

Aus der Klinik für Strahlentherapie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Ch. Rube

**Die prognostische Bedeutung des TGF-beta1 Plasmaspiegels  
für die radiogene Pneumonitis und das Tumoransprechen  
bei der Radiotherapie des Bronchialkarzinoms**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**  
**2007**

vorgelegt von: Daniela Rosa Gompelmann  
geb. am: 26.02.1982 in Prüm

## Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	5
2.1	Das Bronchialkarzinom	6
2.1.1	Epidemiologie	6
2.1.2	Ätiologie	7
2.1.3	Pathogenese	8
2.1.4	Klassifikation	8
2.1.5	Klinik	13
2.1.6	Diagnostik	14
2.1.7	Therapie	16
2.2	Radiotherapie	20
2.2.1	Durchführung der Radiotherapie bei Bronchialkarzinomen	20
2.2.2	Strahlenwirkung auf Normalgewebe – Nebenwirkungen der Radiatio	24
2.3	TGF-beta	27
2.3.1	TGF-beta induzierte Signaltransduktion	28
2.3.2	Wirkung von TGF-beta auf Zellen	29
2.4	Potentielle Korrelation	32
2.4.1	zwischen TGF-beta1 und der Inzidenz der strahleninduzierten Pneumonitis	32
2.4.2	zwischen TGF-beta1 und Tumorprogression bzw. -remission	35
3.	Material und Methodik	37
3.1	Einschlusskriterien	37
3.2	Behandlung	37
3.3	Evaluation der Pneumonitis	39
3.4	Evaluation der Tumorprogression bzw. -remission	41
3.5	Probengewinnung	41
3.6	TGF-beta1 Bestimmung mittels ELISA	42
3.7	Statistische Auswertung	44
3.8	Immunhistochemischer Nachweis von TGF-beta1 in Tumorbiopsien	44
4.	Ergebnisse	46
4.1	Patienten-Charakteristika	46

4.2	TGF-beta1 – kein prädiktiver Wert für eine radiogene Pneumonitis	48
4.3	TGF-beta1 – ein potentieller Tumormarker	52
4.3.1	Immunhistochemischer Nachweis der TGF-beta1 Produktion durch Tumorzellen	52
4.3.2	Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegels mit dem Tumoransprechen nach der Radiotherapie	55
5.	Diskussion	56
5.1	Kritische Stellungnahme zur Klassifikation der radiogenen Pneumonitis	56
5.2	Vergleich der Resultate mit anderen Studien	57
5.2.1	bezüglich der Korrelation von TGF-beta1 und der radiogenen Pneumonitis	57
5.2.2	bezüglich der Korrelation von TGF-beta1 und der Tumorerkrankung	60
5.3	Kritische Stellungnahme zur Verwendung von TGF-beta1 als Tumormarker	62
5.4	Schlussfolgerung	65
6.	Verzeichnis der Abbildungen und Diagramme	66
7.	Literaturverzeichnis	68
8.	Publikationen/Dank	77
9.	Lebenslauf	79

## **1. Zusammenfassung**

### **Die prognostische Bedeutung des TGF-beta1 Plasmaspiegels bezüglich einer radiogenen Pneumonitis und des Tumoransprechens bei der Radiotherapie des Bronchialkarzinoms**

#### Einleitung:

In einer prospektiven klinischen Studie wurde die prognostische Bedeutung des TGF-beta1 Plasmaspiegels hinsichtlich der radiogenen Pneumonitis und hinsichtlich des Tumoransprechens bei Patienten untersucht, die aufgrund eines fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) eine Radio (-Chemo) therapie erhielten.

#### Methoden:

Die TGF-beta1 Plasmaspiegel wurden vor Beginn, wöchentlich während der Radiotherapie und 1 Monat nach der Radiotherapie und im weiteren Verlauf alle 3 Monate nach der Radiatio, als auch zum Zeitpunkt einer klinischen symptomatischen radiogenen Pneumonitis und/oder bei Tumorprogress mittels ELISA bestimmt. Die Tumorbiopsien dieser Patienten wurden immunhistochemisch für TGF-beta1 gefärbt und die TGF-beta Immunreaktivität wurde quantifiziert (Grad 1-4). Die Endpunkte dieser klinischen Untersuchung waren das Auftreten einer radiogenen Pneumonitis (RTOG/EORTC-Klassifikation) und das durch Thorax-CT-Untersuchungen erhobene Therapieansprechen der Tumorerkrankung (WHO-Kriterien). 52 Patienten mit einer für die TGF-beta1 Immunhistologie verfügbaren Tumorbiopsien und einer Verlaufsbeobachtung von mindestens 6 Monaten nach der Radiotherapie konnten im Rahmen dieser klinischen Studie ausgewertet werden.

### Ergebnisse:

21 von 51 Patienten (41,2 %) entwickelten eine klinisch symptomatische radiogene Pneumonitis: Grad I: 11 (21,6 %), Grad II: 3 (5,9 %), Grad III: 6 (11,8 %) und Grad IV: 1 (1,9 %). Die während der Radiotherapie gemessenen TGF-beta1 Plasmaspiegel waren bei allen Patienten erhöht. Die vor Beginn und während der Radiotherapie gemessene TGF-beta1 Konzentration korrelierte nicht mit dem Auftreten einer radiogenen Pneumonitis. Die prätherapeutischen TGF-beta1 Plasmaspiegel waren bei 90,4 % der Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC erhöht und korrelierten signifikant mit der TGF-beta1 Expression im Tumorgewebe. Die während und nach der Radiotherapie gemessenen TGF-beta1 Plasmaspiegel korrelierten signifikant mit dem Therapieansprechen.

### Schlussfolgerung:

Unsere Ergebnisse bestätigen nicht, dass während der Radiotherapie gemessene TGF-beta1 Plasmaspiegel eine prognostische Bedeutung für die radiogene Pneumonitis besitzen. Die gute Korrelation der TGF-beta1 Plasmaspiegel mit der TGF-beta1 Expression im Tumorgewebe und mit dem Tumoransprechen deutet darauf hin, dass die TGF-beta1 Plasmaspiegel bei Patienten mit NSCLC in hohem Maße durch die TGF-beta1 Expression im Tumorgewebe bestimmt werden.

## **1. Summary**

### **The prognostic significance of TGF-beta1 plasma level in predicting radiation pneumonitis and tumor response in patients irradiated for lung cancer**

#### Purpose:

The purpose of this prospective study was to investigate the prognostic value of Transforming-Growth-Factor-beta1 (TGF-beta1) plasma levels in predicting radiation pneumonitis and tumor response in patients irradiated for locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).

#### Material and Methods:

The TGF-beta1 plasma levels were investigated (ELISA) before, weekly during radiotherapy, 1 month after radiotherapy (RT) and subsequently in 3 months intervals, as well as the onset of symptomatic radiation pneumonitis and/or of tumor progression. The tumor biopsies of these patients were immunohistochemically stained for TGF-beta1 and the TGF-beta1 immunoreactivity was quantified (grade 1-4). The endpoints of the study were symptomatic radiation pneumonitis (RTOG/EORTC scale) and the tumor response (WHO criteria) assessed by chest CT during follow-up. 52 patients with archived tumor biopsies available for TGF-beta1 analysis and with a minimum follow-up of 6 months after radiotherapy were evaluable for this study.

### Results:

21 of 51 patients (41,2 %) developed symptomatic radiation pneumonitis: grade I: 11 (21,6 %), grade II: 3 (5,9 %), grade III: 6 (11,8 %) and grade IV: 1 (1,9 %). The TGF-beta1 plasma levels measured during radiotherapy were elevated in all patients. The pre-RT TGF-beta1 plasma levels and the TGF-beta1 plasma levels during RT did not correlate with the incidence of radiation pneumonitis. The pre-RT TGF-beta1 plasma levels were elevated in 90,4 % of the patients with advanced NSCLC and correlate significantly with the TGF-beta1 production in the tumor. During radiotherapy, TGF-beta1 plasma levels declined, indicating tumor response, varied or even increased indicating treatment failure. The TGF-beta1 plasma levels after radiotherapy were significantly associated with the tumor response after treatment.

### Conclusions:

The results of our study did not confirm that TGF-beta1 levels measured during radiotherapy may predict radiation pneumonitis. The clear correlation between the TGF-beta plasma levels and the TGF-beta1 production in the tumor, as well as with the tumor response after treatment indicate that the tumor is the major source of circulating TGF-beta1 in patients receiving radiotherapy for advanced NSCLC.

## 2. Einleitung

Bei der Behandlung des Bronchialkarzinoms ist die Radiotherapie, sowohl in kurativer als auch in palliativer Intention, von großer Bedeutung. Allerdings ist es unumgänglich, gesundes Lungengewebe mit einer bedeutenden Strahlendosis zu erfassen. Dadurch wird die zu applizierende Gesamtdosis durch die geringe Strahlentoleranz des umliegenden Lungengewebes limitiert.

Allerdings besteht zwischen den einzelnen Patienten eine große Variabilität hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit, so dass die individuelle Reaktion auf die bei der Radiotherapie applizierte Gesamtdosis nicht sicher vorhersehbar ist. Bisher existieren keine Untersuchungsmethoden, mit denen sich die individuelle Strahlenempfindlichkeit der Patienten und somit das Risiko einer radiogenen Pneumonitis vorhersagen lässt. Die strahleninduzierte Lungenschädigung, die sich in der Frühphase als Pneumonitis und in der Spätphase als Lungenfibrose manifestiert, ist ein multizellulärer Prozess, bei dem, wie in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien gezeigt werden konnte, Zytokine als wichtige Signalmoleküle der interzellulären Kommunikation beteiligt sind. Es ist von besonderer klinischer Bedeutung, inwieweit sich eine strahleninduzierte lokale TGF-beta Produktion im normalen Lungengewebe in einem erhöhten Zytokinpiegel im Blut widerspiegelt und möglicherweise die Entwicklung einer radiogenen Lungenschädigung vorherzusagen erlaubt. Eine weitere mögliche Ursache erhöhter Zytokinplasmaspiegel bei onkologischen Patienten ist die Sekretion von Zytokinen in die Blutzirkulation durch Tumorgewebe.

Das Ziel dieser prospektiven klinischen Studie ist es, bei Patienten, die aufgrund eines Bronchialkarzinoms eine Radiotherapie erhalten, die prognostische Bedeutung von Zytokinpiegeln im Blut unter der Berücksichtigung einer möglichen Zytokinproduktion im Tumorgewebe für die Entwicklung einer radiogenen Lungenschädigung zu untersuchen. Dadurch könnte eine genauere

Therapiemodalität auf die individuelle Prädisposition des einzelnen Patienten ermöglicht werden.

Die zweite Zielsetzung dieser klinischen Studie ist die Untersuchung der prognostischen Bedeutung des TGF-beta1 Plasmaspiegels bezüglich des Tumoransprechens nach der Radiotherapie. Klinische Untersuchungen zeigten eine Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegels mit dem Tumoransprechen auf die Therapie (Kong, F. M. *et al.*, 1996). Dies würde die Verwendung von TGF-beta1 als Tumormarker erlauben und somit anhand des TGF-beta1 Plasmaspiegels die Verlaufskontrolle der malignen Tumorerkrankung ermöglichen.

## **2.1 Das Bronchialkarzinom**

Das Bronchialkarzinom ist ein bösartiger Lungentumor, der vom Epithel der Trachea, der Bronchien und des Lungenparenchyms ausgeht.

### 2.1.1 Epidemiologie

25 % aller Malignome sind Bronchialkarzinome. Die Inzidenz beträgt 60/100.000/Jahr in Mitteleuropa. Das Verhältnis von Mann : Frau beträgt 3:1, wobei das Bronchialkarzinom in der männlichen Bevölkerung die häufigste Krebstodesursache darstellt (Herold, G. *et al.*, 2005). Seit den 80er Jahren ist jedoch bei den Männern eine Abnahme der Mortalitätsrate zu verzeichnen, bei den Frauen hingegen aufgrund des zunehmenden Nikotinkonsums eine ansteigende Inzidenz. In der USA steht das Bronchialkarzinom auch bei der weiblichen Bevölkerung bereits an erster Stelle der Krebstodesfälle. Allerdings

ist auch hier ein positiver Trend in der Lungenkrebsmortalitätsrate zu beobachten: Seit den 90er Jahren konnte der Anstieg der Mortalitätsrate der Frauen im Vergleich zum Anstieg der vorherigen Dekade abgebremst werden (Ärzte Zeitung, 13.07.2005).

