeit von Patientinnen mit Mammakarzinom zwei Monate nach Bestrahlung und fanden eine relative Zunahme im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Zwischen denen mit bzw. ohne Pneumonitis waren keine Unterschiede nachweisbar [37]. In dieser Arbeit zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Eosinophilenzahl in den untersuchten Gruppen. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß dieser Zelltyp keine Rolle für die Entwicklung der pulmonalen Strahlenreaktion spielt.

5.2.1.1 Rolle von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten

Die Resultate der vorliegenden Studie zeigten bei Patienten mit strahleninduzierter Pneumonitis eine Zunahme des relativen Anteils der CD4⁺- und eine Abnahme der CD8⁺-T-Lymphozyten (vgl. Abb. 6). Bisher liegen nur wenige Arbeiten am humanen System vor, welche die Lymphozytensubpopulationen nach Bestrahlung untersuchen. Martin et al. beschreiben in der schon erwähnten Studie an Mammakarzinom-Patientinnen ebenfalls eine signifikante Zunahme des Anteils CD4⁺-T-Lymphozyten bei denen, die zum Zeitpunkt der BAL eine Pneumonitis aufweisen. Im Gegensatz dazu ist dieser Prozentsatz im Vergleich zu pneumonitisnegativen Patientinnen unverändert, wenn die Strahlenreaktion erst im Anschluß an die BAL-

Untersuchung auftritt [38]. Das spricht dafür, daß die Verschiebung der T-Lymphozytenpopulationen zugunsten des CD4⁺- Anteils keine direkte Reaktion auf die Strahlenexposition darstellt, sondern erst zeitnah zu dem inflammatorischen Prozeß durch andere Mechanismen getriggert wird. Westermann et al. stellen in einer Studie an bestrahlten Rattenlungen auch eine Vermehrung CD4⁺-T-Zellen fest und verweisen auf deren vermutlich wesentliche Rolle bei der Pathogenese der pulmonalen Strahlenreaktion [152]. Diese These wird durch die erhobenen Daten in der vorliegenden Arbeit untermauert. Die Beteiligung CD4⁺-T-Lymphozyten stellt eine Verbindung zur Annahme dar, daß immunologische Mechanismen bei der Pneumonitistentstehung von Bedeutung sein könnten.

Bezüglich der analysierten Aktivierungsantigene CD25 und HLA-DR innerhalb der T-Lymphozyten war eine tendenzielle Erhöhung des Anteils HLA-DR⁺CD4⁺-Zellen bei Patienten ohne Pneumonitis nachzuweisen. Ansonsten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in den untersuchten Gruppen (vgl. Tab. 4). In diesem Zusammenhang ist der Zeitpunkt der durchgeführten BAL-Untersuchung mit drei bis vier Monaten nach Bestrahlung von Interesse, da die beiden Marker relativ kurzzeitig nach stattgehabter Aktivierung (CD25 innerhalb von Stunden, HLA-DR nach wenigen Tagen) exprimiert werden. In der Literatur finden sich bisher keine Studien, die Messungen dieser Aktivierungsmarker in Bezug auf die strahleninduzierte Pneumonitis beinhalten. Der Nachweis vermehrter HLA-DR⁺CD4⁺-Zellen bei Patienten ohne Pneumonitis könnte auf einen pathologischen Prozeß im pulmonalen Gewebe hindeuten, der ca. drei bis vier Monate nach Strahlentherapie einsetzt, aber nicht zur Pneumonitis führt.

Interessant erscheint weiterhin die Tatsache, daß der relative Anteil CD4⁺-T-Zellen bei Patienten mit Pneumonitis zwar signifikant gegenüber denen ohne Strahlenkomplikation erhöht war, sich aber nicht wesentlich vom Wert vor Bestrahlung unterschied (vgl. Abb. 6). Um also eine Entzündungsreaktion auszulösen oder zu unterhalten, müssen weitere Voraussetzungen erfüllt sein als das alleinige Vorhandensein bestimmter Zellpopulationen. Hier könnte es sich beispielsweise um einen Aktivierungszustand handeln, der mit den bestimmten Markern CD25 und HLA-DR nicht erfaßt wird.

5.2.1.2 Bedeutung von CD103⁺-T-Lymphozyten

Neben der Ermittlung der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR erfolgte zur weiteren Charakterisierung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten die Bestimmung des Oberflächenantigens CD103 – auch als α^E bezeichnet. Dieses kennzeichnet vermutlich die eigenständige Subpopulation der intraepithelialen Lymphozyten bzw. ist als "homing"-Rezeptor für die Verankerung im Oberflächenepithel verantwortlich [154]. Schoen et al. wiesen bei α^E -knockout-Mäusen eine signifikante Verminderung intraepithelialer Lymphozyten nach [155]. Aus der Verbindung von α^E mit der Integrin- β_7 -Kette resultiert das $\alpha^E\beta_7$ -Integrin, welches von der überwiegenden Zahl von T-Zellen im intestinalen Epithelium exprimiert wird und durch die Bindung an E-Cadherin adhäsive Zellinteraktionen in vitro vermittelt [156].

$\alpha^E\beta_7$ konnte ebenfalls bei Lymphozyten des Bronchialepithels sowie T-Zellen der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden [154, 157]. Eine Studie, die diese Zellpopulation in der Lavageflüssigkeit bei Gesunden sowie Patienten mit verschiedenen pulmonalen Erkrankungen untersuchte, zeigte, daß der relative Anteil $\alpha^E\beta_7$ -exprimierender T-Zellen unterschiedlich zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten ist. Bei den CD8⁺-T-Zellen exprimierten 60 - 90% dieses Integrin ohne signifikanten Unterschied zwischen gesunden und erkrankten Personen. Im Gegensatz dazu trugen 11,2% der CD4⁺-T-Zellen diesen Marker bei gesunden Kontrollpersonen an der Oberfläche, während es bei Patienten mit Sarkoidose oder idiopathischer Lungenfibrose bis zu 70% waren [121]. Eine andere Arbeit bestätigte diese Ergebnisse insofern, als daß Patienten mit entzündlichen oder fibrotischen Lungenerkrankungen einen erhöhten Anteil $\alpha^E\beta_7^+$ -CD4⁺-Zellen in der BAL-Flüssigkeit gegenüber Gesunden aufwiesen und sich wiederum bei den CD8⁺-T-Lymphozyten keine Unterschiede ergaben. Hier konnte weiterführend gezeigt werden, daß die Population der $\alpha^E\beta_7^+$ -CD4⁺-Zellen VLA-1 exprimiert und die Autoren vermuten, daß die dadurch angezeigte prolongierte Aktivierung der Zellen einen Einfluß auf das pathogene Geschehen der Inflammation und/oder Fibrose hat [158]. Jedoch ist bislang nicht letztlich geklärt, ob diese Zellen den Entzündungsprozeß fördern, wie Ludviksson et al. im Tiermodell der experimentellen Kolitis zeigen [159], oder aber hemmen. Letzteres wird von einer Studie unterstützt, in der α^E -defiziente Mäuse eine vermehrte kutane Entzündung entwickeln [160].

In der vorliegenden Arbeit wiesen Patienten ohne strahleninduzierte Pneumonitis einen signifikant höheren Anteil CD103⁺-Zellen sowohl bei den CD4⁺- als auch bei den CD8⁺-T-Lymphozyten im Vergleich zu Pneumonitispatienten auf (vgl. Abb. 7). Die Population der CD4⁺-Zellen zeigt auch innerhalb der Patienten vor Bestrahlung und derer mit Pneumonitis einen CD103⁺-Anteil von ca. 30 - 60%, der damit deutlich über den ermittelten Angaben für gesunde Personen mit ca. 10% lag. Dafür könnte einerseits das maligne Geschehen an sich verantwortlich sein oder aber Vorgänge nach vorangegangener Tumoresektion, die einem narbenbildenden und damit fibrotischen Prozeß entsprechen. Für den hohen Prozentsatz CD103⁺-Zellen bei Patienten ohne Pneumonitis kommen zwei Erklärungen in Frage: erstens könnten diese Zellen eine antiinflammatorische Funktion ausüben, zweitens würde aber auch eine profibrotische Rolle möglich sein, da bekannt ist, daß eine strahleninduzierte Fibrose ohne vorherige Pneumonitis entstehen kann [5]. So könnte man neben einer Fibrose, die sich dem entzündlichen Geschehen anschließt, einen weiteren Pathomechanismus annehmen, der durch CD103⁺-T-Lymphozyten vermittelt wird.

5.2.2 Bedeutung humoraler Mediatoren für die pulmonale Strahlenreaktion

5.2.2.1 Einfluß der Zytokine Interleukin-4, Interleukin-6 und Interferon- γ

Diese drei Zytokine wiesen eine erhöhte Konzentration in der Lavageflüssigkeit von Pneumonitispatienten auf (vgl. Abb. 8), was auf deren Rolle bei der Vermittlung der inflammatorischen Prozesse hindeutet. Besonders interessant ist die dosisabhängige Beteiligung an diesem Geschehen, worauf in einem späteren Abschnitt unter 5.3 nochmals eingegangen wird.

Für IL-4 konnte tierexperimentell bereits eine Beteiligung an den pathogenetischen Mechanismen der pulmonalen Strahlenreaktion gezeigt werden. Dieses Zytokin wurde bei Ratten nach Bestrahlung einer Lunge vermehrt exprimiert, während es im Lungengewebe der unbestrahlten kontralateralen Seite nicht nachweisbar war. Durch die Detektion von IL-4-mRNA in Makrophagen und Lymphozyten der strahlenexponierten Lunge konnte demonstriert werden, daß diese beiden Zellpopulationen als Mediatorenquelle in Frage kommen [73]. Sempowski et al. zeigten in einer Arbeit mit Mäuse-Lungenfibroblasten sowohl, daß diese Zelle IL-4-Rezeptoren aufweist als auch, daß IL-4 die Fibroblasten-

proliferation und Sekretion von Kollagen induziert [102]. In Verbindung mit den vorliegenden, am Menschen erhobenen Daten läßt sich somit die Annahme, daß dieses Protein an der Genese der pulmonalen Strahlenreaktion beteiligt ist, untermauern. Im Hinblick auf die verschiedenen untersuchten Dosisbereiche ließ sich feststellen, daß eine geringere Strahlendosis (≤ 20 Gy) die Bildung und/oder Freisetzung dieses Zytokins bei Pneumonitispatienten förderte, während es bei Dosen >20 Gy nicht bzw. nur in geringer Menge nachweisbar war (vgl. Abb. 8a).

Kurz nach einer abgelaufenen Gewebeverletzung oder im Rahmen einer Infektion läßt sich IL-6 mit erhöhten Spiegel im Plasma nachweisen. Dieses multifunktionelle und auto-, para- sowie exokrin wirksame inflammatorische Zytokin führt zur Reifung der B-Lymphozyten mit konsekutiver Antikörperproduktion, stimuliert die Proliferation von T-Lymphozyten und Killerzellen, reguliert die Freisetzung der Akute-Phase-Proteine und moduliert die Sekretion anderer Zytokine durch Monozyten [161, 162].

Neben diesen bekannten zentralen Funktionen im Rahmen eines Entzündungsprozesses gibt es auch Hinweise dafür, daß dieser Mediator bei der Genese der strahleninduzierten Pneumonitis von Bedeutung ist. Beetz et al. wiesen in einer Zellkulturtechnik nach, daß humane Epithelzellen nach Strahlenexposition IL-6 exprimieren [163]. Tartakovsky et al. beschreiben einen Anstieg dieses Zytokins nach Bestrahlung pulmonalen Gewebes von Mäusen [164]. Weiterhin wird für dieses Protein diskutiert, daß es die Radioresistenz von Geweben vermindern kann [165]. Diese Erkenntnisse wurden auf tierexperimentellem Gebiet gewonnen, für das humane System fehlen verlässliche Daten. In dieser Arbeit fand sich eine erhöhte Konzentration von IL-6 in der BAL-Flüssigkeit von Pneumonitispatienten. Insbesondere in Segmenten, die Bestrahlungsdosen >30 Gy ausgesetzt waren, lag eine gesteigerte Menge dieses Mediators vor (vgl. Abb. 8b). Dieser Befund läßt sich einerseits mit der Sekretion dieses Zytokins als Folge des allgemeinen Entzündungsgeschehens vereinbaren. Andererseits ist im Hinblick auf die oben dargestellten Studienergebnisse eine spezielle, zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht genauer definierte Rolle von IL-6 bei der Entwicklung der strahleninduzierten Pneumonitis anzunehmen, die in Beziehung zur applizierten Dosis stehen könnte.

Schwieriger als für die oben diskutierten Interleukine ist die Erhöhung der IFN- γ -Konzentration bei Pneumonitispatienten zu interpretieren. Diesem Zytokin, welches sich in dieser Arbeit bei Bestrahlungsdosen von >5 Gy vermehrt nach-

weisen ließ (vgl. Abb. 8c), werden antifibrotische [103, 104, 117, 166] und anti-entzündliche Wirkungen [108] zugeschrieben, so daß man dessen Vermehrung bei pneumonitisnegativen Patienten hätte vermuten können. Allerdings liegt der Gedanke nahe, daß die gesteigerte Sekretion von IFN- γ eine Art Gegenregulation zu stattfindenden inflammatorischen und beginnenden fibrotischen Abläufen darstellen könnte. Mit diesem Ansatz agiert IFN- γ also als Antagonist zu den proinflammatorischen Interleukinen IL-4 bzw. IL-6 im Rahmen der pulmonalen Strahlenreaktion. Unterstützung findet diese Vermutung in der oben zitierten Arbeit von Sempowski et al., in der IFN- γ als natürlicher Antagonist von IL-4 bezeichnet wird [102]. Weiterhin reduziert die Applikation von IFN- γ die Ausprägung einer Bleomycin-induzierten Fibrose in der Lunge von Mäusen [105, 106]. Bezüglich der Attenuierung der Entzündungsreaktion wiesen Rosiello et al. an thoraxbestrahlten Ratten mit anschließender Untersuchung der bronchoalveolären Lavage nach, daß die Applikation von IFN- γ sowohl den Influx der PMN-Zellen als auch den Proteineinstrom verminderte. Außerdem zeigten die in der Lavage befindlichen neutrophilen Granulozyten eine herabgesetzte chemotaktische Aktivität [107].

Überträgt man diese Resultate auf die strahleninduzierte Pneumonitis und Fibrose, könnte man mutmaßen, daß ein Fehlen dieses Zytokins noch gravierendere inflammatorische und fibrotische Reaktionen nach sich zieht. Dafür spricht auch eine Studie von Neta et al., in der das Überleben von Mäusen durch die Gabe von IFN- γ nach erfolgter Bestrahlung mit letaler Dosis signifikant verlängert wurde [167]. Natürlich ist ein proinflammatorisches, in der Literatur bisher nicht beschriebenes Potential dieses Mediators nicht auszuschließen, aber in der Zusammenschau der existierenden Daten eher unwahrscheinlich.

5.2.2.2 Vermittlung der Fibrose durch Transforming growth factor beta-1

Die meisten Studien, die sich mit der Klärung der Pathomechanismen der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose auf Zytokinebene beschäftigen, konzentrieren sich auf dieses Protein und weisen auf dessen eminente Bedeutung für die ablaufenden Prozesse hin. Die bislang erhobenen Daten sowohl am Tiermodell [72, 80, 87] als auch beim Menschen [75, 76, 88, 168, 169] legen eine die Entzündung und Fibrose fördernde Funktion dieses ubiquitär vorkommenden und multifunktionellen Homodimers von 25 kDa nahe.

Anhand von Zellkulturtechniken ließ sich zeigen, daß TGF- β durch Stimulation von Fibroblasten mit vermehrter Bildung kollagener Substanzen [89-91, 170], Freisetzung von Protease-Inhibitoren und verminderter Synthese von Kollagenasen [77, 92] zum Zuwachs an extrazellulärer Matrix mit fibrotischem Gewebeumbau führt. Außerdem ist TGF- β in der Lage, selbst seine Sekretion durch humane Lungenfibroblasten zu induzieren [171].

Die genauen Mechanismen der ablaufenden Prozesse bezüglich der Interaktionen, die zur Bildung und Freisetzung dieses Zytokins führen, sind nur unzureichend erkannt. Ein entscheidender Faktor bei der Kontrolle und Regulierung der Aktionen dieses Zytokins stellt der Schritt der Aktivierung dar, da inaktives TGF- β nicht an den entsprechenden Rezeptor binden kann und somit wirkungslos bleibt [82]. Hier liegt eine Schwäche der angewandten Methode in der vorliegenden Arbeit, da der verwendete Zytokinassay von R&D SYSTEMS die totale Konzentration von aktivem TGF- β 1 nach erfolgter Aktivierung durch Ansäuerung nachweist. Damit kann keine Aussage über die Anteile aktiven bzw. inaktiven Proteins in der untersuchten Probe getroffen werden. Daraus leitet sich die Unsicherheit in der Interpretation ab, inwiefern die gemessenen Konzentrationen für das pathologische Geschehen direkt verantwortlich sind.

Barcellos-Hoff et al. entwickelten diesbezüglich eine modifizierte immunhistochemische Methode, die die Diskriminierung zwischen beiden Formen ermöglicht. Darauf basierend konnte gezeigt werden, daß in strahlenexponiertem Brustdrüsengewebe von Mäusen die Menge an aktivem TGF- β 1 zunahm und reziprok dazu inaktives Protein abnahm. Die Autoren schlußfolgern daraus, daß energiereiche Strahlung direkt oder indirekt zur Aktivierung von TGF- β in vivo führt [79]. In vitro sind neben extremen pH-Werten, proteolytischen Enzymen, wie Plasmin [77, 82, 172] sowie Integrinen [173], reaktive Sauerstoffspezies [78] als Aktivatoren für TGF- β beschrieben worden. Letztere könnten bei der Bestrahlung von Bedeutung sein.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der vorliegenden Studie, wo sowohl Patienten mit als auch jene ohne Pneumonitis eine erhöhte Konzentration an TGF- β 1 in der Lavageflüssigkeit im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung aufgewiesen haben (vgl. Abb. 9), können verschiedene Mutmaßungen angestellt werden. Geht man davon aus, daß allein die Bestrahlung für die Bildung und vor allem die Akti-

vierung dieses Zytokins verantwortlich ist und dadurch die zur Pneumonitis und Fibrose führenden Vorgänge ausgelöst werden, so müßten letztlich alle Patienten, die eine Strahlentherapie erhalten, diese beiden Komplikationen entwickeln. Da dies in praxi nicht der Fall ist, müssen weitere insbesondere der Pneumonitis zugrundeliegende kausale Faktoren angenommen werden. Dazu könnte insbesondere eine unterschiedliche – zytokinvermittelte (?) – Verteilung anderer oben erwähnter Aktivatoren zwischen Patienten mit und ohne Pneumonitis gehören. So wäre beispielsweise eine durch den Entzündungsprozess hervorgerufene pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich denkbar, die zur Aktivierung von TGF- β 1 führt. Des Weiteren kämen den bei der Pneumonitis vermehrt nachgewiesenen Mediatoren IL-4 und IL-6 eine Rolle bei der Regulierung der TGF- β 1-Aktivität zu. Aus diesen durch die Entzündung bedingten Mechanismen würde also ein aktiviertes und zur Fibrose führendes TGF- β 1 hervorgehen.

Wie oben bereits angesprochen, kann eine Gewebefibrosierung nach Bestrahlung aber auch ohne vorangehende Inflammation entstehen [5]. Der Befund, daß pneumonitisnegative Patienten eine gesteigerte TGF- β 1-Konzentration aufweisen, läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß eine Fibrose ohne vorherige Entzündung ebenfalls durch dieses Zytokin vermittelt wird, jedoch anderen noch zu identifizierenden Interaktionen unterliegt. Weiterhin sind die Ergebnisse ein Hinweis dafür, daß die der fibrotischen Gewebeumwandlung zugrunde liegenden Mechanismen auf humoraler Ebene vor deren morphologischen Erscheinen angestoßen werden und untermauern somit die Thesen des *modifizierten Entstehungsmodells*.

Die Bedeutung zytokingesteuerter Abläufe wird noch durch einen weiteren Aspekt belegt: eine Vielzahl der im Lungengewebe anzutreffenden Zellen besitzt das Potential, TGF- β zu produzieren, wie beispielsweise Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten [174], Lymphozyten [81] und Typ-II-Pneumozyten [175]. Nimmt man an, daß nur die in die Pneumonitis involvierten Zellpopulationen von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten (vgl. 5.2.1) für die Sekretion von TGF- β in Frage kämen, müßten Patienten mit dieser Strahlenkomplikation erhöhte Zytokinkonzentrationen aufweisen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit trifft das jedoch nicht zu.

5.2.2.3 Tumornekrosefaktor alpha, Keratinocyte growth factor und Neopterin

Diese drei Substanzen ließen sich in der durchgeführten Studie nicht nachweisen. Dafür kommen mehrere Gründe in Betracht. Zum einen könnte die angewandte Methode in Form eines Zytokinassays nicht sensibel genug gewesen sein, um eventuell vorhandene Mengen zu detektieren. Zum anderen wäre es denkbar, daß die BAL-Flüssigkeit nicht das geeignete Material zur Bestimmung dieser Proteine darstellt und beispielsweise eine Messung der entsprechenden mRNA im Lungenparenchym zu einem anderen Ergebnis führt. Als nächstes muß beachtet werden, daß die BAL-Untersuchung drei bis vier Monate nach Strahlentherapie erfolgte und es somit möglich sein könnte, daß TNF- α , KGF und Neopterin zu diesem Zeitpunkt nicht mehr oder aber noch nicht in die Prozesse der pulmonalen Strahlenreaktion involviert sind. Nicht ausgeschlossen, doch sehr unwahrscheinlich wäre schließlich die Annahme, daß diese Mediatoren, insbesondere TNF- α und KGF, bei den Pathomechanismen der pulmonalen Strahlenreaktion im humanen System im Unterschied zum Tiermodell keine Rolle spielen.

Piguet konnte mittels der Bleomycin-induzierten Fibrose bei Mäusen einen deutlichen Anstieg der TNF- α -mRNA in der manipulierten Lunge zeigen, während die Applikation von anti-TNF-Antikörpern die Entwicklung der Fibrose fast komplett verhinderte [110]. Im Gegensatz dazu berichten Neta et al. über eine von TNF- α vermittelte Radioprotektivität mit einer erhöhten Überlebensrate von Mäusen nach Strahlenexposition [167]. Weiterhin führte die Gabe von anti-TNF-Antikörpern vor Bestrahlung zu einer gesteigerten Letalität der Tiere [77]. Diese widersprüchlichen Daten können einerseits vermuten lassen, daß das Modell der Bleomycin-induzierten Lungenschädigung nicht zur Klärung der strahleninduzierten Prozesse herangezogen werden kann, da beide Ereignisse unterschiedliche Mechanismen in Gang setzen. Andererseits lassen die wenigen in vivo gewonnenen Ergebnisse noch keine Rückschlüsse auf die realen Verhältnisse und Interaktionen – erst recht bezüglich des humanen Systems – zu.

Betrachtet man publizierte Arbeiten zu Effekten von TNF- α in Zellkulturen, so wird mehrheitlich ein stimulierender Einfluß auf die Fibroblastenproliferation [98, 117, 177] und -aktivität [99] beschrieben. Hampson et al. wiesen außerdem nach, daß TNF die Adhärenz von T-Lymphozyten an Fibroblasten vermutlich via verstärkter Expression von Adhäsionsmolekülen, zum Beispiel ICAM-1, zu steigern

vermag [113]. Daraus könnte man eine eventuelle Beteiligung dieses Zytokins an einer Fibroseentwicklung ableiten. Um festzustellen, ob und in welcher Weise das insbesondere für den Menschen zutrifft, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Diese Forderung gilt auch bezüglich einer möglichen Involvierung von KGF in die Vorgänge nach Bestrahlung. Dieser Mediator hat tierexperimentell eine protektive Funktion bezüglich der Fibroseentstehung nach Bleomycin- und/oder Strahlenexposition gezeigt [114]. Eine verbesserte Geweberegeneration durch Proliferation der Typ-II-Pneumozyten [115] und induzierte Surfactantproduktion [116] werden als Ursache dafür angenommen.

Die Bestimmung von Neopterin, einem unspezifischen Entzündungsmarker, der die Aktivierung des zellulären Immunsystems anzeigt [131], erfolgte, um zu eruieren, ob dieser auch bei der inflammatorischen Strahlenreaktion nachweisbar ist. Wäre Neopterin damit assoziiert, könnte es, wenn andere Ursachen für dessen Erhöhung ausgeschlossen sind, neben einem Indikator eventuell auch einen Verlaufsparemeter der Pneumonitis darstellen. Dazu wäre allerdings die Messung im Blut wegen der geringeren Invasivität und häufigeren Durchführbarkeit sinnvoller als in der Lavageflüssigkeit. Ob und in welchem Maße Neopterin bei den strahleninduzierten Vorgängen Bedeutung hat und wann dessen Bestimmung von Nutzen wäre, müssen künftige Untersuchungen zeigen. Aufgrund der hohen Unspezifität von Neopterin wird es wahrscheinlich nicht als prädiktiver Marker in Frage kommen.

5.2.3 Matrixmodulierende Funktion von MMP-9

Matrixmetalloproteinasen stellen eine große Familie zinkhaltiger Endopeptidasen dar, die Kollagene, Elastin und andere Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen können [126]. Ihre Freisetzung erfolgt in Form inaktiver Moleküle (pro MMPs), die wiederum durch verschiedene Proteinase aktiviert werden [178-180]. Pro-MMP-9 wird unter anderen von neutrophilen Granulozyten [128, 181], Fibroblasten [182, 183], Makrophagen [184] und Endothelzellen [185, 186] sezerniert. Wirken diese Enzyme im gesunden Individuum bei physiologischen Funktionen, wie beispielsweise der Wundheilung, mit [127], führt deren Überexpression oder fehlerhafte Aktivierung zu pathologischen Prozessen, die mit der Destruktion bindegewebiger Formationen einhergehen. So konnte die Beteiligung von Matrix-

metalloproteinasen im Rahmen der rheumatoiden Arthritis [128] oder Tumorinvasion [129, 130] gezeigt werden.

Im Verlauf der fibrotischen Gewebeumwandlung nach Pneumonitis bzw. Strahlenexposition findet als deren Korrelat eine vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix statt, bei deren Modulation Matrixmetalloproteinasen mitwirken könnten. Auf dieser Überlegung basiert die Messung von MMP-9 in der Lavageflüssigkeit. Bislang existieren zu dieser Fragestellung keine Daten. Die Ergebnisse zeigten, daß Patienten ohne strahleninduzierte Pneumonitis eine signifikant höhere Konzentration dieses Enzyms verglichen zu solchen mit dieser Komplikation als auch zum Zeitpunkt vor Bestrahlung aufwiesen (vgl. Abb. 11). An dieser Stelle muß darauf aufmerksam gemacht werden, daß der verwendete Zytokinassay von R&D SYSTEMS die Gesamtkonzentration von MMP-9, das entspricht der Summe von aktivem plus pro-MMP-9, detektiert. Daraus ergibt sich, ähnlich wie bei TGF- β , die Unsicherheit, inwiefern aktives und somit wirkungsvolles Enzym vorliegt.

Geht man nun davon aus, daß entweder die gemessene Menge aktivem Protein entspricht bzw. das vorhandene Mikromilieu zur Aktivierung fähig ist, könnte man MMP-9 eine protektive Funktion im Rahmen der Pneumonitis unterstellen. Dies könnte beispielsweise der Fall sein, wenn diese Proteasen auch in der Lage sein sollten, andere Proteine, wie entzündungsfördernde Zytokine (IL-4 und IL-6) ab-zubauen.