### 2.1.2 Ätiologie

An erster Stelle der karzinogen wirkenden Faktoren steht der Nikotinabusus, wobei Dauer und Ausmaß des Zigarettenkonsums das Risiko bestimmen. Für 85 % der Bronchialkarzinome ist eine aktive Zigaretteninhalation verantwortlich (Herold, G. *et al.*, 2005). Ob ebenso Passivrauchen das Lungenkrebsrisiko erhöht, ist heute umstritten. Das relative Risiko, durch Passivrauchen an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, weist bei vielen weiteren wissenschaftlichen Studien eine große Schwankungsbreite auf, so dass bisher keine sicheren statistischen Aussagen formuliert werden konnten.

Neben der Zigaretteninhalation sind berufliche Karzinogene, wie Asbest, Arsen, Nickel, Chrom, Quarzstaub etc., sowie umweltbedingte Karzinogene, wie Industrie- und Verkehrsabgase, die sogenannten urbanen Faktoren, für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms verantwortlich.

Als weiterer Risikofaktor ist die genetische Disposition zu nennen. Das Risiko, an einem Bronchialkarzinom zu erkranken, ist um das 2-3fache erhöht, wenn ein Elternteil an Lungenkrebs erkrankt ist.

### 2.1.3 Pathogenese

Bei der Entstehung des Bronchialkarzinoms wird ein Mehrstufenkonzept beschrieben (Herold, G. *et al.*, 2005). Laut diesem Konzept führen karzinogen wirkende Faktoren zu genetischen Schäden, die Epitheldysplasien zur Folge haben. Daraus entwickelt sich schließlich ein Carcinoma in situ. Ist die Basalmembran durchbrochen, liegt ein invasives Karzinom vor. Die Entstehung von einem invasivem Karzinom beansprucht eine Latenzzeit von circa 30 Jahren.

### 2.1.4 Klassifikation

Es gibt mehrere Möglichkeiten, das Bronchialkarzinom zu klassifizieren:

- Histologie

Aus therapeutischen und prognostischen Gesichtspunkten unterscheidet man zwischen:

- kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC) und
- nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC).

Dazu zählen:

- Plattenepithelkarzinom (PEC)
- Adenokarzinom (AC)
- großzelliges Karzinom

u. a.

Das kleinzellige Bronchialkarzinom, auch als SCLC (small cell lung cancer) bezeichnet, macht 25 % aller Bronchialkarzinome aus. Aufgrund seines schnellen Wachstums mit einer Tumorverdopplungszeit von nur 50 Tagen und seiner frühzeitigen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung, hat

das SCLC die schlechteste Prognose unter allen bösartigen Lungentumoren. In 80 % der Fälle liegt bereits bei Diagnosestellung eine Metastasierung vor. Von den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (non small cell lung cancer, NSCLC) kommt das Plattenepithelkarzinom mit einem Anteil von 40 – 45 % am häufigsten vor. Im Vergleich zum kleinzelligen Bronchialkarzinom wächst das Plattenepithelkarzinom mit einer Verdopplungszeit von 300 Tagen wesentlich langsamer.

Das Adenokarzinom, welches die häufigste Tumorentität bei Nichtrauchern ist und vorwiegend bei Frauen auftritt, ist durch eine periphere Lage und insgesamt langsames Wachstum charakterisiert. Allerdings werden oft frühzeitig Gefäßinvasion und damit hämatogene Metastasen beobachtet.

Eine seltene Sonderform des Adenokarzinoms ist das bronchioloalveoläre Karzinom, welches häufig multilokulär auftritt.

Das großzellige Bronchialkarzinom, mit nur einem Anteil von 10 % aller NSCLC, ist durch eine frühzeitige lymphogene sowie hämatogene Metastasierung gekennzeichnet.

- Lage

Man unterscheidet:

- zentral
- peripher
- diffus

80 % der Bronchialkarzinome, v. a. das SCLC und das PEC, treten zentral, d. h. hilusnah auf und nur 20 %, insbesondere das Adenokarzinom, treten in der Peripherie auf.

- Stadieneinteilung

Die Tumorausbreitung stellt neben dem histopathologischen Typ, dem Leistungsindex nach Karnofsky und der aktuellen Lungenfunktion des Patienten den wichtigsten prognosebestimmenden Parameter dar.

Für das Bronchialkarzinom gilt die 5. Auflage der von der UICC (Union contre le cancer) definierten TNM-Klassifikation, 1997:

### Primärtumor (T)

T <sub>x</sub>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T <sub>0</sub>	Kein Anhalt für Primärtumor
T <sub>is</sub>	Carcinoma in situ
T <sub>1</sub>	Tumor 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T <sub>2</sub>	Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumor mit mehr als 3 cm in größter Ausdehnung</li> <li>- Tumor mit Befall des Hauptbronchus, 2 cm oder weiter distal der Karina</li> <li>- Tumor infiltriert viszerale Pleura</li> <li>- Assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, aber nicht der gesamten Lunge</li> </ul>
T <sub>3</sub>	Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration folgender Strukturen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Brustwand (einschließlich Tumoren des Sulcus superior)</li> <li>- Zwerchfell</li> <li>- Mediastinale Pleura</li> <li>- Perikard</li> </ul> oder Tumor im Hauptbronchus weniger als 2 cm distal der Karina, aber Karina selbst nicht befallen oder Tumor mit Atelektase oder obstruktiver Entzündung der gesamten Lunge
T <sub>4</sub>	Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mediastinum</li> <li>- Herz</li> <li>- große Gefäße</li> <li>- Trachea</li> <li>- Ösophagus</li> <li>- Wirbelkörper</li> <li>- Karina</li> </ul> oder Tumor mit malignem Pleuraerguss oder mit Metastasen im ipsilateralen Tumortalappen der Lunge

### Regionäre Lymphknoten (N)

N <sub>x</sub>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden.
N <sub>0</sub>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N <sub>1</sub>	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen Lymphknoten u./o. in ipsilateralen Hiluslymphknoten
N <sub>2</sub>	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen u. /o. subkarinalen Lymphknoten
N <sub>3</sub>	Metastasen in kontralateralen mediastinalen Hilus-, ipsi- oder kontralaterlateralen Skalenus u./o. supraklavikuläre Lymphknoten

### Fernmetastasen (M)

M <sub>x</sub>	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden.
M <sub>0</sub>	Keine Fernmetastasen
M <sub>1</sub>	Fernmetastasen, einschließlich vom Primärtumor getrennte Tumorherde in einem anderen Lungenlappen

5. Auflage der TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms, 1997

Für die Therapie und Prognose ist folgende Stadieneinteilung nach der UICC von großer Bedeutung:

Stadium 0		T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium I	Stadium I A	T <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	Stadium I B	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium II	Stadium II A	T <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
	Stadium II B	T <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>1</sub>
		T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Stadium III	Stadium III A	T <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
		T <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
		T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
		T <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	Stadium III B	jedes T	N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>
		T <sub>4</sub>	jedes N	M <sub>0</sub>
Stadium IV		jedes T	jedes N	M <sub>1</sub>

Wittekind CH., Wagner G (Hrsg) für die UICC (1997) TNM-Klassifikation maligner Tumoren, Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Da bei der Diagnosestellung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms bereits in den meisten Fällen eine Fernmetastasierung vorliegt, wird eine vereinfachte Stadieneinteilung nach der Marburger Klassifikation vorgenommen:

Very Limited Disease (VLD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primärtumor von Lungengewebe oder viszeraler Pleura umgeben mit maximal partieller Atelektase</li> <li>- Kleiner Winkelerguss ohne maligne Zellen</li> <li>- Lymphknotenbefall hilär ipsilateral</li> </ul>
Limited Disease (LD)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primärtumor mit Thoraxwand-, mediastinaler Pleura-, oder Diaphragmainfiltration</li> <li>- Totalatektase einer Lunge</li> <li>- Lymphknotenbefall mediastinal ipsi- oder kontralateral sowie kontralateral hilär</li> </ul>
Extensive Disease I (ED I)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primärtumor mit Herz-, Ösophagus- oder Wirbelsäuleninfiltration</li> <li>- Maligner Perikarderguss</li> <li>- Rekurrens-, Phrenikusparese</li> <li>- Vena-cava-superior-Syndrom</li> <li>- Lymphknotenbefall supraklavikulär ipsi- oder kontralateral</li> </ul>
Extensive Disease II a (ED II a)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hämatogene Fernmetastasierung in einem Organ einschließlich kontralateralem Lungenbefall</li> </ul>
Extensive Disease II b (ED II b)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hämatogene Fernmetastasierung in mehr als einem Organ</li> </ul>

AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften): Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft: Therapie des kleinzelligen Lungenkarzinoms, Januar 2004

### 2.1.5 Klinik

Im Frühstadium ruft das Bronchialkarzinom keine krankheitsspezifischen Symptome hervor. Bei Symptomen wie Husten, atemabhängiger Thoraxschmerz, Dyspnoe, Hämoptysen, rezidivierende Pneumonien und Gewichtsverlust muss das Bronchialkarzinom jedoch differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen werden. Krankheitsspezifische Merkmale treten meist erst dann auf, wenn der Tumor Nachbarorgane infiltriert hat. Zu diesen Symptomen

zählen Heiserkeit durch Rekurrensparese, Horner-Symptomenkomplex durch Infiltration des Ganglion stellatum, ipsilateraler Zwerchfellhochstand durch eine N. phrenicus-Parese und Schmerzen durch Knochendestruktion oder Plexusinfiltration. Weiterhin kann bei Tumordinfiltration des Mediastinums das Vena-cava-superior-Syndrom beobachtet werden, welches eine Akutsituation darstellt und bei der gelegentlich eine Radiotherapie mit einer erhöhten Einzeldosis über ventrodorsale Stehfelder indiziert ist.

Bei 10 % aller intrathorakalen Tumoren, v. a. beim kleinzelligen Bronchiakarzinom, welches oftmals aus hormonbildenden Zellen besteht, treten zusätzlich paraneoplastische Syndrome auf. Dadurch kann sich das SCLC auch durch Endokrinopathien wie das Cushing-Syndrom, Neuropathien, Myopathien, Thrombozytosen und selten auch durch das Pierre-Marie-Bamberger-Syndrom mit hypertrophen pulmonalen Osteoarthropathien manifestieren.

#### 2.1.6 Diagnostik

Bei der Anamnese wird neben der typischen Symptomatik der Karnofsky-Index sowie der prätherapeutische Gewichtsverlust erhoben. Im Rahmen der sich anschließenden klinischen Untersuchung ohne apparative Hilfsmittel können Manifestationen wie Lymphknotenmetastasen, Pleuraerguss, Pneumonien, Vena-cava-superior-Syndrom oder auch Folgen eines paraneoplastischen Syndroms diagnostiziert werden. Laborchemisch werden neben den Basisparametern die Tumormarker erhoben, die allerdings aufgrund der geringen Sensitivität mit nur 50 % als Suchtest nicht geeignet sind, sondern der Verlaufskontrolle, insbesondere bei den Nachsorgeuntersuchungen, dienen. Beim SCLC ist die neuronspezifische Enolase (NSE) und beim NSCLC CYFRA 21-1 Tumormarker erster Wahl.

Zur Lokalisierung des Bronchialkarzinoms dienen ein Röntgen-Thorax in 2 Ebenen und eine Computertomographie des Thorax einschließlich des Oberbauches zur Erhebung von eventuell vorhandenen Leber- und Nebennierenmetastasen. Die bioptisch-histologische Diagnose, die in jedem Fall anzustreben ist und v. a. für die Therapieentscheidung von großer Bedeutung ist, erfolgt in der Regel durch eine Bronchoskopie. Durch Autofluoreszenz-Bronchoskopie kann die bronchoskopische Identifikation kanzeröser Gewebe weiterhin verbessert werden. Ergibt die Bronchoskopie keinen richtungsweisenden Befund, kann durch eine perthorakale Feinnadelpunktion, eine videoassistierte Thorakoskopie oder eine Mediastinoskopie die histologische Diagnose gesichert werden. Weiterhin können mediastinale Lymphknoten durch eine endosonographisch gesteuerte Feinnadelbiopsie histologisch auf maligne Gewebeveränderungen untersucht werden. Bei röntgenologisch suspekten Befunden, die durch die genannten diagnostischen Möglichkeiten histologisch nicht abgeklärt werden können, ist als ultima ratio eine diagnostische Probethorakotomie erforderlich.

Wichtig bei malignen Prozessen ist das folgende Staging, welches sich beim Bronchialkarzinom auf die Prädilektionsorgane Skelett, Gehirn, Leber und Nebennieren konzentriert. Daher ist eine Sonographie zur Metastasensuche in der Leber und Nebenniere obligat. Des weiteren wird zur Abklärung von Hirnmetastasen, die bevorzugt beim SCLC auftreten, eine cerebrale Computertomographie durchgeführt. Bei Patienten, die Knochenschmerzen angeben und bei denen laborchemisch erhöhte Werte von Serum-Calcium und alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden, ist eine Skelettszintigraphie und eventuell eine Positronen-Emissions-Tomographie sinnvoll.