Wahrscheinlicher als eine antiinflammatorische erscheint jedoch – auch im Hinblick auf die oben erwähnten Studienergebnisse – eine antifibrotische Wirkung. Daher kann man anhand der erhobenen Daten dieser Arbeit eine fibrosehemmende MMP-9-Funktion vermuten, die Patienten mit Pneumonitis und folgender Fibrose fehlt. Eine mögliche Ursache dafür könnte die für TGF- β in Gegenwart anderer Wachstumsfaktoren nachgewiesene gesteigerte Produktion von TIMP (tissue inhibitor of metalloproteases) sein, woraus bei diesen Patienten eine verminderte Produktion von Matrixmetalloproteinasen resultiert [187]. Auch die verminderte Menge von Hydroxyprolin bei Patienten ohne Pneumonitis im Gegensatz zu denen mit Strahlenreaktion (vgl. Abb. 13) käme als Indiz einer antifibrotischen Wirkung von MMP-9 in Frage. Schwierigkeiten bereitet an dieser Stelle wieder die Tatsache, daß auch bei pneumonitisnegativen Patienten die Entwicklung einer Fibrose möglich ist. Hier könnten Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung Klarheit verschaffen, wenn dabei beispielsweise gezeigt würde,

daß die MMP-9-Konzentration bei diesen Patienten im weiteren Verlauf abnimmt und somit der protektive Einfluß entfällt. Diesbezüglich wäre eine zunehmende Aktivierung von zwar initial bei pneumonitisnegativen Patienten inaktivem, aber vorhandenen TGF- β denkbar (vgl. 5.2.2.2), welches dann die vermehrte Sekretion von TIMP induziert.

Von Sato et al. publizierte Befunde, daß maligne Tumoren selbst MMP-9 produzieren können [188] und eine mögliche Korrelation zwischen diesem und der Tumorinvasivität besteht [189], stellen weitere Probleme bei der korrekten Interpretation der vorliegenden Ergebnisse dar. Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Studien erforderlich.

5.2.4 Hydroxyprolin als Korrelat kollagener Strukturen

Diese Aminosäure stellt einen Bestandteil bindegewebiger Strukturen dar und dient zur Messung des Kollagengehaltes eines Gewebes. Diese Vorgehensweise hat man sich am Tiermodell zunutze gemacht, um den fibrogenen Effekt toxischer Strahlendosen zu demonstrieren. Remy et al. wiesen an bestrahlter und dadurch fibrotisch umgebauter Schweinemuskulatur mit Hilfe der (^{14}C)Hydroxyprolinbestimmung einen zehnfach höheren Kollagengehalt im Vergleich zum unbestrahlten Gewebe nach [57]. Ebenso zeigte strahlenexponiertes Lungengewebe von Mäusen bzw. Ratten eine dosisabhängige Zunahme von Hydroxyprolin als Zeichen des bindegewebigen Umbaus [52, 58]. Law stellt außerdem den Zusammenhang zwischen pathologisch gesteigerter Gefäßpermeabilität und ansteigendem Kollagengehalt im Gewebe dar [52].

In der vorliegenden Arbeit diente eine Reversed Phase-HPLC zur Messung der Hydroxyprolinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit. Die dieser Bestimmung zugrundeliegende Überlegung bestand darin, zu prüfen, ob sich zu einem Zeitpunkt, der der morphologisch sichtbaren Fibrose vorausgeht, ein Hinweis für ein fibrotisches Geschehen finden läßt. Die Untersuchung fand drei bis vier Monate nach Strahlentherapie statt, während sich die Fibrose frühestens nach sechs Monaten klinisch und radiologisch manifestiert [1]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß Patienten mit strahleninduzierter Pneumonitis eine erhöhte Konzentration an Hydroxyprolin in der Lavageflüssigkeit gegenüber solchen ohne diese Komplikation aufweisen (vgl. Abb. 13). Somit kann zum einen geschlußfolgert werden, daß

sich der fibrotische Prozeß vor dessen wahrnehmbaren morphologischen Korrelat etabliert und zum anderen, daß das pulmonale Gewebe von Pneumonitispatienten mit großer Wahrscheinlichkeit einem fibrotischen Umbau unterliegt. Zieht man die Tatsache heran, daß sich eine Fibrose aber auch ohne vorausgehende Pneumonitis entwickeln kann [5], lassen die Ergebnisse die Spekulation zu, daß sich diese zu einem späteren Zeitpunkt formiert als bei Patienten mit inflammatorischer Strahlenreaktion und sich daher die Hydroxyprolinkonzentration noch nicht von den Werten vor Bestrahlung unterscheidet.

5.2.5 Methode der Bronchoalveolären Lavage

Diese minimal invasive Technik der endoskopisch durchgeführten bronchoalveolären Lavage hat in den vergangenen 20 Jahren eine enorme Entwicklung vollzogen und erlaubt die Gewinnung sowohl zellulärer als auch nicht-zellulärer Komponenten von der epithelialen Oberfläche des tiefen Respirationstraktes. Sie hat in hohem Maße zum besseren Verständnis pathogenetischer Aspekte bezüglich Erkrankungen der unteren Atemwege beigetragen. So gründen sich die bisher gewonnenen Erkenntnisse betreffs möglicher Pathomechanismen der pulmonalen Strahlenreaktion beim Menschen auf Befunde von BAL-Untersuchung [36-39]. Andererseits kann die Analyse der Lavageflüssigkeit diagnoseweisend im Rahmen infektiöser (z.B. *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*) und nicht-infektiöser Krankheiten (z.B. Alveolarproteinose, Sarkoidose) sein [190].

Allerdings ist zu bedenken, daß Lavageproben die gegenwärtige Situation in einem Lungensubsegment widerspiegeln und damit nicht den Zustand des gesamten Organs repräsentieren. Des weiteren ist in Betracht zu ziehen, daß die intraluminalen Verhältnisse gezeigt werden, welche nicht zwingend denen im Lungenparenchym entsprechen müssen [191]. Nilsson et al. berichten in einer Studie zu strahlenexponierten Rattenlungen über eine geringe Korrelation der zellulären Parameter im Vergleich von Lavageflüssigkeit zu Gewebeproben. So spiegelte sich der deutliche Anstieg von Mastzellen im Gewebe nicht intraluminal wider. Diese gegensätzlichen Befunde waren jedoch bei den mononukleären und polymorphonukleären Zellen weniger deutlich und beim Hyaluron als nicht-zellulärem Faktor gar nicht vorhanden. Aufgrund dessen wurde geschlußfolgert, daß der Nachweis humoraler Parameter in der Lavageflüssigkeit die Vorgänge im

Gewebe zuverlässiger beschreibt [148]. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefert eine Arbeit von Yi-Qing et al., die ebenfalls Differenzen auf zellulärer Ebene zwischen BAL- und Gewebefund aufzeigt, welche nach Applikation von IL-2 besonders deutlich sind [125]. Hier wird spekuliert, daß dieses Zytokin, welches in vitro die Produktion von Adhäsionsmolekülen induziert [192], auch in vivo dadurch die Adhäsivität von Zellen erhöhen kann.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich IL-2 nur in sehr geringer Konzentration und ohne Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen nachweisen (vgl. Abb. 10), so daß kein wesentlicher Einfluß auf die Zellverteilung anzunehmen ist. Des weiteren stimmen die in der angefertigten Studie erhobenen Daten bezüglich der Modifikation zellulärer Parameter in der Lavageflüssigkeit nach Bestrahlung mit publizierten histologischen Befunden vom Tiermodell weitgehend überein [41, 152]. Das kann einerseits durch den Mangel an IL-2 begründet sein. Andererseits erscheint es möglich, daß inflammatorische Zellen, wie neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, nicht so stark wie Mastzellen nach Einwirkung eines toxischen Agens im Gewebe gebunden werden und der BAL besser zugänglich sind. Studien, die sich den ablaufenden Prozessen im humanen Gewebe nach stattgehabter Bestrahlung widmen, sind dennoch unerlässlich, um ein vollständiges Bild der strahleninduzierten Veränderungen zu erhalten.

Neben der Technik der BAL an sich, die einer weiteren Standardisierung bedarf, gibt es für die Aufarbeitung und Analyse der Lavageflüssigkeit keine einheitlichen Richtlinien, so daß eine geringe Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Untersuchern und Laboratorien angenommen werden muß. So zeigten Saltini et al., die die Methode der Zytozentrifugation mit der der Milliporefiltration bei der Erstellung der Differentialzellbildes miteinander verglichen, daß erstere zu einem Verlust an Lymphozyten bis zu 50% führt. Hingegen wiesen die Anteile der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten keine Unterschiede zwischen beiden Techniken auf [193].

In dieser Studie wurde die bronchoskopische Untersuchung mit BAL bei allen Patienten vom gleichen Untersucher durchgeführt, so daß interindividuelle Einflüsse ausgeschlossen werden können. Zur Anfertigung des Differentialzellbildes diente bei allen Proben die Zytozentrifugenpräparation, so daß die Proportionen der Zelltypen denselben Einflüssen unterlagen. Ebenso erfolgte die Zelldifferenzierung stets durch dieselbe Person.

5.3 Dosis(un)abhängigkeit der untersuchten Parameter

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin festzustellen, ob die nachweisbaren pneumonitistypischen Veränderungen nur auf Areale hoher Bestrahlungsdosen beschränkt sind bzw. ob eine Dosisabhängigkeit besteht. Dazu wurden jeweils pro Patient drei Segmente unterschiedlicher Dosisexposition lavagiert (<5 Gy, 20-30 Gy, >40 Gy). Wie unter 4.1 beschrieben, ließ sich für die meisten der bestimmten Parameter keine Korrelation zwischen Dosishöhe und Ausprägung derselben feststellen. Eine Ursache dafür könnte der zwischen Bestrahlung und BAL-Untersuchung liegende Zeitintervall von drei bis vier Monaten darstellen, innerhalb dessen sich ursprünglich in hochdosierten Gebieten generierte Veränderungen auf andere Areale ausgebreitet haben. In der Zellkultur [71] und am Tiermodell [80, 175], wo die strahleninduzierten Veränderungen auf Zell- und Mediatorenebene innerhalb von Stunden oder wenigen Wochen nach Applikation unterschiedlicher Bestrahlungsdosen untersucht worden sind, finden sich Hinweise für eine Korrelation zwischen diesen mit steigender Dosis. Hier ist allerdings anzumerken, daß diese Art Studien nicht problemlos auf das humane System übertragen werden können, da sie weitere für die Pneumonitisentwicklung beim Menschen erhobene Risikofaktoren nicht berücksichtigen. Wie schon an anderer Stelle ausgeführt (vgl. 1.2), stellt eine steigende Dosis zwar einen, aber bei weitem nicht den einzigen Risikofaktor für eine Pneumonitis- und Fibroseentwicklung dar. Diese Annahme untermauern die Daten der vorliegenden Arbeit.

Dennoch interessant ist die Tatsache, daß die in dieser Studie bei den Pneumonitispatienten vermehrten Zytokine IL-4 und IL-6 sowie IFN- γ eine gewisse Dosisbeziehung erkennen ließen (vgl. Abb. 8). Diese wies keine direkte Proportionalität auf, sondern zeigte eine gesteigerte Konzentration innerhalb bestimmter Dosisbereiche (vgl. Tab. 5). Geht man nun davon aus, daß diese Veränderungen als Ursache und nicht als Folge der strahleninduzierten Pneumonitis in Erscheinung treten, könnte man vorsichtig formulieren, daß Pneumonitispatienten eine individuelle – genetische ? – oder durch andere Faktoren getriggerte Strahlensensibilität aufweisen, die in den festgestellten Dosisbereichen die Produktion und/oder Freisetzung dieser Zytokine induziert. Dieser Denkansatz hätte derzeit keine praktischen Konsequenzen, da man die hypothetisierte Strahlensensibilität nicht testen oder voraussagen, sondern nur im Nachhinein vermuten kann.

Allerdings könnte diese Annahme zur Erklärung beitragen, warum bislang trotz größter Bemühungen die Definition des auslösenden Moments für die Pneumonitisgenese noch nicht gelungen ist. Neben dieser Disposition könnten die bislang bekannten Einflußgrößen, wie Bestrahlungsparameter und individuelle Faktoren, den Zeitpunkt des Auftretens sowie den Schweregrad der Pneumonitis beeinflussen. Diese Annahme findet in den erhobenen Daten dieser Arbeit angedeutet Unterstützung: Unterteilt man die Patienten mit Pneumonitis in jene mit klinischer Symptomatik und solche mit lediglich radiologischem Anhalt, so wiesen erstere weniger pack years (0 py versus 15 py; $p < 0,1$), ein größeres Zielvolumen (739 cm^3 versus 343 cm^3 ; $p = 0,05$) sowie eine erhöhte Mean Lung Dose (24,3 Gy versus 21 Gy; n. s.) gegenüber letzteren auf. Somit stellten sich diese drei Faktoren in ihrer Ausprägung bei den Patienten am ungünstigsten dar, die nicht nur radiologisch, sondern auch klinisch eine Pneumonitis entwickelten. Da sich in jeder Gruppe nur drei Patienten befanden, lassen sich allerdings keine definitiven Rückschlüsse ziehen.

Noch ein anderer Punkt läßt individuelle und somit schwer faßbare Faktoren im Rahmen der Pneumonitisgenerierung möglich erscheinen: eine Pneumonitis *kann* sich bereits bei relativ geringen, *muß* sich aber auch nicht bei hohen Strahlendosen entwickeln [15]. Hingegen zeigt sich eine Fibrose bei der Mehrzahl der bestrahlten Patienten mit oder ohne vorangehende Pneumonitis. Damit könnte die Pneumonitis im Gegensatz zur Fibrose als weitgehend dosisunabhängig bezeichnet werden. Führt man diesen Gedankengang weiter, könnte die Pneumonitis als "allergische" und die Fibrose als "toxische" Strahlenreaktion bezeichnet werden. Diese zwei verschiedenen Mechanismen könnten erklären, warum die Pneumonitis im Gegensatz zur Fibrose der Therapie mit Kortikosteroiden zugänglich ist.

5.4 Hypothesen zur Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose sowie zu Regulationsmechanismen auf Zell- und Mediatorenebene

In Zusammenschau der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse mit bereits publizierten Daten läßt sich ein Schema über die möglichen Pathomechanismen bei der Entwicklung der pulmonalen Strahlenreaktion erstellen, wie es in Abbildung 15 dargestellt ist.