Vor einer operativen Therapie dient zur Abklärung aus internistischer Sicht u. a. eine Lungenfunktion, dessen Ergebnis das weitere Vorgehen entscheidend bestimmt. Eine Vitalkapazität  $< 50 \%$  sowie eine forcierte Einsekunden-Kapazität ( $FEV_1$ )  $< 11$  stellen eine Kontraindikation für eine Lungenteilresektion

dar. Ist die  $FEV_1 > 2,5$  l ist hingegen das postoperative Risiko für pulmonale Komplikationen relativ klein (Müller, M. *et al.*, 2004/5).

### 2.1.7. Therapie

Die Therapie des Bronchialkarzinoms richtet sich v. a. nach dem histopathologischen Typ, der Stadieneinteilung nach dem internationalen Staging-System (ISS), dem Karnofsky-Index und dem prätherapeutischen Gewichtsverlust.

#### Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Das kleinzellige Bronchialkarzinom mit seiner hohen Proliferationsrate und seiner frühzeitigen Disseminationstendenz erfordert eine frühzeitige primär systemische Therapie. Diese beinhaltet aufgrund der hohen Chemosensibilität eine Polychemotherapie über 4 – 6 Zyklen im Abstand von jeweils 3 – 4 Wochen (Cisplatin/Carboplatin + Etoposid, Adriamycin/Epirubicin + Cyclophosphamid + Vincristin, Ifosfamid + Etoposid). Dabei sollte die initiale Zytostatikakombination erst durch ein Alternativprotokoll ersetzt werden, wenn keine weitere Tumorregression dokumentiert werden kann. Bei einer optimalen Therapie sollte bereits nach 4 Zyklen das Ziel der Vollremission erreicht sein. Die Applikation der folgenden 2 Zyklen im Sinne einer Erhaltungstherapie verlängert das progressionsfreie Intervall, verbessert jedoch nicht die Überlebenszeit.

Zu der Polychemotherapie erfolgt eine lokoregionäre Radiotherapie, die in den vergangenen Jahren meistens sequentiell nach der Chemotherapie erfolgte. Wissenschaftliche Studien haben jedoch gezeigt, dass eine simultane Radiochemotherapie die Überlebensrate im Vergleich zum sequentiellen Vorgehen steigert. So zeigte z. B. eine Metaanalyse 1992, dass eine simultane

Radiochemotherapie die Mortalitätsrate um 14 % reduziert (Pignon, J. P. *et al.*, 1992). Andere klinischen Studien konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen sequentieller und simultaner Therapie bestätigen, zeigten jedoch eine bessere Verträglichkeit der simultanen Therapie bezüglich der Lungentoxizität (Lebeau, B. *et al.*, 1999).

Weiterhin konnte eine Studie beweisen, dass eine akzelerierte Hyperfraktionierung der Radiatio, die simultan mit der Chemotherapie beginnt, die Überlebenszeit signifikant verbessert (Turrisi, A. *et al.*, 1999).

Nach der kompletten Remission erfolgt schließlich eine protektive Ganzschädelbestrahlung, was zur signifikanten Senkung der kumulativen Inzidenz von Hirnmetastasen führt.

Die chirurgische Resektion spielt beim SCLC eine untergeordnete Rolle, da bereits bei 2/3 der Patienten bei Diagnosestellung eine Fernmetastasierung vorliegt. Bei Patienten mit den Stadien I und II führt jedoch ein operatives Vorgehen in Kombination mit einer neoadjuvanten oder adjuvanten Chemo- bzw. Radiotherapie zur Verbesserung der 5-Jahresüberlebensrate und kann somit in diesen Stadien empfohlen werden.

### Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist die chirurgische Resektion in kurativer Intention Therapie 1. Wahl, die bei 25 – 30 % der Patienten mit einem NSCLC mit einem Stadium I – II möglich ist. Durch diese Resektion des Primärtumors, die bei peripheren Tumoren eine Lobektomie und bei zentralen Tumoren eine Pneumektomie jeweils mit einer interlobären und mediastinalen Lymphadenektomie erfordert, wird im Stadium I eine 5-Jahresüberlebensrate von 60 – 70 % erreicht und im Stadium II eine 5-Jahresüberlebensrate von 40 – 60 %. Wird bei der chirurgischen Resektion nur eine R1- oder R2- Situation erreicht, ist eine adjuvante Radiatio obligat. Bei einer R0-Resektion ist hingegen keine Nachbestrahlung indiziert, da eine Metaanalyse der PORT Metaanalysis

Trialists Group 1998 zeigte, dass in diesem Fall eine Radiatio einen nachteiligen Effekt auf das Überleben habe (Port Meta-Analysis Trialists Group, 1998). Da die analysierten Studien jedoch in einem Zeitraum von 30 Jahren stattfanden und somit nicht dem strahlentherapeutischen Techniken heutigen Standards genügen, ist diese Metaanalyse kritisch zu beurteilen.

Bei Inoperabilität im Stadium I – II ist die kurativ intendierte Radiotherapie der etablierte Therapiestandard.

Die Therapie des NSLSC im Stadium III erfolgt innerhalb von Studien, in denen multimodale Konzepte versucht werden.

Bei Patienten mit einem Stadium III A, die einen N1- bzw. einen geringgradigen N2-Status aufweisen, hat sich die primäre Operation mit adjuvanter Strahlentherapie bzw. Radiochemotherapie durchgesetzt. Patienten, die jedoch einen ausgeprägten Lymphknotenbefall („bulk N2“) aufweisen, profitieren von einer zusätzlichen neoadjuvanten Chemotherapie. Weitere Studien haben gezeigt, dass eventuell eine neoadjuvante kombinierte Radiochemotherapie zur weiteren Verbesserung der Remissionsraten führt und dadurch eine chirurgische Resektion auch in den fortgeschritteneren Stadien ermöglicht werden kann.

In einer in England 2004 durchgeführten klinischen Studie wurde dieses Konzept, bestehend aus einer neoadjuvanten Chemotherapie gefolgt von einer operativen Therapie, einer alleinigen Radiochemotherapie gegenübergestellt. Das Resultat zeigte, dass beide Therapiekonzepte zu einem identischen Tumorausprechen führen und dass sogar die Patienten mit einer alleinigen Radiochemotherapie geringere Bestrahlungsdosen benötigten, um eine äquivalente lokale Tumorkontrolle zu erreichen (Taylor, N. A. *et al.*, 2004).

Bei Inoperabilität, zumeist liegt bereits das Stadium III B vor, wird eine sequentielle Radiochemotherapie empfohlen. Allerdings ist die Rate der lokalen Progression mit 80 % innerhalb des 1. Jahres sehr hoch, so dass alternativ eine intensiviertere, akzeleriert-hyperfraktionierte Radiatio (CHART - Continuous Hyperfractionated Accelerated Radiotherapy, 54 Gy, 3 x 1,5 Gy/d)

(Saunders M. *et al.*, 1997) oder eine simultane Radiochemotherapie nach unterschiedlichen multimodalen Konzepten versucht werden kann. Ein häufig verwendetes Therapieschema stellt die platinbasierte Chemotherapie in Kombination mit einer Radiotherapie von einer Gesamtreferenzdosis von 66 Gy nach Vokes dar (Vokes E. E. *et al.*, 2002) dar. Bei Patienten, die jedoch einen sehr guten Allgemeinzustand, einen hohen Karnofsky-Index und gute Parameter bezüglich der Lungenfunktion aufweisen, kann jedoch auch eine neoadjuvante normal dosierte Chemotherapie mit eventuell anschließender Operation empfohlen werden.

Bei einem NSCLC im Stadium IV kann eine palliative Radiochemotherapie in Erwägung gezogen werden, um subjektive Beschwerden wie Schmerzen oder Husten zu lindern. Weiterhin kommen eine palliative Radiatio oder die Operation von singulären Metastasen zur Schmerzlinderung in Betracht.

Neben den genannten multimodalen Konzepten werden beim NSCLC in allen Stadien der Erkrankung auch Monotherapien mit neueren Substanzen wie Paclitaxel, Docetaxel, Topotecan, Irinotecan, Vinorelbin und Gemcitabin versucht.

## 2.2 Radiotherapie

### 2.2.1 Durchführung der Radiotherapie bei Bronchialkarzinomen

Bei Bronchialkarzinomen wird in der Regel eine Teletherapie mit Linearbeschleunigern, die Photonenstrahlung höherer Energie (bis 30 MeV) und auch Elektronenstrahlung unterschiedlicher Energien erzeugen, eingesetzt.

Zur rechnergestützten Bestrahlungsplanung dient die Computertomographie (CT), die Mittel der Wahl zur Darstellung der Tumorausbreitung und der anatomischen Gegebenheiten ist. Neben dem klinischen Zielvolumen (clinical target volume, CTV) wird ebenso das Planungszielvolumen (planning target volume, PTV) in das Planungs-CT eingezeichnet, welches die Lagerungs- und Positionierungsungenauigkeiten sowie die räumliche Verlagerung des CTV durch Atmung berücksichtigt. Um im Zielvolumen eine ausreichende Dosiskonzentration unter optimaler Schonung des Normalgewebes zu erreichen, wird eine Mehrfeldertechnik angewandt und sekundär das irreguläre Strahlenfeld durch Multi-leaf-Kollimatoren kollimiert. Nach Erstellen des Bestrahlungsplans werden mittels Therapiesimulator die Strahlenfelder simuliert und Parameter wie Feldgröße, Gantry- und Kollimatordrehung und der Fokus-Haut-Abstand eingestellt.

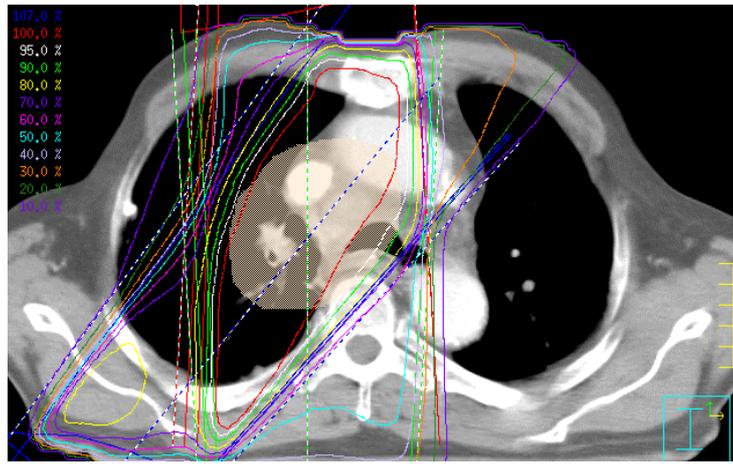


Abbildung 1: Beispiel für die Dosisverteilung bei einem zentral lokalisierten Bronchialkarzinom im Rahmen der dreidimensionalen Bestrahlungsplanung

Bei der Festlegung der Dosis und der Fraktionierung spielen sowohl der histopathologische Typ als auch das TNM-Stadium nach dem UICC eine entscheidende Rolle:

### Radiotherapie in kurativer Intention

#### Radiotherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Beim SCLC erfolgt sequentiell oder simultan zur Chemotherapie eine Bestrahlung der Primärtumorregion, der mediastinalen Lymphknoten und gegebenenfalls der supraclaviculären Lymphknoten. Bei der konventionell fraktionierten Radiotherapie beträgt die Einzeldosis 1,8 – 2,0 Gy pro Fraktion bei 5 Fraktionen/Woche und einer Gesamtreferenzdosis von 50 – 66 Gy. Im Rahmen kontrollierter klinischer Studien kann alternativ zur konventionellen Strahlentherapie eine akzelerierte, hyperfraktionierte Strahlenbehandlung,

d. h. 2 oder mehr Bestrahlungen/Tag mit einem Mindestabstand von 6 Stunden und einer reduzierten Einzeldosis, durchgeführt werden, die hinsichtlich der Überlebensrate eine signifikante Verbesserung darstellt (Turrisi, A. *et al*, 1999). 6 Wochen nach Abschluss der Thoraxbestrahlung ist bei anhaltender Remission eine adjuvante prophylaktische Ganzschädelbestrahlung mit einer Einzeldosis von 2,0 Gy/Tag bei einer Gesamtdosis von 30 Gy indiziert.

Erfolgte im Stadium I – II eine chirurgische Resektion, sollte bei einer R0-Resektion und pN<sub>2</sub>-Situation eine mediastinale Bestrahlung mit mindestens 45 Gy appliziert werden und bei einer inkompletten Resektion eine Boostbestrahlung durchgeführt werden.

#### Strahlentherapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Nach primär chirurgischer Therapie des NSCLC im Stadium I – II erfolgt bei R0-Resektion keine adjuvante Radiatio. Die inkomplette Resektion erfordert hingegen eine postoperative konventionell fraktionierte Strahlentherapie, wobei der Lymphknotenbefall für die Höhe der Dosis entscheidend ist. Bei einer N<sub>0</sub>- bzw. N<sub>1</sub>-Situation wird eine kleinvolumige Bestrahlung von 60 – 66 Gy appliziert. Liegt jedoch ein ausgeprägter mediastinaler Lymphknotenbefall vor, wird das Mediastinum mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlt, gefolgt von einer Boostbestrahlung mit 10 – 16 Gy.

Ist im Stadium I – II des NSCLC keine chirurgische Resektion aufgrund Tumorlokalisation, reduziertem Allgemeinzustand oder signifikanter Komorbidität möglich, ist ebenfalls die Radiotherapie Methode der Wahl, bei der eine Zielvolumendosis von 60 – 70 Gy in konventioneller Fraktionierung appliziert wird. Dabei erfolgt eine adjuvante Bestrahlung der befallenen Lymphknotenregionen bis 50 Gy, gefolgt von einer Boostbestrahlung der Primärtumorregion. Eine klinische Studie zeigte, dass durch diese Radiotherapie der unresezierten Bronchialkarzinome im Stadium I – II die mittlere

Überlebenszeit um 5 – 7 Monate verlängert wird, die alleinige Strahlentherapie jedoch keine Heilungsmöglichkeit anbietet (Wisnivesky, J. P. *et al.*, 2005).

Im Stadium III kommt neben einer postoperativen Bestrahlung eine neoadjuvante Radiotherapie in Betracht, die zur Zeit im Rahmen von randomisierten Studien durchgeführt wird. Des Weiteren wird die Strahlentherapie in den fortgeschrittenen Stadien der Tumorerkrankung in multimodalen Konzepten mit zytostatischen Therapien in unterschiedlicher Dosis kombiniert, wobei jedoch mit einem deutlich höheren Maß an Hämatotoxizität wie auch nicht hämatologischen Toxizitäten zu rechnen ist.

Bei Patienten, die aufgrund von Komorbidität keine Chemotherapie erhalten können, ist eine hochdosierte alleinige Strahlentherapie angezeigt.

#### Strahlentherapie in palliativer Intention

Bei der palliativen Therapie des Bronchialkarzinoms stellt die Strahlentherapie eine wirksame Option zur Linderung der Symptomatik wie Husten, Dyspnoe, Hämoptysen, Thoraxschmerzen oder Schmerzen durch ossäre Metastasierung dar. Es werden dabei unterschiedliche Fraktionierungsschemata je nach Symptomatik und Metastasierung eingesetzt. Ein möglicher Behandlungsmodus ist die palliative alleinige akzelerierte Radiatio mit einer Gesamtreferenzdosis von 32 Gy, bei der täglich 2 Fraktionen in einem 6-stündlichem Intervall mit einer Einzelreferenzdosis von 2 Gy appliziert werden (Nestle U. *et al.*, 2001). Durch diese palliativ intendierte Bestrahlung kann bei einer deutlich verkürzten Therapiedauer eine Verbesserung der Lebensqualität erzielt werden.

## 2.2.2 Strahlenwirkung auf Normalgewebe – Nebenwirkungen der Radiatio

Das Lungenparenchym ist ein sehr strahlensensibles Gewebe und stellt bei der Radiotherapie im Thoraxbereich den dosislimitierenden Faktor dar.

Die heutige Bestrahlungstechnik ermöglicht zwar die Applikation des Dosismaximums im Tumor sowie eine Homogenität im Zielvolumen bei gleichzeitiger Schonung des Lungenparenchyms, trotzdem ist es unumgänglich, ein Teil des Lungenparenchyms mit einer gewissen Strahlendosis zu erfassen. Um die Belastung des gesunden Gewebes darzustellen, werden Dosis-Volumen-Histogramme erstellt, anhand derer die physikalische Dosisverteilung bewertet und somit das Risiko einer Normalgewebetoxizität abgeschätzt werden kann.

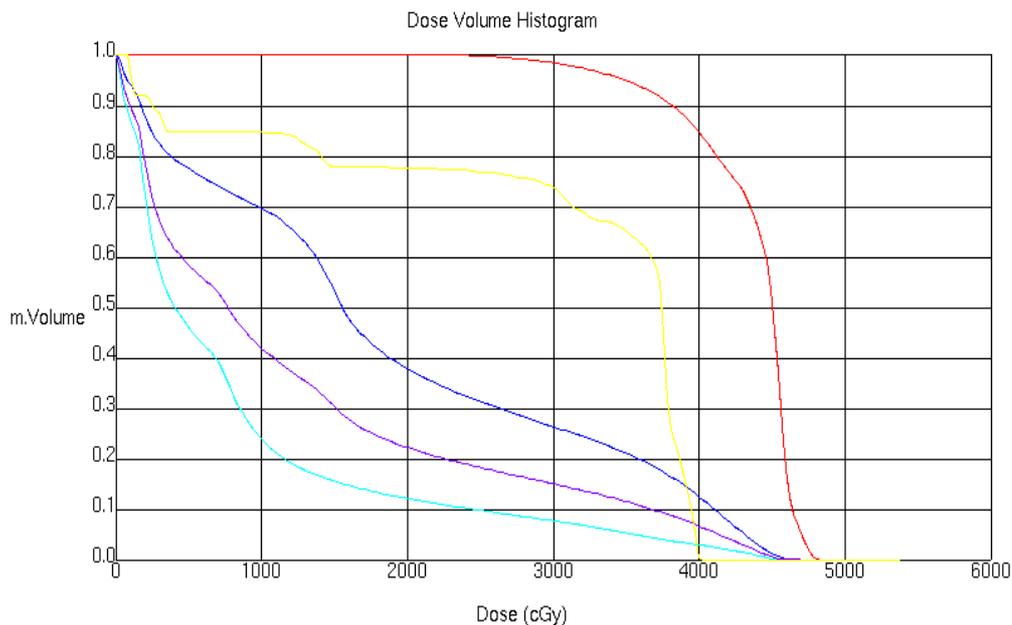


Abbildung 2: Dosis-Volumen-Histogramm

Als Nebenwirkung bei der Bestrahlung eines Bronchialkarzinoms können abhängig vom Zeitintervall 2 radiogene Reaktionen des Lungenparenchyms auftreten:

- Strahlenpneumonitis

Die radiogene Pneumonitis tritt 2 Wochen – 6 Monate nach der Thoraxbestrahlung auf und ist durch klinische Symptome wie unproduktiver Husten, Fieber und Dyspnoe charakterisiert, die zur respiratorischen Insuffizienz führen können. Der auskultatorische Befund ist häufig unauffällig. Röntgenologisch können konfluierende Fleckschatten und milchglasartige Verdichtungen, die in der Regel auf das Bestrahlungsfeld begrenzt sind, nachgewiesen werden. Die rein symptomatische Therapie bei fehlendem kurativem Ansatz besteht in der Applikation von Steroiden, die jedoch die Entstehung einer Strahlenfibrose nicht ausschließt.

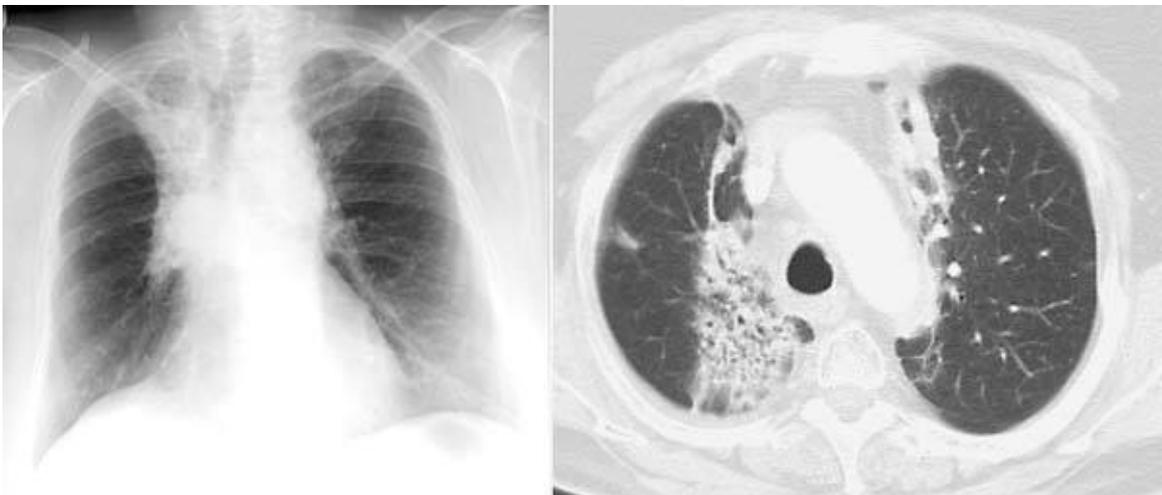


Abbildung 3: radiogene Pneumonitis im Röntgen-Thorax (links),  
radiogene Pneumonitis im CT-Thorax (rechts)

Bei der radiogenen Pneumonitis können folgende histopathologische Alterationen beobachtet werden: Makrophageninfiltrationen, proteinreiche

Ödeme der Alveolarsepten, Epithelzelldesquamation sowie Verdickungen der Alveolarsepten durch Infiltration von Entzündungszellen (Travis E. *et al.*, 1996).

- Strahlenfibrose

Die Strahlenfibrose kann sich ohne Prodromi oder im Anschluss an eine radiogene Pneumonitis entwickeln und hat ihre volle Ausprägung 1 – 2 Jahre post radiatio erreicht. Die klinische Symptomatik hängt dabei stark vom bestrahlten Lungenvolumen und dem unbestrahlten Restvolumen ab. Im Röntgen-Thorax manifestiert sich diese Fibrose durch streifige Zeichnungsvermehrungen. Aufgrund einer starken Schrumpfungstendenz dieser Gewebeverdichtungen lassen sich später auch eine Mediastinalverziehung sowie ein Zwerchfellhochstand nachweisen.



Abbildung 4 : Strahlenfibrose im Röntgen-Thorax (links),  
Strahlenfibrose im CT-Thorax (rechts)

## 2.3 TGF-beta

TGF-beta (Tumor-Growth-Factor-beta) ist eines der wichtigsten Zytokine, die für die Inhibition des Zellwachstums und auch für die Kontrolle anderer Aspekte des Zellverhaltens wie Differenzierung, Migration und Adhäsion verantwortlich sind.

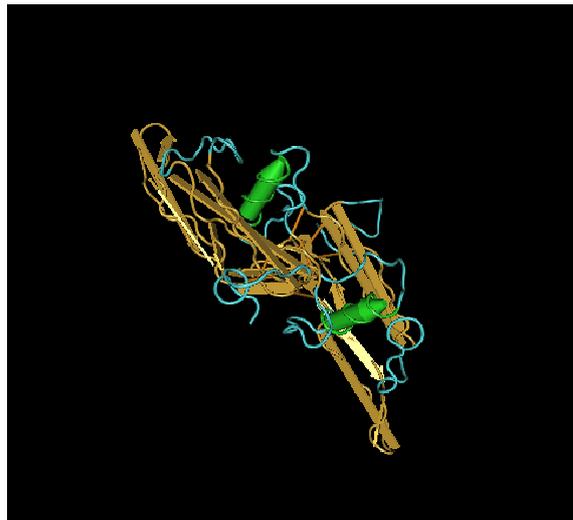


Abbildung 5: dreidimensionale Struktur des Zytokins TGF-beta1

(Hinck *et al.*, 1996)

Um Zelleffekte auszulösen, bindet TGF-beta an membranständige Rezeptoren, wodurch SMAD-Transkriptions-Kofaktoren aktiviert werden können. Diese akkumulieren im Zellkern und kontrollieren somit die Transkription der Zielgene.

Eine einzelne Zelle kann sehr unterschiedlich auf eine Stimulation von TGF-beta durch Bildung eines TGF-beta-Rezeptorkomplex reagieren. Dies beruht darauf, dass jede Zelle, abhängig von der Zelllinie, der Zellart und anderen Faktoren, ein breites Repertoire von SMADs aufweist, die abhängig vom zellulären Kontext verschiedene Zellantworten hervorrufen können.

### 2.3.1 TGF-beta induzierte Signaltransduktion

TGF-beta bindet an den membranständigen TGF-beta Rezeptor Typ II (T $\beta$ RII), wodurch eine T $\beta$ RII-Serin/Threoninkinase die GS-Domäne innerhalb des TGF-beta Rezeptors Typ I (T $\beta$ RI) phosphoryliert. Infolgedessen entsteht ein T $\beta$ RI/T $\beta$ RII-Komplex. In diesem Zustand erkennt und phosphoryliert T $\beta$ RI ihrerseits die Transkriptions-Kofaktoren SMAD2 und SMAD3, die anschließend mit SMAD4 einen Komplex bilden. Dieser aktivierte SMAD-Komplex gelangt durch Interaktion ihrer hydrophoben Oberfläche in der C-terminalen Domäne mit Nucleoporinen in den Zellkern, in dem sie Zielgene mit einer CAGAC-Sequenz und mit Hilfe von DNA-bindenden Kofaktoren erkennen können. Auf diese Weise kann TGF-beta entweder durch Mitwirkung von Koaktivatoren wie p300, CBP oder SMIF zur Aktivierung oder durch Einfluss von Kosuppressoren wie z. B. p107 zur Suppression von mehreren 100 Genen führen.