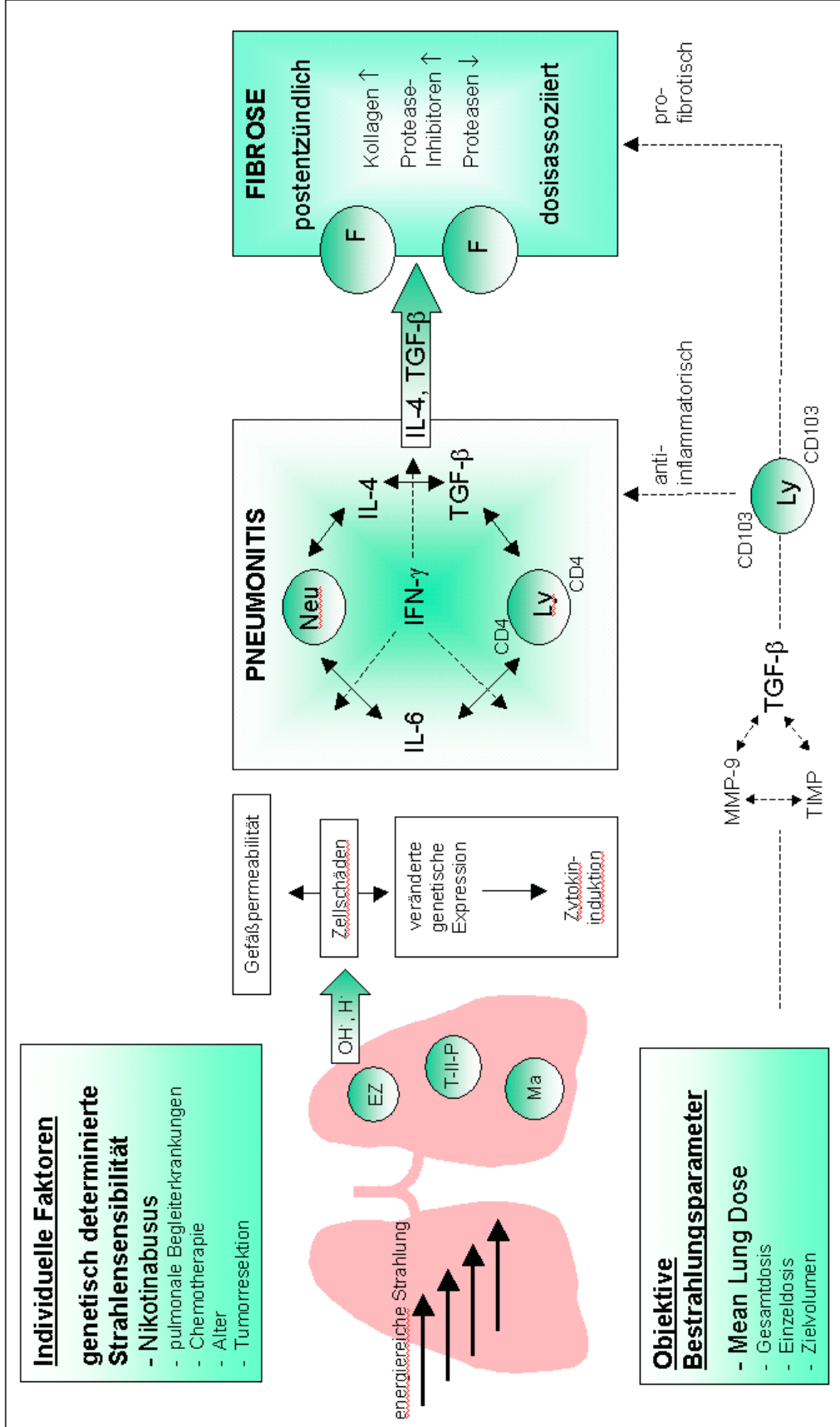


Abbildung 15: Schematische Darstellung möglicher Pathogenesemechanismen der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose, wie sie nach den hier vorgestellten Ergebnissen ablaufen könnten (Erklärung im Text).

EZ = Endothelzellen, T-II-P = Typ-II-Pneumozyten, Ma = Makrophagen, Neu = Neutrophile Granulozyten, Ly = Lymphozyten, F = Fibroblasten

Neben der energiereichen Strahlung mit ihren charakteristischen Größen wie Gesamt- und Einzeldosis, Fraktionierung sowie dem bestrahlten Lungenvolumen besitzen individuelle Faktoren eine zusätzliche Bedeutung bei der Entwicklung der Strahlenpneumopathie. Unabhängig von pulmonalen Begleiterkrankungen, applizierter Chemotherapie, Tumorsektion, Nikotinkonsum und Patientenalter könnte eine genetisch determinierte Strahlensensibilität für die Pneumonitisentstehung eine Rolle spielen, die innerhalb bestimmter Dosisbereiche die strahlengeschädigten Zellgruppen zur Produktion und Sekretion inflammatorischer Zytokine veranlaßt. Hiernach könnte die Pneumonitis um so früher und schwerer in Erscheinung treten, je mehr Risikofaktoren bei einem genetisch disponierten Patienten zusammenwirken.

Die Strahlung führt über Sauerstoffradikale (OH^\cdot , H^\cdot) zu molekularen Zellschäden an Endothelzellen, Typ-II-Pneumozyten, Makrophagen mit resultierender alterierter genetischer Expression und Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-6. Auch die Sekretion von TGF- β 1 kann bereits zu diesem Zeitpunkt stattfinden. Diese Mediatoren verursachen mittels chemotaktischer Signale eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und CD4^+ -T-Lymphozyten im Gewebe, was dem zellulären Korrelat der Pneumonitis entspricht. Dieser Vorgang kann durch die erhöhte Gefäßpermeabilität bei strahlenbedingtem Endothelzellschaden mit erleichtertem Zelleintritt ins Gewebe begünstigt werden. Diese inflammatorischen Zellpopulationen dienen dann wiederum selbst als Mediatorenquelle.

Die infiltrierenden CD4^+ -T-Lymphozyten dürften aufgrund des hier ermittelten Zytokinprofils sowohl dem Th1- als auch dem Th2-Phänotyp zuzuordnen sein, da sowohl das Th1-typische Zytokin IFN- γ als auch die Th2-kennzeichnenden Interleukine IL-4 und IL-6 nachweisbar waren. Diese Annahme setzt voraus, daß diese Proteine nicht nur von den oben erwähnten strahlengeschädigten Zellen freigesetzt werden, sondern auch von den involvierten CD4^+ -T-Lymphozyten. Verfolgt man diesen Gedanken weiter, könnte man spekulieren, daß sich je nach vorherrschendem Zellklon entweder eine klassische auf das Bestrahlungsfeld begrenzte Pneumonitis (Th1-Zellen-Dominanz ?) oder eine auch außerhalb des Strahlenfeldes nachweisbare Hypersensitivitätspneumonitis (Th2-Zellen-Dominanz ?) entwickelt. IFN- γ kann aufgrund seiner bekannten antiinflammatorischen und antifibro-

tischen Eigenschaften für eine gewisse Begrenzung der strahleninduzierten Schädigung in Betracht kommen.

Die während der pneumonitischen Phase sezernierten Zytokine TGF- β 1 und IL-4 weisen ein fibrogenes Potential auf, was für die Entwicklung der postpneumonitischen Fibrose ursächlich verantwortlich sein kann. Als Mediatorenquelle könnten unter anderen aktivierte T-Lymphozyten in Frage kommen, deren Medium in der Zellkultur die Fibroblastenproliferation und Kollagenproduktion stimuliert [194]. Durch die stattfindenden Interaktionen kommt es zur chemotaktischen Attraktion von Fibroblasten sowie zu deren Differenzierung zu postmitotischen Fibrozyten mit vermehrter Produktion kollagener Substanzen und Protease-Inhibitoren. Gleichzeitig wird die Sekretion von Proteasen gehemmt. Diese Prozesse führen in ihrer Summe zur gesteigerten Bildung extrazellulärer Matrix und somit zum fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms. Auch für die Fibroseentwicklung kann die initial strahleninduzierte Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit konsekutiver Exsudation fibrinreichen Materials ins Parenchym förderlich sein.

Zieht man nun die Tatsache heran, daß sich eine Fibrose bei hohen Bestrahlungsdosen auch ohne apparente Entzündung entwickeln kann, könnte diese im Gegensatz zur postpneumonitischen als bestrahlungs- oder dosisassoziierte Fibrose bezeichnet werden. Bei diesen Patienten, die keine genetisch determinierte Sensibilität aufweisen, ruft die energiereiche Strahlung "nur" die Sekretion von TGF- β 1 hervor, welches über einen längeren Zeitraum die fibrosefördernden Prozesse induziert. Da TGF- β 1 durch Proteasen aktiviert wird, ist es vorstellbar, daß das bei pneumonitisnegativen Patienten vermehrt vorhandene MMP-9 diesen Schritt auslöst. Auf der anderen Seite kann TGF- β 1 Inhibitoren für Matrixmetalloproteinasen (TIMP) produzieren und somit die Wirkung des eventuell initial fibrosehemmenden MMP-9 aufheben. Weiterhin ist TGF- β 1 in der Lage, die Expression von CD103 auf T-Lymphozyten zu steigern [121]. Dies könnte – durch die Abwesenheit inflammatorischer Zytokine begünstigt – den vermehrten Anteil CD103⁺CD4⁻- und CD103⁺CD8⁺-T-Zellen bei Patienten ohne Pneumonitis erklären.

Die Funktion der CD103⁺-Lymphozytensubpopulation ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings gibt es Hinweise für mögliche antientzündliche und/oder fibrogene Effekte (vgl. 5.2.1.2), die auch im Rahmen der strahleninduzierten Vor-

gänge vermutet werden können, so daß diese Zellgruppe neben TGF- β 1 bzw. in Verbindung mit diesem für die Fibroseentstehung bei Patienten ohne Pneumonitis mitverantwortlich sein könnte.

Das dargestellte Schema beinhaltet außer den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnissen sowohl Erkenntnisse des *klassischen* als auch des *modifizierten Entstehungsmodells*. Auf der Grundlage der publizierten Untersuchungen ist es unwahrscheinlich, daß nur eines von beiden Modellen das pathogenetische Geschehen nach Strahlenexposition vollständig erfaßt. Am ehesten entsprechen die im klassischen Modell beschriebenen Schäden an Kapillarendothelzellen und Typ-II-Pneumozyten den initialen Veränderungen, woran sich die zytokinvermittelten Prozesse anschließen. Obwohl anzunehmen ist, daß noch andere, bisher unbekannte Mediatoren und Regulationsmechanismen an der Pathogenese der pulmonalen Strahlenreaktion beteiligt sind, eröffnet diese Studie neue Einsichten in die komplexen zugrunde liegenden Vorgänge. Auf diesen Einblicken beruht der Versuch, neue Therapieoptionen zu konzipieren, die auf die kausalen Prozesse ausgerichtet sind.

5.5 Definition neuer präventiver und therapeutischer Behandlungsansätze

Bislang kommen zur Behandlung der strahleninduzierten Pneumonitis Maßnahmen zum Einsatz, die allein auf empirischer Basis beruhen [195]. Kortikosteroide in relativ hoher Dosierung über einen Zeitraum von ca. zwei bis vier Wochen stellen bisher die effektivste Therapie dar [16, 18]. In manchen Abteilungen werden diese durch Breitbandantibiotika zur Vermeidung einer bakteriellen Superinfektion ergänzt [17]. Handelt es sich um eine schwere respiratorische Beeinträchtigung ist eine O₂-Gabe, in sehr schweren Fällen die intensivmedizinische Betreuung mit Beatmung erforderlich. Andere tierexperimentell eingesetzte Substanzen wie beispielsweise nichtsteroidale Antirheumatika [27, 28] brachten keine neuen therapeutischen Perspektiven. Die Fibrose entzieht sich zum jetzigen Zeitpunkt jeglicher Therapie.

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen sich verschiedene neue Behandlungsansätze ableiten, die kausal sowohl die Pneumonitis

als auch die Fibrose beeinflussen könnten. Hier kommen Zelloberflächen-Antikörper, Zytokin-Antikörper und Zytokin-Rezeptorantagonisten sowie die Applikation antiinflammatorischer und/oder antifibrotischer Zytokine in Betracht.

5.5.1. Zelloberflächen-Antikörper

Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung $CD4^+$ -T-Lymphozyten an der Genese der strahleninduzierten Pneumonitis hin. Des Weiteren kann für $CD103^+CD4^+$ -Zellen eine Rolle bei der Fibroseentstehung ohne vorhergehende Entzündung vermutet werden. An dieser Stelle könnten anti- $CD4$ -Antikörper zum Einsatz kommen, um einerseits die inflammatorischen und andererseits die fibrotischen Abläufe zu unterbinden bzw. zu attenuieren.

Dieser Ansatz kam bereits im Tiermodell zur Anwendung. Westermann et al. demonstrierten durch die Gabe des anti-Ratten $CD4$ mAbOx-38-Antikörpers deutlich verminderte morphometrisch ermittelte strahleninduzierte Gewebeschäden [152]. Der Antikörper, der zur Depletion von $CD4^+$ -T-Zellen führt [196], wurde vor und nach Strahlenexposition intraperitoneal injiziert. Inwiefern eine Fibroseentwicklung tatsächlich verhindert werden konnte, geht aus dieser Studie allerdings nicht hervor, da die histologische Untersuchung bereits zwei Monate nach Bestrahlung erfolgte.

Beim Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zeigte die Gabe von Zelloberflächen-Antikörpern eine Attenuierung der fibrotischen Reaktion. Hier kamen in einer Studie von Piguet et al. anti- $CD4$ - und anti- $CD8$ -Antikörper zum Einsatz [197], Sharma et al. verabreichten Mäusen anti- $CD3$ -Antikörper [198]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen sich nicht bedenkenlos auf das humane System übertragen. Erstens ist unklar, inwieweit die Pathogenese der Bleomycin-induzierten Fibrose der durch Bestrahlung hervorgerufenen entspricht, und zweitens ließ sich anhand der vorliegenden Studie keine direkte Beteiligung von $CD8^+$ -T-Lymphozyten an der Pneumonisentstehung nachweisen.