Die SMAD-Proteine verbleiben nur für die Dauer der TGF-beta Stimulation im Zellkern. Anschließend erfolgt eine Dephosphorylierung und die SMAD-Proteine gelangen wieder zurück ins Zytoplasma.

Der phosphorylierte T $\beta$ RI/T $\beta$ RII-Komplex führt weiterhin zur Mobilisation eines SMAD 7-SMURF 1-Protein-Komplex aus dem Zellkern ins Zytoplasma, der zur Beendigung der Signaltransduktion führt und somit eine Dauerstimulation durch TGF-beta verhindert.

TGF-beta kann jedoch auch SMAD-unabhängig Effekte durch Aktivierung von ERK 1 und 2 (extracellular-signal-regulated-kinase), JNK (c-Jun amino-terminal kinase) und MAPK (mitogen-activated protein kinase) in unterschiedlichen Zelllinien induzieren.

Ein wichtiger Effekt von TGF-beta ist die Apoptoseinduktion. Diese wird abhängig vom Zelltyp durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen auf der Ebene der Signaltransduktion erreicht. So gibt es in vielen epithelialen Zellarten einen durch TGF-beta induzierbaren Transkriptionsfaktor (TIEG1=

TGF-beta inducible early response gene), der die Zellproliferation inhibiert und die Apoptose induziert.

### 2.3.2 Wirkung von TGF-beta auf Zellen

TGF-beta kontrolliert die Proliferation, inhibiert das Wachstum und induziert Apoptose der epithelialen Zellen. Ein Tierversuch mit Mäusen (Shull, M. M. *et al.*, 1992) zeigte, dass eine Inaktivierung von TGF-beta1 nicht zur übermäßigen Epithelproliferation führt. Dennoch konnte in vielen Studien der inhibierende Einfluss von TGF-beta auf die Proliferation von epithelialen Zellen z. B. in den Milchdrüsengängen der Brustdrüse (Pierce, D. F., Jr. *et al.*, 1993; Jhappan, C. *et al.*, 1993) nachgewiesen werden. TGF-beta kontrolliert neben der Epithelproliferation auch das Wachstum der endothelialen Zellen. Einerseits induziert TGF-beta die Apoptose von Endothelzellen, andererseits unterstützt TGF-beta die Angiogenese während der Entwicklung (Dickson, M. C. *et al.*, 1995; Oshima, M. *et al.*, 1996). Dies wird durch die Expression zweier unterschiedlicher T $\beta$ RI (ALK1 und ALK5) ermöglicht. ALK1 führt zu einer Proliferation der Endothelzellen, ALK5 inhibiert hingegen das Zellwachstum. Welcher Rezeptor aktiviert wird, ist von der TGF-beta Konzentration abhängig.

Weiterhin unterliegen auch die Zellen des Immunsystems der Kontrolle durch TGF-beta. Eine Inaktivierung von TGF-beta in Mäusen führt kurz nach der Geburt aufgrund von schweren entzündlichen Vorgängen in unterschiedlichen Organsystemen zum Tode (Shull, M. M. *et al.*, 1992; Kulkarni, A. B. *et al.*, 1993). Dies zeigt, dass TGF-beta eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im Immunsystem spielt. Es reguliert durch unterschiedliche Mechanismen die T-Zellfunktion z. B. durch Induktion der T-Zell-Apoptose

oder durch Inhibition der Differenzierung von zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helferzellen.

TGF-beta beeinflusst jedoch auch inflammatorische Reaktionen. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass TGF-beta1 für einen pulmonalen Influx von neutrophilen Granulozyten, wahrscheinlich durch eine Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 der endothelialen Zellen, verantwortlich ist (Suzuki, Y. *et al.*, 1994). Des Weiteren wirkt das Zytokin autoinduktiv und chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen und ist somit an entzündlichen Lungenschädigungen beteiligt.

Zudem ist TGF-beta ein bedeutendes Zytokin bei fibrogenen Prozessen (Herskind, C. *et al.*, 1998): Eine TGF-beta induzierte Stimulation von Fibroblasten zur Produktion von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III konnte sowohl in dermalen Fibroblasten (Varga, J. *et al.*, 1987) als auch in pulmonalen Fibroblasten (Fine, A. *et al.*, 1987) nachgewiesen werden. Außerdem fördert TGF-beta die Differenzierung von Fibroblasten zu Fibrozyten (Burger, A. *et al.*, 1998). Diese Prozesse führen letztendlich zur interstitiellen Fibrose.

Auch in der Karzinogenese spielt TGF-beta eine bedeutende Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Unterbrechung der Signaltransduktionskaskade der antiproliferative und der Apoptose-induzierende Effekt durch TGF-beta verloren gehen (Derynck, R. *et al.*, 2001; Massagué, J. *et al.*, 2000). Ebenso konnten Mutationen in TGF-beta-Rezeptoren sowie in SMAD4, ein Tumorsuppressorgen (Hahn, S. A. *et al.*, 1996), nachgewiesen werden. Dies hat zur Folge, dass die Zielzellen resistent gegenüber der TGF-beta induzierten Zytostase und Apoptose werden und somit die Fähigkeit zur unkontrollierten Proliferation erhalten. Außerdem wird dadurch eine Zunahme von Mutationen im Genom der Tumorzellen erleichtert.

Andererseits sind die Tumorzellen in der Lage, TGF-beta als Tumor-Progressionsfaktor zu verwenden: TGF-beta beeinflusst verschiedene Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen des Immunsystems und sorgt somit für eine für das Tumorwachstum geeignete Umgebung. Dadurch werden Tumorprogress, Invasion und auch Metastasierung begünstigt. So wird z. B. durch Suppression der T-Lymphozyten eine lokale Immunschwäche erzielt, welches das Tumorwachstum unterstützt. TGF-beta hat außerdem einen negativen Einfluss auf antigen-präsentierende Zellen (APC), wodurch eine ineffiziente Präsentation von tumorspezifischen Antigenen erreicht wird. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte TGF-beta Expression mit einer gesteigerten Neoangiogenese einhergeht. Denn TGF-beta ist in der Lage, die Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) und von CTGF (connective-tissue growth factor) in Epithelzellen und in Fibroblasten zu induzieren und Angiopoietin-1 zu supprimieren und somit eine Neubildung von Gefäßen zu ermöglichen.

TGF-beta hat jedoch auch eine direkte Wirkung auf die Endothelzellen, indem es deren Wachstum kontrolliert und durch Expression und Aktivierung von Metalloproteinasen deren Loslösung von der Basalmembran ermöglicht. Weiterhin induziert TGF-beta die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) – durch Verlust der Zell-Zell-Kontakte werden die Tumorzellen zur Migration befähigt. Dies erzielt TGF-beta durch die verminderte Expression des Zell-Zell-Adhäsionsrezeptors E-Cadherin durch eine Suppression des E-Cadherin-Gens (Oft, M. *et al.*, 1996). Durch diese Prozesse wird eine Metastasierung des Tumors ermöglicht.

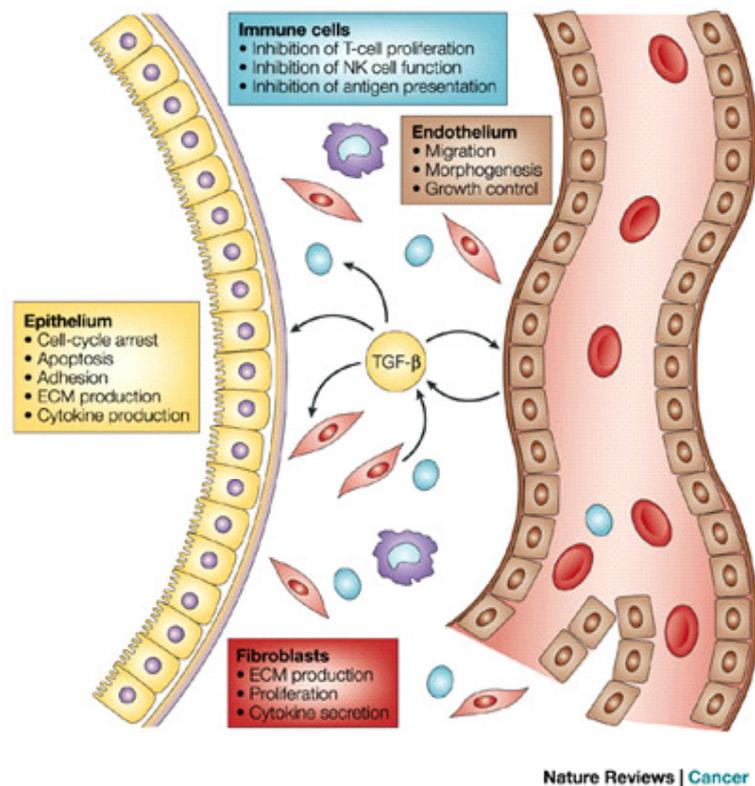


Abbildung 6: TGF-beta vermittelte Effekte  
(Siegel, P. M. *et al.*, 2003)

## 2.4 Potentielle Korrelation

### 2.4.1 zwischen TGF-beta1 und der Inzidenz der strahleninduzierten Pneumonitis

TGF-beta1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer radiogenen Pneumonitis. Es ist sowohl an dem inflammatorischen Prozess einer radiogenen Pneumonitis (Suzuki, Y. *et al.*, 1994; Rube, C. E. *et al.*, 2000) als auch an der Entstehung einer Strahlenfibrose (Martin, M., Lefaix, J. L., *et al.*, 2000; Burger, A. *et al.*, 1998) beteiligt:

In tierexperimentellen Studien konnte ein strahleninduzierter Anstieg der TGF-beta Expression im Lungengewebe von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden (Rübe C. E. *et al.*, 2000). Da TGF-beta vor allem in den inflammatorischen Zellinfiltraten als auch in den fibrotischen Gewebearealen lokalisiert war, konnte eine Beteiligung dieses Zytokins an der Pathogenese der radiogenen Pneumonitis vermutet werden. Weiterhin konnte die Dosisabhängigkeit der TGF-beta Expression bestätigt werden: Die TGF-beta mRNA Expression korrelierte hochsignifikant mit der Strahlendosis.

Auch klinische Studien ließen eine Mitwirkung von TGF-beta an der Entstehung einer strahleninduzierten Pneumonitis vermuten. In einer prospektiven Studie konnte beobachtet werden, dass ein Anstieg des TGF-beta1 Plasmaspiegels bezogen auf den vor der Radiotherapie erhobenen Wert (post-RT TGF-beta1/pre-RT TGF-beta1) ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer radiogenen Pneumonitis darstellt und somit sogar eine prognostische Aussage erlaubt (Anscher M. S. *et al.*, 1994). Die Autoren postulierten, dass eine Normalisierung des TGF-beta1 Plasmaspiegels während der Radiotherapie mit einer Sensitivität und einem positiven prädiktiven Wert von 90 % die Patienten identifiziert, die keine Pneumonitis entwickeln. Weiterhin konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass der prätherapeutisch bestimmte TGF-beta1 Wert weder mit der Inzidenz noch mit dem Schweregrad einer radiogenen Pneumonitis korreliert. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen der Strahlendosis und der Inzidenz einer radiogenen Pneumonitis nachgewiesen werden, jedoch zeigten die Resultate, dass die Radiotherapie dosisabhängig zu einer erhöhten TGF-beta1 Expression im Sinne einer „normalen“ Gewebeschädigung führt. Daher sei es für eine prognostische Aussage über das Risiko einer radiogenen Pneumonitis notwendig, den prä- als auch den posttherapeutischen TGF-beta1 Plasmaspiegel zu evaluieren und den Quotienten zu errechnen. Somit ließen diese Ergebnisse vermuten, dass der Quotient des TGF-beta1 Plasmaspiegels vor und nach der Behandlung ein prognostischer Wert für das Entstehen einer Pneumonitis ist.

Dies würde eine Identifikation der Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine solche Komplikation und somit eine Individualisierung der Therapie ermöglichen.