Ob eine Behandlung mit anti- $CD4$ -Antikörpern prophylaktisch oder therapeutisch von Nutzen ist, müssen weitere Studien evaluieren. Ebenso bleibt zu prüfen, welche unerwünschten Effekte, beispielsweise die Beeinflussung essentieller immunologischer Abläufe, durch eine solche Therapie verursacht werden.

5.5.2. Zytokin-Antikörper und Zytokin-Rezeptorantagonisten

Die Resultate dieser Arbeit postulieren die Beteiligung der proinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-6 bei der Genese der strahleninduzierten Pneumonitis. An dieser Stelle könnte der Einsatz von Antikörpern gegen diese beiden Mediatoren bzw. von Rezeptorantagonisten krankheitshemmend oder -attenuierend in die ablaufenden Pathomechanismen eingreifen. Neben den eventuell eintretenden unerwünschten Wirkungen bleibt zu klären, ob beide Zytokine antagonisiert werden müssen bzw. welches der beiden effektiver und mit weniger Nebenwirkungen die pulmonale Strahlenreaktion hemmt. Dazu existieren bislang keine Daten.

Die Rolle des bei Patienten mit Pneumonitis vermehrt nachgewiesenen IFN- γ , aus der Literatur als antientzündliches und antifibrotisches Zytokin bekannt, ist schwierig zu beurteilen. Einerseits könnte es im Rahmen der Strahlenpneumopathie der Entzündung und Fibrose Vorschub leisten. Dann wäre ebenfalls eine Antagonisierung erfolgversprechend. Andererseits käme eine Sekretion von IFN- γ als Gegenreaktion zum inflammatorischen und beginnenden fibrotischen Geschehen in Betracht. Letzteres erscheint aufgrund des bisher erforschten Wirkungsprofils plausibler, so daß dessen Blockierung nicht sinnvoll wäre, sondern die Applikation dieses Zytokins in Erwägung gezogen werden könnte (vgl. 5.5.3).

Ein weiterer Angriffspunkt, der vermutlich insbesondere zur Fibrosehemmung in Frage käme, umfaßt die Blockierung der TGF- β -Wirkungen entweder mittels Antikörpern oder Rezeptorantagonisten. Neutralisierende Antikörper zeigten bereits in der Zellkultur eine effektive Abnahme der chemotaktischen Aktivität von TGF- β gegenüber Fibroblasten [93] sowie eine Normalisierung des Verhältnisses zwischen Fibroblasten zu Fibrozyten [94]. Des weiteren führte die Administration von TGF- β -Antikörpern zu einem reduzierten fibrotischen Umbau im Lungengewebe von Mäusen nach Bleomycinexposition [199]. Delanian et al. demonstrieren erstmals den Rückgang einer kutanen Strahlenfibrose beim Menschen durch die intramuskuläre Applikation liposomaler Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD) [200]. Dieses erfolgreiche und vielversprechende Behandlungsergebnis konnte von Lefaix et al. an fibrotischer Schweinemuskulatur mit boviner Cu/Zn-SOD und humaner rekombinanter Mn-SOD reproduziert werden [201]. Die Autoren führen die antifibrotische Aktivität der SOD auf eine Blockierung der TGF- β -Sekretion durch Myofibroblasten zurück [202]. Diese Studien erwecken die Hoffnung, daß mit der

Antagonisierung des fibrogenen TGF- β eine Modulation der strahleninduzierten fibrotischen Prozesse möglich sein könnte. Auch in der vorliegenden Arbeit weisen sowohl Patienten mit als auch ohne Pneumonitis erhöhte Konzentrationen dieses Zytokins im Vergleich zum Zeitpunkt vor Bestrahlung auf. Hieraus ergeben sich zwei Möglichkeiten: 1) Ist die vermehrte Menge von TGF- β Folge der pneumonitischen Veränderungen, und sind diese durch andere Behandlungsansätze vermeidbar (z. B. Antikörper gegen CD4, IL-4 und IL-6), so ist eine TGF- β -Antagonisierung unnötig. 2) Stellt die erhöhte TGF- β -Konzentration allerdings eine Reaktion zur Strahlenexposition dar, und ist dieses Zytokin für die Fibroseentwicklung verantwortlich, kommt der Blockierung dieses Mediators eine zentrale Rolle im Rahmen der pathogenetischen Mechanismen zu.

5.5.3. Antiinflammatorische und/oder antifibrotische Zytokine

Neben der Antagonisierung von Lymphozytensubpopulationen und Zytokinen zur Modulation der pulmonalen Strahlenreaktion kommt auch die Administration von Mediatoren in Betracht, die eine antiinflammatorische bzw. antifibrotische Wirkung besitzen.

Das in dieser Hinsicht am detailliertesten beschriebene Zytokin ist IFN- γ , dessen erhöhte Konzentration bei Pneumonitispatienten in der vorliegenden Arbeit am ehesten als Gegenregulation zum Entzündungsgeschehen zu deuten ist. Aus der Literatur geht IFN sowohl als entzündungs- als auch fibrosehemmend (vgl. 1.3.2.2) hervor. Neben diesen mittels Zellkulturtechnik und Tiermodellen gewonnenen Erkenntnissen weisen auch Studien am Menschen diese Wirkungen auf. So zeigt eine Pilotstudie bei Patienten mit schwerem Kortikosteroid-abhängigen Asthma bronchiale und Churg-Strauss-Syndrom, daß die regelmäßige subkutane Injektion von IFN- α die diesen Erkrankungen zugrunde liegenden Entzündungsprozesse attenuiert [203].

Eine andere Arbeit an sechs Überlebenden des Kernreaktorunfalls in Tschernobyl demonstriert, daß die subkutane Gabe von IFN- γ über 36 Monate die strahleninduzierte kutane Fibrose signifikant reduzierte [166]. Dieses Zytokin wird also schon in der Praxis angewendet und seine Nebenwirkungen sowie Kontraindikationen sind weitgehend bekannt. Wenn sich die IFN-Gabe bei der pulmonalen Strahlenreaktion als effektiv erweist, sind diese verfügbaren Erfahrungen im

Vergleich zu den anderen potentiell in Frage kommenden aber noch nicht am Menschen eingesetzten Substanzen von großem Vorteil.

In der vorliegenden Arbeit wiesen Patienten ohne Pneumonitis eine erhöhte MMP-9-Konzentration in der Lavageflüssigkeit bei signifikant weniger Hydroxyprolin im Vergleich zu solchen mit dieser Komplikation auf. Dies könnte als Hinweis auf eine gewisse antifibrotische bzw. matrixmodulierende Aktivität dieser Protease aufgefaßt werden kann. Daher wäre die Applikation von MMP-9 als fibrosehemmendes Agens theoretisch möglich, stellt aber zum jetzigen Zeitpunkt mit allenfalls beginnendem Verständnis über die Wirkungsweisen dieses Moleküls einen rein hypothetischen Ansatz dar. Des weiteren wird MMP-9 durch seine proteolytische Funktion als Promotor der Tumorinvasivität verstanden [189], was eine praktische Anwendung von MMP-9 sehr unwahrscheinlich werden läßt.

KGF, welches sich in dieser Studie nicht nachweisen ließ, zeigt tierexperimentell eine protektive Funktion bezüglich der Bleomycin- und strahleninduzierten Lungenschädigung [114]. Ein weiterer Faktor, welcher im Tiermodell die akute pulmonale Strahlenreaktion verhindert, stellt bFGF dar [204]. Während ersterer durch eine gesteigerte Surfactantproduktion und Induktion der Typ-II-Pneumozyten-Proliferation fungieren soll [115, 116], wird für letzteren eine Schutzfunktion der Endothelzellen angenommen [205]. Ob diese Zytokine im humanen System ebenso wirken, ist unklar und bedarf der Klärung. Ließen sich diese Wirkungen bestätigen, kämen KGF und bFGF theoretisch für einen prophylaktischen bzw. therapeutischen Einsatz in Betracht. Das gleiche gilt für IL-1, das im Tierexperiment ebenfalls eine radioprotektive Wirkung aufwies [167, 206, 207].

Die oben dargestellten Angriffspunkte und Substanzgruppen kommen nach Ergebnissen dieser Arbeit oder aufgrund publizierter Daten als mögliche neue therapeutische Optionen zur Verhinderung oder Attenuierung der pulmonalen Strahlenreaktion in Frage. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß vor einem möglichen Einsatz noch viele Fragen zu klären sind. So läßt sich beispielsweise vermuten, daß Prophylaxe und Therapie unterschiedliche Substanzen beinhalten könnten – je nach Ursache und Folge eines pathogenetischen Moments. Weiterhin ist fraglich, ob die Vermeidung einer Pneumonitis gleichzeitig eine Unterbindung der Fibrose nach sich zieht oder ob hier verschiedenen Pathomechanismen mit entsprechend unterschiedlichen Mitteln begegnet werden

muß. So wäre denkbar, daß Patienten mit Pneumonitisrisiko bzw. solche mit manifester Entzündung Antikörper gegen CD4, IL-4 und IL-6 benötigen, aber alle Bestrahlungspatienten von einer TGF- β 1-Inhibition und/oder IFN- γ -Applikation bezüglich der Fibrosehemmung profitieren. Ferner muß vor einem eventuell prophylaktischen Einsatz das Risikoprofil bezüglich der Pneumonitis und Fibrose identifiziert sein. Neben diesen Sachverhalten ist offen, welche der Substanzen mit welchem Nebenwirkungsspektrum wirklich effektiv sind und sich in welcher Applikationsform in Therapie und/oder Prophylaxe bewähren. Nicht zuletzt ist zu klären, zu welchem Zeitpunkt und über welchen Zeitraum die Administration erfolgen sollte.

5.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die in den letzten Jahren etablierte Betrachtungsweise, daß an der Pathogenese der strahleninduzierten Pneumonitis verschiedene Zelltypen sowie komplexe zytokinvermittelte Prozesse beteiligt sind, deren Gesamtheit und Funktionsweisen der weiteren Klärung bedürfen, um effektive kausale Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

Die Mehrzahl der bislang erhobenen Befunde basiert auf tierexperimentellen Studien sowie Zellkulturtechniken, aus denen nicht unmittelbar auf die Abläufe beim Menschen geschlossen werden kann. Untersuchungen am humanen System erfolgten überwiegend mittels Analysen der BAL-Flüssigkeit. Da noch keine Klarheit herrscht, inwiefern ermittelte Zell- und Mediatorenmuster der Lavageflüssigkeit quantitativ, qualitativ und im zeitlichen Bezug dem Geschehen im Gewebe entsprechen, sind vergleichende histologische Studien am Menschen dringend notwendig. Um den Verlauf der pathogenetischen Vorgänge besser zu verstehen, ergibt sich die Forderung, Untersuchungen zu mehreren Zeitpunkten nach Strahlenexposition durchzuführen.

Die alleinige Beschreibung von Unterschieden im zellulären und humoralen Milieu zwischen Patienten mit und ohne Strahlenreaktion erfüllt nicht die Forderung, kausale Abläufe aufzudecken. Daher erfordern die stattfindenden Interaktionen zwischen beteiligten Zellen und Botenstoffen eine genaue Prüfung, um

Rückschlüsse zu ursächlichen und daraus resultierenden Mechanismen ziehen zu können.

Um möglichst genaue Aussagen zum Aktivierungszustand der beteiligten Zellgruppen und dessen zeitlichen Verlauf treffen zu können, ergeben sich folgende Forderungen: Zum einen sind die BAL-Analysen zu mehreren Zeitpunkten nach Strahlenexposition durchzuführen, zum anderen sind Aktivierungsantigene, wie VLA-1 und VLA-2, einzusetzen, die im Gegensatz zu CD25 und HLA-DR noch längerfristig nach stattgehabter Zellaktivierung exprimiert werden [153].

Im Hinblick auf die Evaluierung prädiktiver Parameter bei der Entwicklung einer pulmonalen Strahlenreaktion ist neben einer detaillierten Patientenanamnese die diffizile Verlaufsbeobachtung nach Bestrahlung und lückenlose Dokumentation möglicher objektiver und individueller Einflußfaktoren unabdingbar. Außerdem sollten Studienkonzepte vorsehen, daß sich die gleiche Patientengruppe vor und nach Strahlentherapie der BAL- bzw. histologischen Untersuchung unterzieht, um Faktoren auf zellulärer und humoraler Ebene zu ermitteln, die zwischen Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumopathie bereits vor Strahlenexposition differieren und somit zur Erstellung eines Risikoprofils beitragen.

Die momentan durchgeführte Entschlüsselung des menschlichen Erbgutes mit den dabei angewandten Methoden könnte einerseits Aufschluß darüber geben, ob eine genetisch determinierte Strahlensensibilität existiert. Andererseits ist denkbar, daß dort etablierte Techniken in die Routinediagnostik Einzug halten, mit deren Hilfe eine auf das Individuum ausgerichtete und mit relativ wenig Probenmaterial auskommende Forschung möglich ist, welche die strahleninduzierten Veränderungen auf molekularer Ebene untersucht.

Auf diesen genannten Aspekten aufbauend erscheint die Entwicklung neuer kausaler Therapiekonzepte möglich. Bei erfolgreicher Aufschlüsselung der Risikofaktoren rückt außerdem der Einsatz einer Prophylaxe in greifbare Nähe. Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Substanzgruppen, wie Zelloberflächen-Antikörper gegen CD4, Zytokin-Antikörper bzw. Zytokin-Rezeptorantagonisten gegen IL-4 und IL-6 sowie TGF- β 1 und die Applikation antiinflammatorischer und/oder antifibrotischer Zytokine, wie IFN- γ , bedürfen der Prüfung hinsichtlich ihrer Effektivität. Daneben kann die Erforschung weiterer involvierter Mediatoren und Zell-

gruppen sowie deren Kommunikationsmuster zusätzliche Angriffspunkte für therapeutische Strategien liefern.