Dass allein der prätherapeutisch bestimmte TGF-beta1 Plasmaspiegel keine Korrelation mit der Inzidenz der radiogenen Pneumonitis zeigt, konnte durch eine weitere klinische Studie bestätigt werden (De Jaeger K., *et al.*, 2004). Allerdings ergab die Untersuchung der potentiellen Korrelation zwischen dem TGF-beta1 Quotienten (post-RT TGF-beta1/ pre-RT TGF-beta1) und der Entstehung der Pneumonitis, deren Schweregrad man nach zwei unterschiedlichen Klassifikationen (Common Toxicity Criteria (CTC) und Southwestern Oncology Group (SWOG)) beurteilte, ein kontroverses Ergebnis: Es konnte keine signifikante Korrelation bei Verwendung der Common Toxicity Criteria (dieselben Kriterien, die Anscher verwendete) nachgewiesen werden. Die Anwendung der Southwestern Oncology Group ergab sogar, dass der TGF-beta1 Quotient bei Patienten, die eine radiogene Pneumonitis erlitten, signifikant niedriger war, als bei den Patienten ohne Pneumonitis. Weiterhin zeigte diese Studie, dass die MLD (mean lung dose) sowohl signifikant mit dem posttherapeutisch bestimmten TGF-beta1 Plasmaspiegel als Ausdruck einer „normalen“ Gewebeschädigung durch die ionisierende Strahlung als auch signifikant mit der Entwicklung einer symptomatischen und radiologischen Pneumonitis korreliert.

In einer retrospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass weder der TGF-beta1 Quotient (post-RT TGF-beta1/ pre-RT TGF-beta1) noch eine Erhöhung des TGF-beta1 Plasmaspiegels während der Bestrahlung mit der Inzidenz einer symptomatischen radiogenen Lungenschädigung statistisch signifikant korrelieren (Hart J. P. *et al.*, 2005).

Somit lassen sowohl tierexperimentelle Untersuchungen als auch klinische Studien eine Beteiligung von TGF-beta1 an der Entstehung der radiogenen

Pneumonitis vermuten. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien bezüglich der prognostischen Bedeutung von TGF-beta1 Plasmaspiegel auf die Entwicklung einer strahleninduzierten Pneumonitis sind jedoch kontrovers.

#### 2.4.2 zwischen TGF-beta1 und Tumorprogress bzw. -remission

Durch tierexperimentelle Untersuchungen konnte eine Beteiligung von TGF-beta1 an der Karzinogenese nachgewiesen werden (Derynck, R. *et al.*, 2001; Massagué, J. *et al.*, 2000). So konnte beobachtet werden, dass Bronchialkarzinome eigenständig TGF-beta1 exprimieren (Asselin-Paturel, C., *et al.*, 1998), welches in einem erhöhten TGF-beta1 Plasmaspiegel resultieren kann.

Auch in klinischen Studien konnte eine Korrelation zwischen dem TGF-beta1 Plasmaspiegel und dem Tumorverhalten beobachtet werden: Bei 53 % der Patienten mit einem Bronchialkarzinom konnte bereits prätherapeutisch ein erhöhter TGF-beta Wert nachgewiesen werden (Anscher M. S., Kong F. M. *et al.*, 1998). Ebenso wurde beobachtet, dass der prätherapeutisch erhöhte TGF-beta1 Plasmaspiegel während der Therapie aufgrund der Verkleinerung des Tumorumfanges abfiel, jedoch nach Beendigung der Therapie noch oberhalb des Referenzbereiches lag. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der TGF-beta Plasmaspiegel bei den Patienten, die prätherapeutisch einen erhöhten Wert aufwiesen, mit dem Tumorprogress bzw. mit der Tumorregression korreliert (Kong, F. M. *et al.*, 1996). Diese Korrelation konnte nicht nur bei Bronchialkarzinomen, sondern auch bei Mammakarzinomen (Kong, F. M., *et al.*, 1995; Ghellal A. *et al.*, 2000), Magenkarzinomen (Lin, Y. *et al.*, 2006), kolorektalen Karzinomen (Shim K. S. *et al.*, 1999; Xiong, B. *et al.*, 2002; Narai S. *et al.*, 2002), Nierenzellkarzinomen (Junker, U. *et al.*, 1996), sowie bei Prostatakarzinomen (Shariat S.F. *et al.*, 2001) nachgewiesen werden.

In immunohistochemischen Studien konnte sogar gezeigt werden, dass die Expression von TGF-beta1, T $\beta$ RI und T $\beta$ RII bei Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge eine prognostische Aussage erlauben: Eine positive Expression von TGF-beta als auch von den Rezeptoren ist signifikant prognostisch ungünstiger als ein negativer immunohistochemischer Befund (Takanami, I. *et al.*, 1994), das auf die wachstumsfördernde Wirkung von TGF-beta1 auf die Tumorzellen zurückzuführen sei. Diese Korrelation zwischen dem TGF-beta1 Plasmaspiegel und dem Outcome der Patienten konnte bei verschiedenen malignen Erkrankungen in mehreren klinischen Studien beobachtet werden (Kong, F.M. *et al.*, 1999).

Diese Studien postulieren demnach eine Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegels mit dem Tumoransprechen bei Therapie und der Prognose der malignen Erkrankung.

In dieser prospektiven klinischen Studie soll demnach untersucht werden, inwieweit der TGF-beta1 Plasmaspiegel während der Radiotherapie eines Bronchialkarzinoms möglicherweise strahleninduzierte lokale Veränderungen der Zytokinexpression im Lungengewebe widerspiegelt und somit die Entwicklung einer radiogenen Pneumopathie vorherzusagen erlaubt.

Eine weitere Zielsetzung dieser Studie ist es zu überprüfen, ob ein erhöhter Zytokinspiegel bei den onkologischen Patienten zudem durch eine Sekretion von TGF-beta durch das Tumorgewebe bedingt ist und eine Korrelation des TGF-beta Plasmaspiegels mit dem Therapieansprechen vorliegt.

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1 Einschlusskriterien**

Von Januar 2002 bis Januar 2005 wurden 52 Patienten in diese prospektive Studie aufgenommen.

Bei der Patientenauswahl wurden folgende Einschlusskriterien vorausgesetzt:

- lokalisiertes NSCLC, das histologisch bzw. zytologisch gesichert wurde
- Karnofsky-Index > 70 %
- keine vorausgegangene Radiotherapie

Es lag jeweils eine schriftliche Einwilligung der Patienten über die freiwillige Teilnahme an der Studie vor. Die Studie wurde der Ethikkommission vorgestellt und gebilligt.

#### **3.2 Behandlung**

Die 52 Patienten dieser Studie erhielten eine CT-gestützte dreidimensionale Bestrahlungsplanung. Die Radiotherapie erfolgte unter Verwendung von Linearbeschleunigern mit einer Photonenenergie von 6 und/oder 23 MeV. Zur Bestimmung der einzelnen Volumina (gross tumor volume (GTV), clinical target volume (CTV), planning target volume (PTV)), der mean lung dose (MLD) sowie zur Erstellung der Dosis-Volumen-Histogramme und zur Berechnung der Felder wurde das Planungssystem ADAC Pinnacle eingesetzt.

Von den 52 Patienten der Studie erhielten 28 Patienten eine Radiochemotherapie, angelehnt an Vokes, der in einer randomisierten Phase-II-Studie eine verbesserte Überlebensrate bei Patienten mit NSCLC, Stadium III B, durch folgende Therapie nachwies:

2 Zyklen induktive Chemotherapie und 2 Zyklen simultane Chemotherapie mit Cisplatin (80 mg/m<sup>2</sup>)/Carboplatin, kombiniert mit Vinorelbine (25 mg/m<sup>2</sup> bei der Induktionschemotherapie, 15 mg/m<sup>2</sup> bei der simultanen Radiochemotherapie), bei einer am Tag 43 begonnenen Radiatio mit 44 Gy in 22 Fraktionen bei 2 Gy/Fraktion mit anschließendem Boost mit 22 Gy in 11 Fraktionen bei einer Einzelreferenzdosis (ERD) von 2 Gy (Vokes, E. E. *et al.*, 2002).

13 dieser 28 Patienten erhielten eine normofraktionierte Radiotherapie mit einer Gesamtreferenzdosis (GRD) von 50,4 Gy plus einer Boostbestrahlung von 16,2 Gy und somit eine GRD von 66,6 Gy. Bei 15 Patienten wurde keine Boostbestrahlung durchgeführt, womit die GRD bei 50,4 Gy liegt. Bei der platin-basierten Chemotherapie wurde Cisplatin/Vinorelbine bzw. Carboplatin/Navelbine verwandt.

14 Patienten, die aufgrund ihrer Komorbidität keine platin-basierte Chemotherapie tolerierten, erhielten eine alleinige Radiatio:

10 dieser Patienten wurden mit einer normofraktionierten Radiatio mit einer GRD von 66 Gy behandelt und 4 Patienten mit einer GRD von 50,4.

Eine palliative alleinige akzelerierte Radiatio mit einer GRD von 32 Gy wurde bei 10 Patienten dieser Studie angewandt. Die ERD betrug 2 Gy bei 2 Fraktionen/Tag im 6-stündigen Intervall (Nestle, U. *et al.*, 2001).

Bei 13 Patienten der 52 Studienteilnehmer konnte außerdem durch eine operative Resektion das Tumolvolumen reduziert werden.

Behandlungsmodus	Anzahl der Patienten n = 52
<b>Radiochemotherapie</b>	<b>28</b>
- GRD: 66,6 Gy - ERD: 1,8 Gy - Fraktionierung: 5x/Woche	13
- GRD: 50,4 Gy - ERD: 1,8 Gy - Fraktionierung: 5x/Woche	15
<b>Alleinige Radiotherapie</b>	<b>14</b>
- GRD: 66,0 Gy - ERD: 2,0 Gy - Fraktionierung: 5x/Woche	10
- GRD: 50,4 Gy - ERD: 1,8 Gy - Fraktionierung: 5x/Woche	4
<b>Palliative akzelerierte Radiotherapie</b>	<b>10</b>
- GRD: 32,0 Gy - ERD: 2,0 Gy - Fraktionierung: 10x/Woche	10

### 3.3 Evaluation der Pneumonitis

Da sich eine strahleninduzierte Pneumonitis bis zu 6 Monaten nach der Thoraxbestrahlung manifestiert, wurden die Patienten 4 Wochen nach der Radiotherapie und anschließend in 3-monatlichen Intervallen zu Nachsorgeuntersuchungen einbestellt, um eine solche und auch andere Komplikationen der Radiatio zu erkennen und zu behandeln. Die Diagnose einer radiogenen Pneumonitis wurde bei Vorhandensein von klinischen Symptomen wie unproduktiver Husten, Dyspnoe und Fieber nach Ausschluss einer Pneumonie gestellt. Nur radiologische Veränderungen waren nicht ausreichend, um eine Pneumonitis zu diagnostizieren.

Die Klassifikation der radiogenen Pneumonitis erfolgte anhand des Schemas der „Radiation Therapy Oncology Group“ und der „European Organisation for Research and Treatment of cancer“ (RTOG/EORTC), die zwischen akuten und chronischen Strahleneffekten unterscheidet und 5 Schweregrade (von 0 – 4 ) definiert:

RTOG – acute radiation morbidity scoring criteria

Schweregrad	
0	Keine Veränderung
1	Milde Symptome wie trockener Husten oder Belastungsdyspnoe
2	Persistierender Husten, behandlungspflichtig mit narkotisierenden Antitussiva/Dyspnoe bei minimaler Belastung aber nicht in Ruhe
3	Schwerer Husten, nicht ansprechbar auf narkotisierende Antitussiva, Ruhedyspnoe/klinisch radiologischer Beweis einer akuten Pneumonitis/ intermittierender Bedarf von Sauerstoff oder Steroiden
4	Schwere respiratorische Insuffizienz/kontinuierlicher Sauerstoffbedarf oder assistierte Beatmung

RTOG/EORTC – late radiation morbidity scoring sceme

Schweregrad	
0	Keine Veränderung
1	Asymptomatisch oder milde Symptome (trockener Husten)
2	Moderate symptomatische Fibrose oder Pneumonitis (schwerer Husten), niedriges Fieber; fleckförmige radiologische Veränderungen
3	Schwere symptomatische Fibrose oder Pneumonitis, dichte radiologische Veränderungen
4	Schwere respiratorische Insuffizienz/kontinuierlicher Sauerstoffbedarf/ assistierte Beatmung

### 3.4 Evaluation der Tumorprogression bzw. -remission

Um eine Veränderung der Tumorgröße zu beurteilen, wurde bei jeder Nachsorgeuntersuchung eine Thorax-Computertomographie durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte nach den Kriterien der „World Health Organisation“:

	Messbare Erkrankung
Complete Remission (CR)	Vollständiger Rückgang sämtlicher Tumorbefunde für mindestens 4 Wochen
Partial Remission (PR)	> 50 % Verkleinerung der Tumordimension für mindestens 4 Wochen, keine neuen Metastasen, keine Progression einer Läsion
No Change (NC)	< 50 % Verkleinerung der Tumordimensionen, < 25 % Vergrößerung der Tumordimensionen von einer oder mehreren Läsionen für mindestens 4 Wochen
Progressive Disease (PD)	> 25 % Vergrößerung der Tumordimensionen von einer oder mehreren Läsionen oder Auftreten neuer Läsionen

### 3.5 Probengewinnung

Den Patienten wird vor der Radiotherapie, wöchentlich während der Radiotherapie und bei den Nachsorgeuntersuchungen (1 Monat nach der Therapie, anschließend in 3-monatlichen Intervallen) bei einer Verlaufsbeobachtung von mindestens 6 Monaten Blut entnommen. Als Antikoagulanzen wird EDTA verwendet. Die Blutproben werden mit Eis gekühlt und innerhalb einer halben Stunde bei 4 °C und einer Drehgeschwindigkeit von 1000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird das Plasma gesammelt und bei – 70 °C aufbewahrt. Da nur das freie TGF-beta im Plasma bestimmt werden soll, muss darauf geachtet werden, dass alle Thrombozyten, die reich an

TGF-beta sind, entfernt werden, um eine spätere TGF-beta Freisetzung und somit eine Verfälschung des Ergebnisses zu vermeiden.

### **3.6 TGF-beta1 Bestimmung mittels ELISA**

Die Bestimmung des Zytokins TGF-beta1 erfolgte mittels ELISA. Alle Messungen wurden doppelt durchgeführt, der Mittelwert errechnet und zur weiteren statistischen Analyse verwendet. Die Ergebnisse der TGF-beta1 Messungen, die als normale Kontrollwerte ermittelt werden, entsprechen den Resultaten anderer Laboratorien, die denselben ELISA-kit verwendeten (Pantsulaia, I. *et al.*, 2004). Der Mittelwert dieser Kontrollwerte plus 2 Standardabweichungen ergeben den Referenzbereich des TGF-beta1 Wertes.

Bei dem „Enzyme linked Immuno Sorbent Assay“ handelt es sich um ein immunologisches Testverfahren, das den Nachweis von biomolekularen Substanzen oder auch niedermolekularen Substanzen ermöglicht. Es werden dabei spezielle spezifische Antikörper eingesetzt, die an das nachzuweisende Antigen binden. Der Nachweis der Antigen-Antikörperbindung erfolgt anschließend durch Antikörper-gekoppelte Enzyme, deren Aktivität durch das Auftreten einer Farbreaktion angezeigt wird. Die Stärke dieser Farbreaktion ist proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens und kann mittels eines Photometers quantifiziert werden.

Für die Bestimmung von TGF-beta1 im Plasma mittels ELISA wird folgendes benötigt:

- TGF-beta1 Mikrotiterplatten, beschichtet mit einem rekombinanten löslichen T $\beta$ RII

- TGF-beta1 Konjugat – Antikörper gegen TGF-beta1, markiert mit Peroxidasen zur Farbreaktion
- Farbreagenz
- Rekombinantes menschliches TGF-beta1 als Standard
- Pufferlösung für den Waschvorgang
- Lösung zur Beendigung des ELISA

Da nur das immunoreaktive TGF-beta1 durch diesen ELISA detektiert werden kann, muss zunächst durch folgende Maßnahmen die latente Form des TGF-beta1 in die aktive Form überführt werden: Dem Thrombozyten-armen Plasma wird eine Lösung, bestehend aus einer Säure und Harnstoff, zugefügt. Nach anschließender Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Neutralisation der angesäuerten Probe mittels eines basischen Reagenz. Der daraus resultierende pH-Wert betrug zwischen 7,2 und 7,6. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der Plasmaprobe, die später bei der TGF-beta1 Messung berücksichtigt wurde.

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden 200 µl der Standardlösung oder der aktivierten Proben pipettiert und für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließenden drei Waschvorgängen mit einer Pufferlösung wurden 200 µl des TGF-beta1 Konjugates einpipettiert und nochmals für 1 ½ Stunden inkubiert. Es erfolgten erneut drei Waschvorgänge, bevor 200 µl der Substratlösung, bestehend aus zwei Farbreagenzien hinzugefügt wurden. Nach 20-minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit 50 µl Schwefelsäure gestoppt. Nun konnte die Extinktion bei 450 nm mittels eines Photometers gemessen werden (Quantikine. Human TGF-beta1 Immunoassay).

### **3.7 Statistische Auswertung**

Um bei der statistischen Analyse eine annähernd normale Verteilung der Werte zu erhalten, wurden der Quotient aus TGF-beta1 vor und nach der Radiotherapie (TGF-beta1 end-RT/ TGF-beta1 pre-RT) und der Quotient aus dem höchsten TGF-beta1 Wert während der Radiatio und dem TGF-beta1 Wert vor der Therapie (TGF-beta1 peak-RT/ TGF-beta1 pre-RT) auf der Basis 10 logarithmiert. Anschließend wurden die Ergebnisse unter Verwendung des „Spearmanischen Korrelationskoeffizienten“ und dem korrespondierenden Test der „Nullkorrelation“ auf die unterschiedlichen Schweregrade der Pneumonitis bezogen. Um eine statistisch signifikante Aussage bei der Beurteilung der Veränderung der Tumorgröße zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Methoden verwandt: „compound symmetry assumption“ und die Kenward-Roger-Methode. Die statistischen Berechnungen wurden anhand der Software „SAS“ ausgeführt. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt, d.h. bei einem p-Wert kleiner oder gleich 0,05 konnte eine statistische Signifikanz angenommen werden.

### **3.8 Immunhistochemischer Nachweis von TGF-beta1 in Tumorbiopsien**

Die Gewebeproben der Tumorbiopsien wurden in 10 % Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend in 5 µm dicke Präparate geschnitten. Nach dem Entwachsen und der Rehydratation in Alkohol wurde Hydrogenperoxid für 30 Minuten bei Raumtemperatur hinzugefügt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterbinden. Zur Sättigung der nicht spezifisch bindenden

Enden wurden die Präparate mit normalem Kaninchenserum (cat. # 64291, Chemical Credential, Aurora, Ohio, USA; 1:5 in PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden polyklonale gegen menschliches TGF-beta1 gerichtete Huhn-Antikörper (cat. # AB-101-NA, R&D Systems, Minneapolis, USA; 1:30 dilution in Dako Antibody Diluent cat. # S3022, Dako, Glostrup, Denmark) hinzugegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert, gefolgt von der Zugabe der gegen die Huhn-Antikörper gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper vom Kaninchen (cat. # E4066, Dako; 1:200 in PBS). Nach erneuter 30-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und die anschließende Detektion von TGF-beta1 mittels Diaminobenzidin (DAB, cat. # D4293, Sigma). Schließlich wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und in Entellan eingebettet.

Die Immunaktivität von TGF-beta1 wurde folgendermaßen bewertet:

Immunaktivität	
Grad 1	Schwache, aber sichtbare Anfärbung/ fokale Anfärbung von weniger als 25 % der Tumorzellen
Grad 2	Moderate Anfärbung/ Anfärbung von 25-49 % der Tumorzellen
Grad 3	Deutliche Anfärbung/ Anfärbung von 50-74 % der Tumorzellen
Grad 4	Sehr intensive Anfärbung/ Anfärbung von mehr als 75 % der Tumorzellen

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patienten-Charakteristika

Die folgende Tabelle fasst die Charakteristika der Patienten, der malignen Erkrankung und deren Therapie zusammen:

	Anzahl der Patienten n = 52	Anteil in %
<b>Geschlecht</b>		
- männlich	41	78,8
- weiblich	11	21,1
<b>Alter</b>		
- Minimum	36 Jahre	
- Maximum	83 Jahre	
- Mittelwert	64,1 Jahre	
<b>Nikotinabusus</b>		
- Raucher	36	69,2
- Ex-Raucher	6	11,6
- Nichtraucher	1	1,9
- unbekannt	9	17,3
<b>Histologie</b>		
- Adenokarzinom	21	40,4
- Plattenepithelkarzinom	27	51,9
- andere	4	7,7
<b>Stadium</b>		
- I A	0	0
- I B	5	9,6
- II A	0	0
- II B	8	15,4
- III A	13	25,0
- III B	26	50,0
- IV	0	0
<b>Therapie</b>		
- Radiochemotherapie	28	53,9
- Radiotherapie	14	26,9
- Palliative Radiotherapie	10	19,2

### Inzidenz der radiogenen Pneumonitis:

Bezüglich des Auftretens einer symptomatischen radiogenen Pneumonitis konnten 51 Patienten ausgewertet werden:

Schweregrad der Pneumonitis nach der RTOG/EORTC	Anzahl der Patienten n = 51	Anteil in %
0	30	58,8
1	11	21,6
2	3	5,9
3	6	11,8
4	1	1,9

Insgesamt wiesen 21 der 51 ausgewerteten Studienteilnehmer innerhalb von 6 Monaten nach der Radiotherapie eine symptomatische Pneumonitis auf:

11 dieser Patienten (21,6 %) entwickelten eine radiogene Pneumonitis Grad I, 3 Patienten (5,9 %) eine Pneumonitis Grad II und 6 Patienten (11,8 %) eine Pneumonitis Grad III. Eine schwere Pneumonitis Grad IV erlitt nur eine Patientin, die eine postoperative Radiochemotherapie mit einer GRD von 50,4 Gy erhalten hatte.

Eine Patientin erkrankte während der alleinigen Radiatio an einer Pneumonie und konnte somit nicht klassifiziert werden.

Therapie	Anzahl der Patienten mit einer radiogenen Pneumonitis n = 21	Anteil in %
Radiochemotherapie	10	47,6
Alleinige Radiotherapie	8	38,1
Palliative Radiotherapie	3	14,3

Von den 21 Patienten, die eine radiogene Pneumonitis entwickelten, hatten 10 eine kombinierte Radiochemotherapie, 8 eine alleinige Radiotherapie und 3 Patienten eine palliative akzelerierte Radiatio erhalten.

## 4.2 TGF-beta1 – kein prädiktiver Wert für eine radiogene Pneumonitis

Bezüglich der Korrelation von TGF-beta1 mit dem Auftreten einer strahleninduzierten Pneumonitis ist die Betrachtung des prätherapeutischen TGF-beta1 Plasmaspiegels (pre-RT TGF-beta1), des TGF-beta1 Plasmaspiegelverlaufes sowie des TGF-beta1 Quotienten (post-RT TGF-beta1/pre-RT TGF-beta1) von Bedeutung.

### Pre-RT TGF-beta1 Plasmaspiegel

Vor Beginn der Radiotherapie wurde bei jedem Patienten dieser Studie der prätherapeutische TGF-beta1 Plasmaspiegel evaluiert. Unter der Annahme, dass ein TGF-beta1 Wert von 150 pg/ml die obere physiologische Grenze darstellt, wiesen 5 der 52 Patienten (9,6 %) einen normalen, die anderen 47 Patienten (90,4 %) einen pathologisch erhöhten TGF-beta1 Plasmaspiegel auf. Dieses Resultat ist ebenfalls in dem nachfolgendem Diagramm 1 erkennbar (grau schraffierte Fläche markiert den Referenzbereich).

Der Mittelwert des prätherapeutischen TGF-beta1 Wertes lag bei 692,66 pg/ml, der niedrigste Wert bei 116 pg/ml und der höchste bei 9242 pg/ml.

Der prätherapeutisch bestimmte TGF-beta1 Plasmaspiegel korreliert nicht mit der Inzidenz und dem Schweregrad der Pneumonitis.

## TGF-beta1 Plasmaspiegel Verlauf

In dem folgenden Kurvendiagramm wurden die unterschiedlichen TGF-beta1 Plasmaspiegel der Patienten ohne und mit einer radiogenen Pneumonitis gegen die Zeit aufgetragen, wobei zu jedem Zeitpunkt die mittlere TGF-beta1 Konzentration für jede Gruppe angegeben wird.