Einen anderen interessanten Gesichtspunkt stellt die Vermutung dar, daß die der strahleninduzierten Pneumonitis und pulmonalen Fibrose zugrunde liegenden Pathomechanismen denjenigen entsprechen könnten, die auch in anderen Organen für die Entwicklung der akuten und chronischen Strahlenschäden verantwortlich sind. Zur Prüfung dieser Hypothese sind weitere Studien am Tiermodell und humanen System dringend notwendig. Sollte es jedoch Parallelen in den ablaufenden Mechanismen geben, ist prinzipiell die Anwendung der oben definierten therapeutischen und/oder prophylaktischen Substanzen auch bei Bestrahlungslokalisationen außerhalb des Thorax, zum Beispiel des Abdomens mit den strahlenempfindlichen Organen des Verdauungs- und Urogenitaltrakts, denkbar.

Neben dem besseren Verständnis der pathogenetischen Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene mit daraus resultierenden Therapiemöglichkeiten kommt der weiteren Optimierung der Strahlenapplikation mit bestmöglicher Schonung gesunder Gewebe eine große Bedeutung bei der Minimierung der Nebenwirkungen zu.

Gelingt es, mit den aufgezeigten Untersuchungen und Therapiemöglichkeiten die strahleninduzierte Pneumonitis und Fibrose zu verhindern oder zu attenuieren, würde sich daraus zum einen eine verbesserte Lebensqualität der Tumorpatienten ergeben. Zum anderen wäre die Steigerung der Gesamtdosis im Zielvolumen möglich, was eine vermehrte Tumorkontroll- und Heilungsrate bedeutet.

6. Zusammenfassung

Die Effektivität einer Strahlentherapie maligner Tumoren im Thoraxbereich wird durch pulmonale Komplikationen in Form einer Pneumonitis und Fibrose limitiert. Aufgrund mangelnder Kenntnisse über die zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen insbesondere am Menschen stehen keine suffizienten kausal wirkenden Substanzen für Prophylaxe und Therapie zur Verfügung. Neben einer geminderten Lebensqualität der betroffenen Patienten bedingen diese unerwünschten Strahlenreaktionen eine Limitation der applizierbaren Dosis und somit verringerte Chancen der Tumorkontrolle.

Ziel dieser Studie war es deshalb, an einem neu etablierten humanen Modell die eine strahleninduzierte Pneumonitis verursachenden Mechanismen auf Zell- und Mediatorenebene zu analysieren. Darauf basierend sollten fernerhin neue präventive und therapeutische Strategien als Voraussetzung für die wirksame Behandlung und Vermeidung dieser Strahlenreaktion abgeleitet werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der BAL-Flüssigkeit von Bronchialkarzinompatienten vor sowie drei bis vier Monate nach Ende der Strahlentherapie im Hinblick auf die Expression bestimmter zellulärer und humoraler Parameter. Zur Klärung der Dosisabhängigkeit wurde die Lavage in drei verschiedenen Segmenten, die unterschiedlichen Strahlendosen ausgesetzt waren, durchgeführt. Des Weiteren wurden die Bestrahlungsparameter und patientenspezifischen Faktoren bezüglich ihres Einflusses auf die Entwicklung einer radio-genen Pneumonitis evaluiert. Die Ergebnisse wurden insbesondere unter dem Aspekt der Ableitung potentieller Therapieoptionen betrachtet.

Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigten eine Beteiligung neutrophiler Granulozyten und CD4⁺-T-Lymphozyten am pneumonitischen Prozeß, der auf humoraler Ebene von den proinflammatorischen Zytokinen IL-4 und IL-6 dominiert wurde. Darüber hinaus fand sich IFN- γ bei Patienten mit Pneumonitis in erhöhter Konzentration. Interessanterweise ließ sich nur für diese drei Mediatoren eine unterschiedliche Sekretion in bestimmten Dosisbereichen finden, so daß einerseits eine gewisse Dosisunabhängigkeit der Pneumonitis möglich ist. Andererseits kann eine individuelle Disposition im Sinne einer genetisch determinierten Strahlensen-

sibilität mit konsekutiver Expression dieser Zytokine vermutet werden. TGF- β 1, welches bei Patienten mit und ohne Pneumonitis in gesteigerter Konzentration nachweisbar war, kommt möglicherweise eine essentielle Rolle bei der Induktion der Fibrose zu und zwar sowohl bei der postentzündlichen Fibrose als auch bei derjenigen, die sich unmittelbar ohne vorausgehende Pneumonitis entwickeln kann. Bei letzterer scheinen außerdem auch CD103⁺-T-Lymphozyten beteiligt zu sein. In der Studie konnte ferner eine Beziehung zwischen der Mean Lung Dose der höher bestrahlten Einzellunge und der Entwicklung einer Pneumonitis nachgewiesen werden. Dagegen erwies sich ein langjähriger bzw. exzessiver Nikotinkonsum als protektiver Faktor. Weitere individuelle Parameter, wie Alter, pulmonale Begleiterkrankungen und eine der Bestrahlung vorausgegangene Tumoresektion, hatten keinen Einfluß auf die Entstehung einer strahleninduzierten Pneumonitis.

Aus den Resultaten kann ein therapeutischer Nutzen von anti-CD4-Antikörpern, Zytokin-Antikörpern bzw. Rezeptorantagonisten gegen IL-4 und IL-6 im Rahmen der inflammatorischen Vorgänge abgeleitet werden. Zur Abschwächung bzw. Prävention einer Fibrose könnte überdies der Einsatz von anti-TGF- β 1-Antikörpern und TGF- β 1-Rezeptorantagonisten sowie die Administration des antifibrotischen IFN- γ sinnvoll sein.

Weitere Studien, die sich den Pathomechanismen der pulmonalen Strahlenreaktion sowie der Praktikabilität bestimmter therapeutischer bzw. präventiver Ansätze widmen, sind sowohl zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten als auch zur Steigerung der Tumorkontrolle und Heilungsrate durch höhere Strahledosen erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Movsas B, Raffin TA, Epstein AH, Link CJ jr. Pulmonary radiation injury. *Chest* 1997; 111: 1061-1076.
2. Libshitz HI, Southard ME. Complications of radiation therapy. The thorax. *Sem Roentgenol* 1974; 9: 41-49.
3. Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 1995; 35: 83-90.
4. Cameron EH, Crystal RG. Radiation-induced lung injury. *The Lung* 1997; 202: 2647-2651.
5. Roswit B, White DC. Severe radiation injuries of the lung. *Am J Roentgenol* 1977; 129: 127-136.
6. Coggle JE, Lambert BE, Moores SR. Radiation effects in the lung. *Env Health Perspectives* 1986; 70: 261-291.
7. Autor und Quelle unbekannt.
Diseases of the thorax caused by external physical agents.
8. Mah K, Van Dyk J, Keane T, Poon PY. Acute radiation-induced pulmonary damage: a clinical study on the response to fractionated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 179-188.
9. Libshitz HI, DuBrow RA, Loyer EM, Charnsangavej C. Radiation change in normal organs: an overview of body imaging. *Eur Radiol* 1996; 6: 786-795.
10. McDonald S, Rubin P, Phillips TL, Marks LB. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndroms, measureable endpoints, and potential scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 1187-1203.
11. Monson JM, Stark P, Reilly JJ, Sugarbaker DJ, Strauss GM, Swanson SJ, Decamp MM, Mentzer SJ, Baldini HE. Clinical radiation pneumonitis and radiographic changes after thoracic radiation therapy for lung carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 843-850.
12. Nonn RA, Gross NJ. Effects of radiation on the lung. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 1996, 2: 390-395.
13. Kasper M, Haroske G. Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol* 1996; 11: 463-483.
14. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and

- Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 1341-1346.
15. Libshitz HI. Radiation changes in the lung. *Semin Roentgenol* 1993; 28: 303-320.
 16. Pezner RD, Bertrand M, Cecchi GR, Paladugu RR, Kendregan BA. Steroid-withdrawal radiation pneumonitis in cancer patients. *Chest* 1984; 85: 816-817.
 17. Makimoto T, Tsuchiya S, Hayakawa K, Saitoh R, Mori M. Risk factors for severe radiation pneumonitis in lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1999; 29: 192-197.
 18. Cordier JF, Mornex JF, Lasne Y, Gerard JP, Cordier G, Creyssel R, Touraine R. Bronchoalveolar lavage in radiation pneumonitis. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1984; 20: 369-374.
 19. Rosenbaum D, Peric S, Holecek M, Ward HE. Hyaluronan in radiation-induced lung disease in the rat. *Radiat Res* 1997; 147: 585-591.
 20. Abratt RP, Willcox PA. The effect of irradiation on lung function and perfusion in patients with lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 3: 915-919.
 21. Graham MM, Evans ML, Dahlen DD, Mahler PA, Rasey JS. Pharmacological alteration of the lung vascular response to radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19: 329-339.
 22. Wesselius LJ, Floreani AA, Kimler BF, Papasian CJ, Dixon AY. Effect of corticosteroid treatment on cell recovery by lung lavage in acute radiation-induced lung injury. *Radiat Res* 1989; 120: 313-322.
 23. Gross NJ, Narine KR. Experimental radiation pneumonitis: Corticosteroids increase the replicative activity of alveolar type 2 cells. *Radiat Res* 1988; 115: 543-549.
 24. Gross NJ, Narine KR, Wade R. Protective effect of corticosteroids on radiation pneumonitis in mice. *Radiat Res* 1988; 113: 112-119.
 25. Phillips TL, Wharam MD, Margolis LW. Modification of radiation injury to normal tissues by chemotherapeutic agents. *Cancer* 1975; 35: 1678-1684.
 26. Kwok E, Chan CK. Corticosteroids and azathioprine do not prevent radiation-induced lung injury. *Can Respir J* 1998; 5: 211-214.
 27. Panes J, Molla M, Casadevall M, Salas A, Sans M, Conill C, Anderson DC, Rosello-Catafau J, Granger DN, Pique JM. Tepoxalin inhibits inflammation

and microvascular dysfunction induced by abdominal irradiation in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 841-850.

28. Gross NJ, Holloway NO, Narine KR. Effects of some nonsteroidal anti-inflammatory agents on experimental radiation pneumonitis. *Radiat Res* 1991; 127: 317-324.
29. Perez CA, Pajak TF, Rubin P, Simpson JR, Mohiuddin M, Brady LW, Perez-Tamayo R, Rotman M. Long-term observations of the patterns of failure in patients with unresectable non-oat cell carcinoma of the lung treated with definitive radiotherapy. *Cancer* 1987; 59: 1874-1881.
30. Ball D, Matthews J, Worotniuk V, Crennan E. Longer survival with higher doses of thoracic radiotherapy in patients with limited non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 599-604.
31. Perez CA, Stanley K, Rubin P, Kramer S, Brady LW, Marks JE, Perez-Tamayo R, Brown GS, Concannon JP, Rotman M. A prospective randomized study of various irradiation doses and fractionation schedules in the treatment of inoperable non-oat cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1980; 45: 2744-2753.
32. Davis SD, Yankelevits DF, Henschke CI. Radiation effects on the lung: clinical features, pathology and imaging findings. *Am J Roentgenol* 1992; 159: 1157-1164.
33. Lingos TI, Recht A, Vicini F, Abner A, Silver B, Harris JR. Radiation pneumonitis in breast cancer patients treated with conservative surgery and radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 355-360.
34. Rothwell RI, Kelly SA, Joslin CAF. Radiation pneumonitis in patients treated for breast cancer. *Radiother Oncol* 1985; 4: 9-14.
35. Mah K, Keane TJ, Van Dyk J, Braban LE, Poon PY, Hao Y. Quantitative effect of combined chemotherapy and fractionated radiotherapy on the incidence of radiation-induced lung damage: a prospective clinical study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28: 563-574.
36. Franzen L, Bjermer L, Henriksson R, Littbrand B, Nilsson K. Does smoking protect against radiation-induced pneumonitis? *Int J Radiat Biol* 1989; 56: 721-724.
37. Bjermer L, Franzen L, Littbrand B, Nilsson K, Angström T, Henriksson R. Effects of smoking and irradiated volume on inflammatory response in the

lung of irradiated breast cancer patients evaluated with bronchoalveolar lavage. *Cancer Res* 1990; 50: 2027-2030.

38. Martín C, Romero S, Sánchez-Payá J, Massuti B, Arriero JM, Hernández L. Bilateral lymphocytic alveolitis: a common reaction after unilateral thoracic irradiation. *Eur Respir J* 1999; 13: 727-732.
39. Roberts CM, Foulcher E, Zaunders JJ, Bryant DH, Freund J, Cairns D, Penny R, Morgan GW, Breit SN. Radiation pneumonitis: a possible lymphocyte-mediated hypersensitivity reaction. *Ann Intern Med* 1993; 118: 696-700.
40. Gross NJ. The pathogenesis of radiation-induced lung damage. *Lung* 1981; 159: 115-127.
41. Vergara JA, Raymond U, Thet LA. Changes in lung morphology and cell number in radiation pneumonitis and fibrosis; a quantitative ultrastructural study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 723-732.
42. Morgan GW, Breit SN. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 361-369.
43. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33: 99-109.
44. Piguet PF. Cytokines involved in pulmonary fibrosis. *Int Rev Exp Pathol* 1993; 34: 173-181.
45. Rubin P, Finkelstein J, Shapiro D. Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24: 93-101.
46. Hammerschlag-Icaza BA, Rodriguez-Servera RJ. Radiation pneumonitis: a hyper-sensitivity phenomenon ? *Bol Asoc Med P Rico* 1991; 83: 10-12.
47. Gibson PG, Bryant DH, Morgan GW, Yeates M, Fernandez V, Penny R, Breit SN. Radiation-induced lung injury: a hypersensitivity pneumonitis ? *Ann Intern Med* 1988; 109: 288-291.
48. Travis EL, Harley RA, Fenn JO, Klobukowski CJ, Hargrove HB. Pathologic changes in the lung following single and multi-fraction irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1977; 2: 475-490.

49. Jack CIA, Cottier B, Jackson MJ, Cassapi L, Fraser WD, Hind CRK. Indicators of free radical activity in patients developing radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 34:149-154.
50. Adamson IYR, Bowden DH. Endothelial injury and repair in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1983; 112: 224-230.
51. Moosavi H, McDonald S, Rubin P, Cooper R, Stuard ID, Penney D. Early radiation dose-response in lung: An ultrastructural study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1977; 2: 921-931.
52. Law MP. Vascular permeability and late radiation fibrosis in mouse lung. *Radiat Res* 1985; 103: 60-76.
53. Kimsey FC, Mendenhall NP, Ewald LM, Coons TS, Layon AJ. Is radiation treatment volume a predictor for acute or late effect on pulmonary function? *Cancer* 1994; 73: 2549-2555.
54. Philips TL. An ultrastructural study of the development of radiation injury in the lung. *Radiology* 1966; 87: 49-54.
55. Adamson IYR, Bowden DH, Wyatt JP. A pathway to pulmonary fibrosis: An ultrastructural study of mouse and rat following radiation to the whole body and hemithorax. *Am J Pathol* 1970; 58: 481-498.
56. Knaack L, von Bierbauer A, Barth P, Schmidt JA, von Wichert P. Obliteration großer Arterien als Spätfolge strahleninduzierter Vaskulopathien. *Dtsch med Wschr* 1997; 122: 655-658.
57. Remy J, Wegrowski J, Crechet F, Martin M, Daburon F. Long-term overproduction of collagen in radiation-induced fibrosis. *Radiat Res* 1991; 125: 14-19.
58. Ward WF, Molteni A, Solliday NH, Jones GE. The relationship between endothelial dysfunction and collagen accumulation in irradiated rat lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11: 1985-1990.
59. Evans ML, Graham MM, Mahler PA, Rasey JS. Changes in vascular permeability following thorax irradiation in the rat. *Radiat Res* 1986; 107: 262-271.
60. Goldstein RH, Fine A. Fibrotic reaction in the lung: the activation of the lung fibroblast. *Exp Lung Res* 1986; 11: 245-261.

61. Rubin P, Finkelstein J, McDonald S, Horowitz S, Sinkin R. The identification of new early molecular mechanisms in the pathogenesis of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21(1): 93.
62. Atkins FM, Clark RAF. Mast cells and fibrosis. *Archives of Dermatology* 1987; 123: 191-193.
63. Murray JC, Parkins CS. Collagen metabolism in mouse lung after X-irradiation. *Radiat Res* 1987; 111: 498-510.
64. Field SB, Hornsey S. Damage to mouse lung with neutrons and x-rays. *Eur J Cancer* 1974; 10: 621-627.
65. Shapiro DL, Finkelstein JN, Penney DP, Sieman DW, Rubin P. Sequential effects of irradiation on the pulmonary surfactant system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8: 879-882.
66. Rubin P, Siemann DW, Shapiro DL, Finkelstein JN, Penney DP. Surfactant release as an early measure of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1983; 9: 1669-1673.
67. Rubin P, Shapiro DL, Finkelstein JN, Penney DP. The early release of surfactant following lung irradiation of alveolar type II cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980; 6: 75-77.
68. Shapiro DL, Finkelstein JN, Rubin P, Penney DP, Siemann DW. Radiation induced secretion of surfactant from cell cultures of type II pneumocytes: An in vitro model of radiation toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 375-378.
69. Penney DP, Shapiro DL, Rubin P, Finkelstein J, Siemann DW. Effects of radiation on the mouse lung and potential induction of radiation pneumonitis. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1981; 37: 327-336.
70. Evans ML, Graham MM, Mahler PA, Rasey JS. Use of steroids to suppress vascular response to radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 563-567.
71. Witte L, Fuks Z, Haimovitz-Friedmann A, Vladovsky I, Goodman S, Eldor A. Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Res* 1989; 49: 5066-5074.
72. Finkelstein JN, Johnston CJ, Baggs R, Rubin P. Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in

- mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28: 621-631.
73. Büttner C, Skupin A, Reimann T, Rieber EP, Unteregger G, Geyer P, Frank KH. Local production of IL-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of IL-4. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 315-325.
 74. Hong JH, Chiang CS, Tsao CY, Lin PY, McBride WH, Wu CJ. Rapid induction of cytokine gene expression in the lung after single and fractionated doses of radiation. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 1421-1427.
 75. Canney PA, Dean-S. Transforming growth factor beta: a promotor of late connective tissue injury following radiotherapy? *Br J Radiol* 1990; 63: 620-623.
 76. Anscher MS, Kong FM, Marks LB, Bentel GC, Jirtle RL. Changes in plasma transforming growth factor beta during radiotherapy and the risk of symptomatic radiation-induced pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37: 253-258.
 77. Kelley J. Transforming growth factor- β . In: *Cytokines in the lung*. New York: Marcel Dekker, 1992:101-138.
 78. Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1077-1083.
 79. Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 1994; 93: 892-899.
 80. Yi ES, Bedoya A, Lee H, Chin E, Saunders W, Kim SJ, Danielpour D, Remick DG, Yin S, Ulich TR. Radiation-induced lung injury in vivo: expression of transforming growth factor-beta precedes fibrosis. *Inflammation* 1996; 20: 339-352.
 81. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4167-4171.
 82. Lyons RM, Moses HL. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* 1990; 187: 467-473.

83. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 1992; 18: 29-43.
84. Hoyt DG, Lazo JS. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor- β precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 765-771.
85. Khalil N, Berezney O, Sporn M, Greenberg O. Macrophage production of transforming growth factor β and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 1989; 170: 727-737.
86. Hoyt DG, Lazo JS. Early increases in pulmonary mRNA encoding procollagens and transforming growth factor- β in mice sensitive to cyclophosphamide-induced pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 249: 38-43.
87. Franko AJ, Sharplin J, Ghahary A, Barcellos-Hoff MH. Immunohistochemical localization of transforming growth factor β and tumor necrosis factor α in the lungs of fibrosis-prone and 'non-fibrosing' mice during the latent period and early phase after irradiation. *Radiat Res* 1997; 147: 245-256.
88. Anscher MS, Murase T, Prescott DM, Marks LB, Reisenbichler H, Bentel GC, Spencer D, Sherouse G, Jirtle R. Changes in plasma TGF β levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 671-676.
89. Raghu G, Masta S, Meyers D, Sampath Narayanan A. Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor-beta. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 95-100.
90. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor β (TGF β) causes a persistent increase in steady state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human fibroblast. *Biochem J* 1987; 247: 597-604.
91. Fine A, Goldstein RH. The effect of transforming growth factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1987; 262: 3897-3902.
92. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.

93. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β . *J Exp Med* 1987; 165: 251-256.
94. Burger A, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP. Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 401-408.
95. Hakenjos L, Bamberg M, Rodemann HP. TGF- β 1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 503-509.
96. Dorie MJ, Allison AC, Zaghloul MS, Kallmann RF. Interleukin 1 protects against the lethal effects of irradiation of mice but has no effect on tumors in the same animals. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 191, 23-29.
97. Dorie MJ, Bedarida G, Kallman-RF. Protection by interleukin-1 against lung toxicity caused by cyclophosphamide and irradiation. *Radiat Res* 1991; 128: 316-319.
98. Thornton SC, Por SB, Walsh BJ, Penny R, Breit SN. Interaction of immune and connective tissue cells: 1. The effect of lymphokines and monokines on fibroblast growth. *J Leukocyte Biol* 1990; 47: 312-320.
99. Elias JA, Reynolds MM. Interleukin-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate lung fibroblast interleukin-1 α production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3: 13-20.
100. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I. Interleukin-1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982; 128: 2177-2182.
101. Paul WE. Interleukin 4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77: 1859-1870.
102. Sempowski GD, Beckmann MP, Derdak S, Phipps RP. Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors: role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Immunol* 1994; 152: 3606-3614.
103. Granstein RD, Murphy GF, Margolis RJ, Byrne MH, Amento EP. Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in mouse. *J Clin Invest* 1987; 79: 1254-1258.
104. Goldring MB, Sandell LJ, Stephenson ML, Krane SM. Immune interferon suppresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in

- cultured human articular and costal chondrocytes. *J Biol Chem* 1986; 261: 9049-9055.
105. Giri SN, Hyde DM, Marafino BJ jr. Ameliorating effect of murine interferon gamma on bleomycin-induced lung collagen fibrosis in mice. *Biochem Med Metab Biol* 1986; 36: 194-197.
 106. Hyde DM, Henderson TS, Giri SN, Tyler NK, Stovall MY. Effect of murine gamma interferon on the cellular responses to bleomycin in mice. *Exp Lung Res* 1988; 14: 687.
 107. Rosiello RA, Merrill WW, Rockwell S, Carter D, Cooper jr. JAD, Care S, Amento EP. Radiation pneumonitis: bronchoalveolar lavage assessment and modulation by a recombinant cytokine. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1671-1676.
 108. Granstein RD, Deak MR, Jacques SL, Margolis RJ, Flotte TJ, Whitaker D, Long FH, Amento EP. The systemic administration of gamma interferon inhibits collagen synthesis and acute inflammation in a murine skin wounding model. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 18-27.
 109. Schollmeier K. Immunologic and pathophysiologic role of tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3: 11-12.
 110. Piguet PF. Is the 'tumor necrosis factor' the major effector of pulmonary fibrosis? *Eur Cytokine Netw* 1990; 1: 257-258.
 111. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-326.
 112. Debets JMH, Van der Linden CL, Spronken JEM, Buurman W. T-cell-mediated production of tumor necrosis factor alpha by monocytes. *Scand J Immunol* 1988; 27: 601.
 113. Hampson F, Monick M, Peterson MW, Hunninghake GW. Immune mediators increase adherence of T-lymphocytes to human lung fibroblasts. *Am J Physiol* 1989; 256: C336-C340.
 114. Yi ES, Williams ST, Lee-H, Malicki DM, Chin EM, Yin S, Tarpley J, Ulich TR. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol.* 1996; 149: 1963-1970.
 115. Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 1994, 93: 1298-1306.

116. Sugahara K, Rubin JS, Mason RJ, Aronsen EL, Shannon JM. Keratinocyte growth factor increases mRNAs for SP-A and SP-B in adult rat alveolar type II cells in culture. *Am J Physiol* 1995; 269: L344-L350.
117. Elias JA, Freundlich B, Kern JA, Rosenbloom J. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest* 1990; 97: 1439-1445.
118. Stryer L. *Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg* 1990. ISBN 3-89330-690-0, S. 65.
119. Steil R, Straube E, Thrum E, Wolfradt U. Anleitung zum formalen Aufbau einer Diplomarbeit und zur Erstellung eines Exposés vor Inangriffnahme einer Diplomarbeit (Version I, 19.02.1997). Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Psychologie, Abteilung Klinische Psychologie, Diagnostik und Intervention. www.uni-jena.de
120. Kroegel C, Häfner D, Walker C, Luttmann W, Matthys H, Virchow jr. JC. Immunpathogenese des allergischen Asthma bronchiale. *Dtsch med Wschr* 1995; 120: 10-17.
121. Rihs S, Walker C, Virchow JC jr., Boer C, Kroegel C, Giri SN, Braun RK. Differential expression of $\alpha^E\beta_7$ integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by $\alpha^4\beta_1$ -integrin crosslinking and TGF- β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 600-610.
122. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, deCrombrughe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 1987; 105: 1039-1045.
123. Goldsmith MA, Greene WC in: *The Cytokine Handbook*, 2nd ed., Thomson A. ed. Academic Press, New York, p. 57; 1994.
124. Hatakeyama M, Taniguchi T in: *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*, Sporn MB and Roberts AB eds., Springer Verlag, New York, p. 523; 1990.
125. Yi-Qing C, Bjermer L, Fröjd Ö, Nettelbladt O, Karlsson-Parra A, Henriksson R. Effects of IL-2 treatment on different compartments of the irradiated rat lung analysed by bronchoalveolar lavage and lung tissue morphology. *Eur Respir J* 1995; 8: 1872-1878.
126. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM, Steele RJC. Matrix metalloproteinases. *Brit J Surg* 1997; 84: 160-166.

127. Jeffrey JJ in: Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects. Diegelmann RF and Lindblad WJ, Eds.: 177-194, 1992.
128. Hirose T, Reife RA, Smith GN jr, Stevens RM, Mainardi CL, Hasty KA. Characterization of type V collagenase (gelatinase) in synovial fluid of patients with inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 1992; 19: 593-599.
129. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993; 7: 1434-1441.
130. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 99-106.
131. Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992; 29: 307-341.
132. Bai YH, Wang DW, Cui XM, Long JY, Cui CB, Jia CY, Song LW. Expression of transforming growth factor β in radiation interstitial pneumonitis. *J Envir Pathol Toxic Oncol* 1997; 16: 15-20.
133. Arbetter KR, Prakash UBS, Tazelaar HD, Douglas WW. Radiation-induced pneumonitis in the "nonirradiated" lung. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 27-36.
134. Roach M, Gandara DR, You HS, Swift PS, Kroll S, Shrieve DC, Wara WM, Margolis L, Phillips TL. Radiation pneumonitis following combined modality therapy for lung cancer: Analysis of prognostic factors. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2606-2612.
135. Kwa SLS, Theuws JCM, Wagenaar A, Damen EMF, Boersma LJ, Baas P, Muller SH, Lebesque JV. Evaluation of two dose-volume histogram reduction models for the prediction of radiation pneumonitis. *Radiotherapy and Oncology* 1998; 48: 61-69.
136. Kwa SLS, Lebesque JV, Theuws JCM, Marks LB, Munley MT, Bentel G, Oetzel D, Spahn U, Graham MV, Drzymala RE, Purdy JA, Lichter AS, Martel MK, Ten Haken RK. Radiation pneumonitis as a function of mean lung dose: An analysis of pooled data of 540 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42: 1-9.
137. Graham MV, Purdy JA, Emami B, Harms W, Bosch W, Lockett MA, Perez CA. Clinical dose-volume histogram analysis for pneumonitis after 3D

- treatment for non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45: 323-329.
138. Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ, Wesson M. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 109-122.
 139. Poulson JM, Vujaskovic Z, Gillette SM, Chaney EL, Gillette EL. Volume and dose-response effects for severe symptomatic pneumonitis after fractionated irradiation of canine lung. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 463-468.
 140. Marks LB, Fan M, Clough R, Munley M, Bentel G, Coleman ER, Jaszczak R, Hollis D, Anscher M. Radiation-induced pulmonary injury: symptomatic versus subclinical endpoints. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 469-475.
 141. Koga K, Kusumoto S, Watanabe K, Nishikawa K, Harada K, Ebihara H. Age, factor relevant to the development of radiation pneumonitis in radiotherapy of lung cancer ? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 14: 367-371.
 142. Beinert T, Mergenthaler HG, Possinger K. Bronchialkarzinome: Diagnostik, Therapie, Nachsorge. Schriftenreihe der Medizinischen Universitäts-Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie Charite, Campus Mitte, Humboldt Universität zu Berlin; 1. Auflage 1998.
 143. Kuller LH, Ockene JK, Meilahn E, Wentworth DN, Svendsen KH, Neaton JD. Cigarette smoking and mortality. MRFIT Research Group. *Prev Med* 1991; 20: 638-654.
 144. Devesa SS, Blot WJ, Stone BJ, Miller BA, Tarone RE, Fraumeni JF jr. Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 175-182.
 145. Garipagaoglu M, Munley MT, Hollis D, Poulson JM, Bentel GC, Sibley G, Anscher MS, Fan M, Jaszczak RJ, Coleman RE, Marks LB. The effect of patient-specific factors on radiation-induced regional lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45: 331-338.
 146. Rubin O, Casarett GW. *Clinical radiation pathology*. Philadelphia; WB Saunders 1968: 423-470.
 147. Tarbell NJ, Thompson L, Mauch P. Thoracic irradiation in Hodgkin' s disease: disease control and long-term complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18: 275-281.

148. Nilsson K, Hendriksson R, Hellström S, Tengblad A, Bjermer L. Hyaluronan reflects the pre-fibrotic inflammation in irradiated rat lung: concomitant analysis of parenchymal tissues and bronchoalveolar lavage. *Int J Radiat Biol* 1990; 58: 519-530.
149. Lafitte JJ, Guiselin M, Gosselin B, Aerts A, Tonnel AB, Voisin C. Diagnostic and predictive value of bronchoalveolar lavage (BAL) in lung injury after radiotherapy. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: A287.
150. Gross NJ. Alveolar macrophage numbers: An index of the effect of radiation on the lungs. *Radiat Res* 1977; 72: 325-332.
151. Brandes ME, Finkelstein JN. Stimulated rabbit alveolar macrophages secrete a growth factor for type II pneumocytes. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1989; 1: 101-109.
152. Westermann W, Schöbl R, Rieber EP, Frank KH. Th2 cells as effectors in postirradiation pulmonary damage preceding fibrosis in the rat. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 629-638.
153. Hemler ME, Jacobson JG, Brenner MB, Mann D, Strominger JL. VLA-1: a T cell surface antigen which defines a novel late stage of human T cell activation. *Eur J Immunol* 1985; 15: 502-508.
154. Erle DJ, Pabst R. Intraepithelial lymphocytes in the lung - a neglected lymphocyte population. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 398-400.
155. Schoen MP, Arya A, Murphy EA, Adams CM, Strauch UG, Agace WW, Marsal J, Donohue JP, Her H, Beier DR, Olson S, Lefrancois L, Brenner MB, Grusby MJ, Parker CM. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 1999; 162: 6641-6649.
156. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russel GJ, Morrow JS, Rimm DL, Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 1994; 372: 190-193.
157. Erle DJ, Brown T, Christian D, Aris R. Lung epithelial lining fluid T cell subsets defined by distinct patterns of $\beta 7$ and $\beta 1$ integrin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 237-244.
158. Braun RK, Grahmann PR, Foerster M, Haefner D, Workalemahu G, Kroegel C. Phenotypic and molecular characterization of $\alpha^E\beta 7$ positive CD4+ T cells

in bronchoalveolar lavage from patients with interstitial lung diseases.
(submitted)

159. Ludviksson BR, Strober W, Nishikomori R, Hasan SK, Ehrhardt RO. Administration of mAb against $\alpha^E\beta_7$ prevents and ameliorates immunization-induced colitis in IL-2-/-mice. *J Immunol* 1999; 162: 4975-4982.
160. Schön MP, Schön M, Warren HB, Donohue JP, Parker CM. Cutaneous inflammatory disorder in integrin α^E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165: 6583-6589.
161. Cox G, Gauldie J. Structure and function of interleukin-6. In: Kunkel SL, Remick DG. *Cytokines in health and disease*. New York: Marcel Dekker 1992: 97-120.
162. Wong CG, Clark SC. Multiple actions of interleukin-6 within a cytokine network *Immunology Today* 1988; 9: 137-139.
163. Beetz A, Messer G, Oppel T, van Beuningen D, Peter RU, Kind P. Induction of interleukin 6 by ionizing radiation in a human epithel cell line: control by corticosteroids. *Int J Radiat Biol* 1997; 72: 33-43.
164. Tartakovsky B, Goldstein O, Krautghamer R, Haran-Ghera N. Low doses of radiation induce systemic production of cytokines: possible contributions to leukemogenesis. *Int J Cancer* 1993; 55: 269-274.
165. Neta R, Vogel SN, Sipe JD, Wong GG, Nordan RP. Comparison of in vivo effects of human recombinant IL-1 and human recombinant IL-6 in mice. *Lymphokine Res* 1988; 7: 403-412.
166. Peter RU, Gottlöber P, Nadeshina N, Krähn G, Braun-Falco O, Plewig G. Interferon gamma in survivors of the Chernobyl power plant accident: new therapeutic option for radiation-induced fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45: 147-152.
167. Neta R, Oppenheim JJ. Cytokines in therapy of radiation injury. *Blood* 1988; 72: 1093-1095.
168. Vujaskovic Z, Groen HJM. TGF- β , radiation-induced pulmonary injury and lung cancer. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 511-516.
169. Anscher MS, Kong FM, Andrews K, Clough R, Marks LB, Bentel G, Jirtle RL. Plasma transforming growth factor β 1 as a predictor of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 1029-1035.

170. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261: 4337-4345.
171. Kelley J, Shull S, Walsh JJ, Cutroneo KR, Absher M. Auto-induction of transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 417-424.
172. Pelton RW, Moses HL. The beta-type transforming growth factor. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: S31-S35.
173. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJD, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin $\alpha\text{v}\beta 6$ binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96: 319-328.
174. Gauldie J, Manel Jordana M, Cox G. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax* 1993; 48: 931-935.
175. Rube CE, Uthe D, Schmid KW, Richter KD, Wessel J, Schuck A, Willich N, Rube C. Dose-dependent induction of transforming growth factor β (TGF β) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47: 1033-1042.
176. Neta R, Oppenheim JJ. Radioprotection with cytokines - learning from nature to cope with radiation damage. *Cancer Cells* 1991; 3: 391-396.
177. Paulsson Y, Austgulen R, Hofslie E, Heldin CH, Westermark B, Nissen-Meyer J. Tumor necrosis factor-induced expression of platelet-derived growth factor A-chain messenger RNA in fibroblasts. *Exp Cell Res* 1989; 180: 490-496.
178. Ferry G, Lonchampt M, Pennel L, de Nanteuil G, Canet E, Tucker GC. Activation of MMP-9 by neutrophil elastase in an in vivo model of acute lung injury. *FEBS Letters* 1997; 402: 111-115.
179. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992; 267: 3581-3584.
180. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 197-250.

181. Okamoto T, Akaike T, Suga M, Tanase S, Horie H, Miyajima S, Ando M, Ichinose Y, Maeda I. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J Biol Chem* 1997; 272: 6059-6066.
182. Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, Fujimoto N, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 602-611.
183. Cullen B, Silcock D, Brown LJ, Gosiewska A, Geesin JC. The differential regulation and secretion of proteinases from fetal and neonatal fibroblasts by growth factors. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 241-250.
184. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989; 264: 17213-17221.
185. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J* 1993; 296: 803-809.
186. Maeda A, Sobel RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 300-309.
187. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987; 6: 1899-1904.
188. Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka K, Seiki M. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 1992; 7: 77-83.
189. Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 1993; 8: 395-405.
190. American Thoracic Society. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 481-486.

191. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 250-263.
192. Melder RJ, Walker E, Herbermann RB, Whiteside TL. Adhesion characteristics of human interleukin 2-activated natural killer cells. *Cell Immunol* 1991; 132: 177-192.
193. Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, Basset F, Bittermann PB, Crystal RG. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 650-658.
194. Wahl SM, Wahl LM, McCarthy JB. Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. *J Immunol* 1978; 121: 942-946.
195. Herrmann T, Knorr A. Die radiogene Lungenreaktion. *Strahlenther Onkol* 1995; 171: 490-498.
196. Yin D, Fathman CG. Induction of tolerance to heart allografts in high responder rats by combining anti-CD4 with CTLA4Ig. *J Immunol* 1995; 155: 1655-1659.
197. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 1989; 170: 655-663.
198. Sharma SK, MacLean JA, Pinto C, Kradin RL. The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 193-200.
199. Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA. Effect of antibody to transforming growth factor β on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 1993; 48: 959-966.
200. Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol* 1994; 32: 12-20.
201. Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ, Tricaud Y, Martin M, Nimrod A, Baillet F, Daburon F. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 35: 305-312.

202. Martin M; Lefaix JL, Delanian S. TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47: 277-290.
203. Haefner D, Foerster M, Hengst U, Reißig A, Mock B, Machnik A, Henzgen M, Grahmann PR, Braun RK, Kroegel C. Immunmodulatorische Behandlung des schweren Kortikosteroid-abhängigen Asthma bronchiale und des Churg-Strauss-Syndroms mit Interferon. *Klinischer Verlauf. Pneumologie* 2001; 55: S71.
204. Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, McLoughlin M, Ehleiter D, Schwartz JL, Seddon AP, Cordon-Cardo C, Haimovitz-Friedmann A. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 1994; 54: 2582-2590.
205. Haimovitz-Friedmann A, Vlodaysky I, Chaudhuri A, Witte L, Fuks Z. Autocrine effects of fibroblast growth factor in radiation damage repair in endothelial cells. *Cancer Res.* 1991; 51: 2552-2558.
206. Neta R, Douches S, Oppenheim JJ. Interleukin 1 is a radioprotektor. *J Immunol* 1986; 136: 2483-2485.
207. Neta R, Oppenheim JJ, Schreiber RD, Chizzonite R, Ledney GD, MacVittie TJ. Role of cytokines (interleukin 1, tumor necrosis factor and transforming growth factor β) in natural and lipopolysaccharide-enhanced radioresistance. *J Exp Med* 1991; 173: 1177-1182.
208. Wahl SM, Wahl LM. Modulation of fibroblast growth and function by monokines and lymphokines. *Lymphokines* 1981; 2: 179-201.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Radiologische strahleninduzierte Pneumonitis mit folgender Fibrose nach Bestrahlung eines mediastinalen Lymphoms [15].
- Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Untersuchungen und Behandlung der Patienten.
- Abbildung 3: Dreidimensionale Bestrahlungsplanung mit CT-gestützter Definition des klinischen Zielvolumens und Darstellung der Isodosen.
- Abbildung 4: Schematische Darstellung eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), modifiziert nach [118].
- Abbildung 5: Differentialzytologie der BAL-Zellen bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.
- Abbildung 6: Relative Anteile CD4⁺- und CD8⁺- Zellen an CD3⁺-T-Lymphozyten sowie deren Verhältnis in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.
- Abbildung 7: Relativer Anteil CD103⁺- an CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.
- Abbildung 8: Konzentrationen von IL-4, IL-6 und IFN- γ in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.
- Abbildung 9: Konzentration von TGF- β 1 in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.
- Abbildung 10: Konzentration von IL-2 in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.
- Abbildung 11: Konzentration von MMP-9 in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.

- Abbildung 12: Analyse der Aminosäure Hydroxyprolin in der BAL-Flüssigkeit mittels reversed phase HPLC.
- Abbildung 13: Konzentration von Hydroxyprolin in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung.
- Abbildung 14: Dosis-Volumen Histogramme mit der Dosisverteilung beider Einzellungen.
- Abbildung 15: Schematische Darstellung möglicher Pathogenesemechanismen der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose, wie sie nach den hier vorgestellten Ergebnissen ablaufen könnten (Erklärung im Text).

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientencharakteristik

Tabelle 2: Zusammenfassung der Dosisgruppen als Basis der statistischen Analyse

Tabelle 3: Rückgewonnenes BAL-Flüssigkeitsvolumen und Gesamtzellzahl bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung

Tabelle 4: Relativer Anteil der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR an CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in der BAL-Flüssigkeit bei Patienten mit und ohne strahleninduzierte Pneumonitis vor und 3 - 4 Monate nach Bestrahlung

Tabelle 5: Vermutete Dosissschwellen für die Freisetzungsaktivität der Zytokine bei Patienten mit strahleninduzierter Pneumonitis

Tabelle 6: Evaluierte Parameter bezüglich der Entstehung einer strahleninduzierten Pneumonitis

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß
mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-
Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel,
persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der
Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C.
Kroegel und Dr. rer. nat. R. Braun,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß
Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten
erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten
Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere
wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung
nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 04.11.2002

Unterschrift des Verfassers

Lebenslauf

Lisbeth Almuth Klippstein, geb. Dunkel
geb. am 31.08.1974 in Bad Langensalza

Schulbildung

Sept. 1981 - Juli 1990 "Geschwister-Scholl" - Oberschule Dachwig

Sept. 1990 - Juni 1993 "Königin-Luise" - Gymnasium Erfurt

Juni 1993 Abitur

Studium der Humanmedizin

Okt. 1993 Immatrikulation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Sept. 1995 Ärztliche Vorprüfung

Aug. 1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

März 2000 1. Posterpreis zum 41. Kongreß der DGP, Hamburg
"Strahleninduzierte immunologische Veränderungen in den
Atemwegen bei Patienten mit Bronchialkarzinomen"

Mai 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

Juli 2000 - März 2001 ÄiP in Klinik für Innere Medizin IV der FSU Jena:

Pneumologie & Allergologie/Immunologie

Juli 2001 - März 2002 ÄiP in Klinik für Innere Medizin II der FSU Jena: Onkologie-

Hämatologie-Endokrinologie-Stoffwechselerkrankungen

seit April 2002 Assistenzärztin in Klinik für Innere Medizin II der FSU Jena:

Onkologie-Hämatologie-Endokrinologie-Stoffwechsel-
erkrankungen

Jena, den 04.11.2002

(Unterschrift)