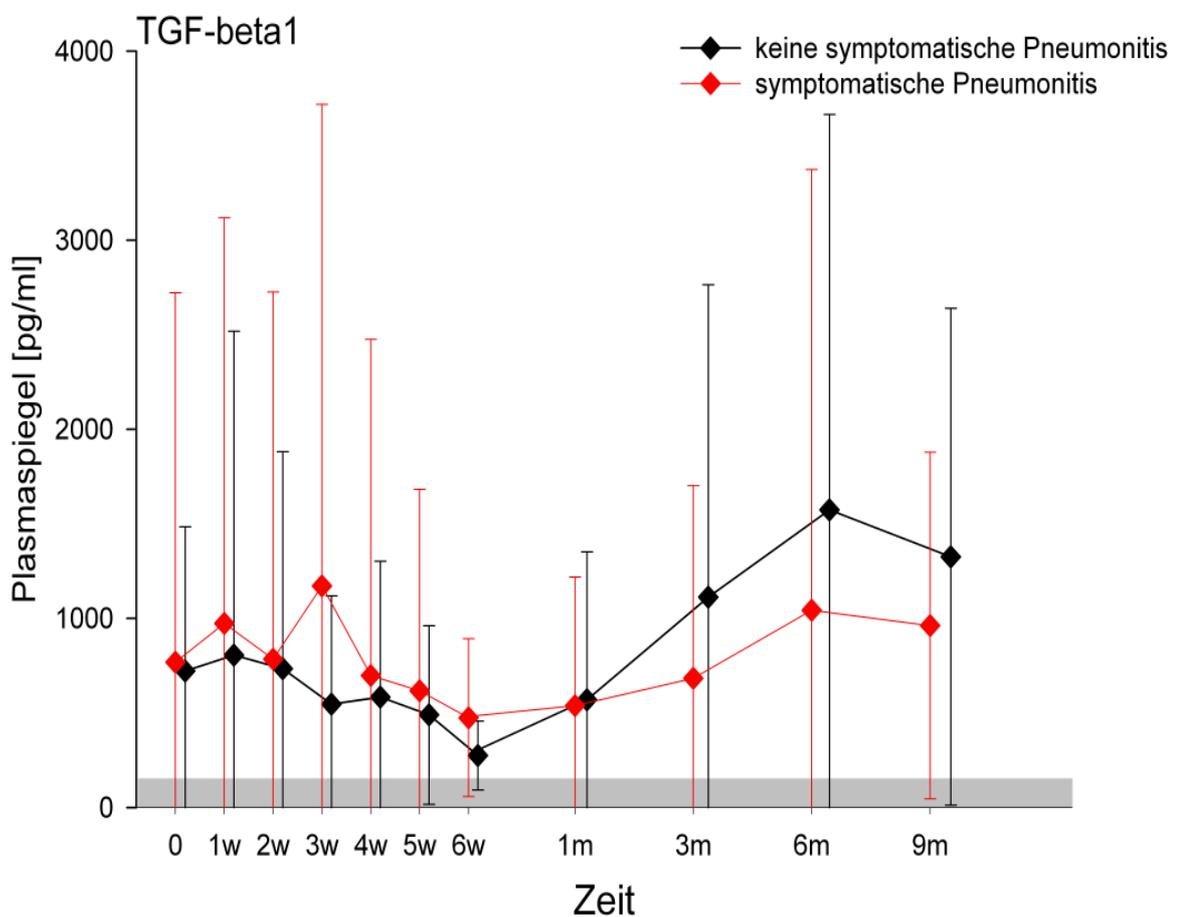


Diagramm 1

Die Differenz zwischen diesen beide Gruppen erreichte zu keinem Zeitpunkt eine statistische Signifikanz.

## TGF-beta1 Quotient

Um die Hypothese, dass ein Anstieg des TGF-beta1 Plasmaspiegels bezogen auf den vor der Radiotherapie erhobenen Wert ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der radiogenen Pneumonitis darstellt, zu überprüfen, wurde von jedem Patienten der Quotient  $\text{post-RT TGF-beta1} / \text{pre-RT TGF-beta1}$  gebildet und auf der Basis 10 logarithmiert. Diese Quotienten wurden anschließend separat für die Patienten ohne eine Pneumonitis und für die Patienten mit einer Pneumonitis, deren Schweregrad nach der RTOG/EORTC klassifiziert wurde, geplottet.

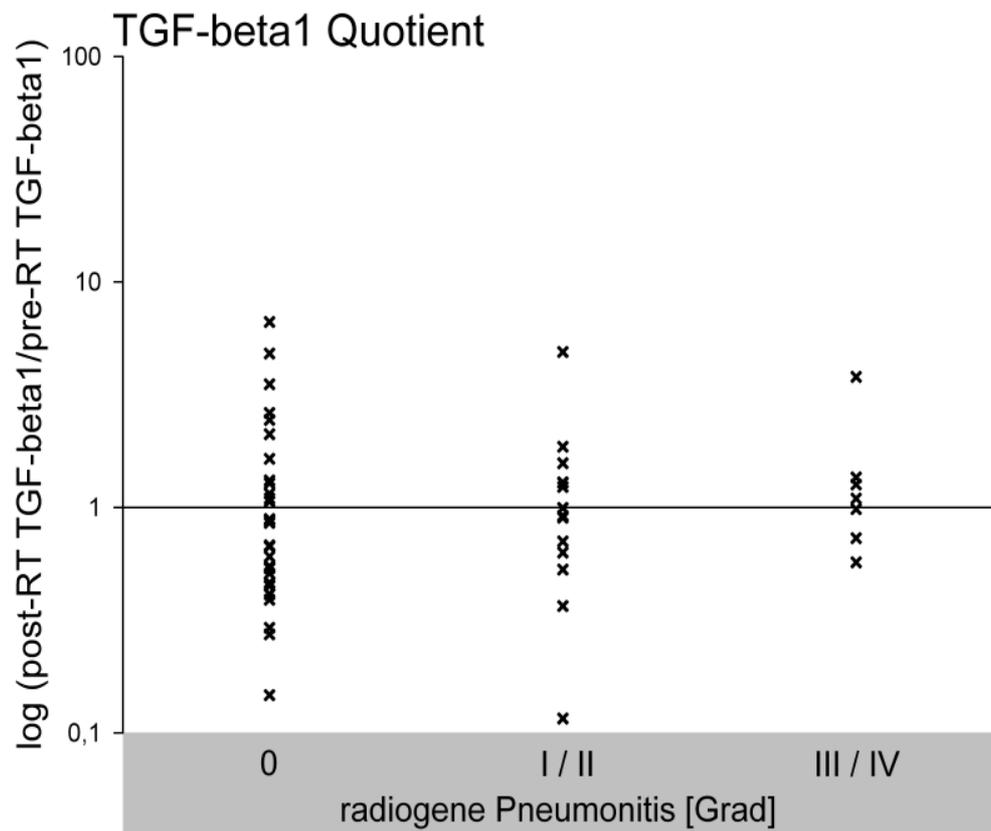


Diagramm 2

Anscher, M. S., postulierte, dass Patienten, mit einem TGF-beta1-Quotient  $> 1$  ein erhöhtes Risiko hätten, eine radiogene Pneumonitis zu entwickeln, ein

Quotient  $< 1$  hingegen identifiziere die Patienten mit einem geringem Risiko (Anscher, M. S. *et al.*, 1998).

Diese graphische Darstellung zeigt jedoch, dass es keine Korrelation des TGF-beta1 Quotienten mit der Inzidenz der radiogenen Pneumonitis gibt, da sowohl viele Patienten, die keine Symptome einer Pneumonitis aufwiesen, ebenfalls zu der definierten Risikogruppe zählten und viele Patienten, die kein erhöhtes Risiko für eine Pneumonitis haben, eine höhergradige radiogenen Pneumonitis erlitten.

Dass TGF-beta1 trotzdem an einer radiogen induzierten Gewebeschädigung beteiligt ist, kann anhand des Anstiegs des TGF-beta1 Plasmaspiegels zu Beginn der radiogenen Pneumonitis vermutet werden:

TGF-beta1 Plasmaspiegel zu Beginn der Pneumonitis gegenüber des pre-RT TGF-beta1 Wertes	Anzahl der Patienten mit einer radiogenen Pneumonitis n = 21	Anteil in %
↑	15	71,4
↓	6	28,6

Bei 15 der 21 Patienten (71,4 %), die eine radiogenen Pneumonitis entwickelten, war zu Beginn der Pneumonitis der TGF-beta1 Plasmaspiegel gegenüber des individuellen prätherapeutischen TGF-beta1 Wertes erhöht. Der niedrigste TGF-beta1 Plasmaspiegel lag bei 173 pg/ml, der höchste bei 3212 pg/ml.

Dies weist darauf hin, dass die strahleninduzierte Gewebeschädigung mit einer Erhöhung des TGF-beta1 Plasmaspiegels einhergeht.

Des weiteren konnte ein Anstieg des TGF-beta1 Plasmaspiegels bei einer Pneumonie beobachtet werden: Bei einer Patientin dieser Studie, die prätherapeutisch einen normalen TGF-beta1 Plasmaspiegel von 134 pg/ml aufwies, stieg der Plasmaspiegel bereits 2 Wochen vor Auftreten einer während

der Radiotherapie aufgetretenen Pneumonie auf 746 pg/ml an. Auch während der Pneumonie blieb der TGF-beta1 Wert erhöht, erst nach Abklingen der Entzündung sank der Wert wieder auf den Ausgangswert.

### **4.3 TGF-beta1 – ein potentieller Tumormarker**

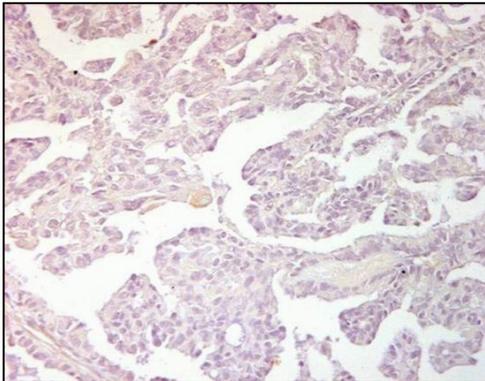
Bereits die Tatsache, dass bei 90,4 % der Patienten der prätherapeutische TGF-beta1 Plasmaspiegel erhöht war, lässt eine eigenständige TGF-beta1 Produktion der Tumorzellen vermuten.

Diese Hypothese kann sowohl durch immunhistochemische Untersuchungen der Tumorbiopsien als auch durch eine Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegels mit dem Tumoransprechen nach der Radiotherapie bestätigt werden:

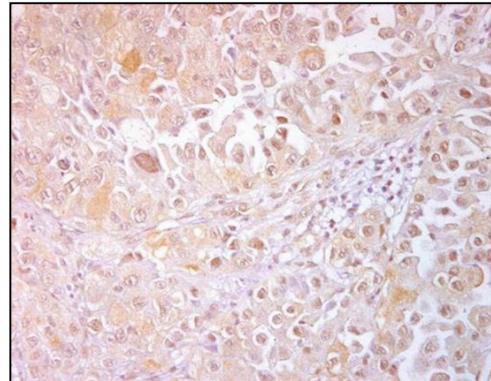
#### **4.3.1 Immunhistochemischer Nachweis der TGF-beta1 Produktion durch Tumorzellen**

Der immunhistochemische Nachweis von TGF-beta1 ergab ein sehr heterogen gefärbtes Muster. Während der Nucleus als auch das Cytoplasma der malignen Zellen eine deutlichere Farbintensität aufwiesen, zeigte die extrazelluläre Matrix eine niedrigere TGF-beta1 Immunreaktivität.

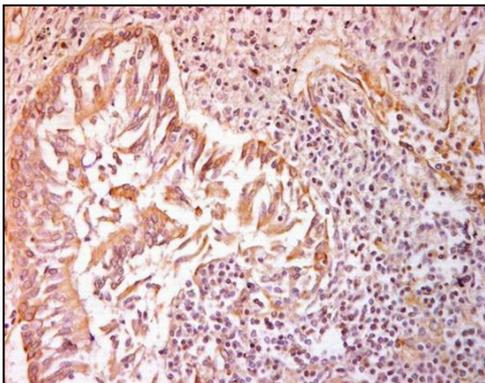
Ein Vergleich mit der histologischen Beurteilung der Tumorbiopsien verdeutlichte eine zunehmende TGF-beta1 Immunreaktivität mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad unabhängig vom histologischen Subtyp:



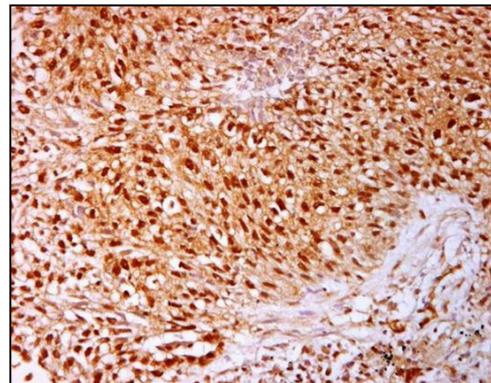
Grad 1: Adeno CA G I



Grad 2: Adeno CA G II



Grad 3: Adeno CA G III



Grad 4: PEC G IV

Abbildung 5

Immunaktivität von TGF-beta	Anzahl der Patienten n = 52	Anteil in %
1	7	13,5
1,5	2	3,8
2	20	38,5
2,5	2	3,8
3	18	34,6
3,5	2	3,8
4	1	2,0

In dem folgendem Diagramm wurde das Resultat der immunhistochemischen TGF-beta1 Immunreaktivität gegen den prätherapeutisch erhobenen TGF-beta1 Plasmaspiegel geplottet:

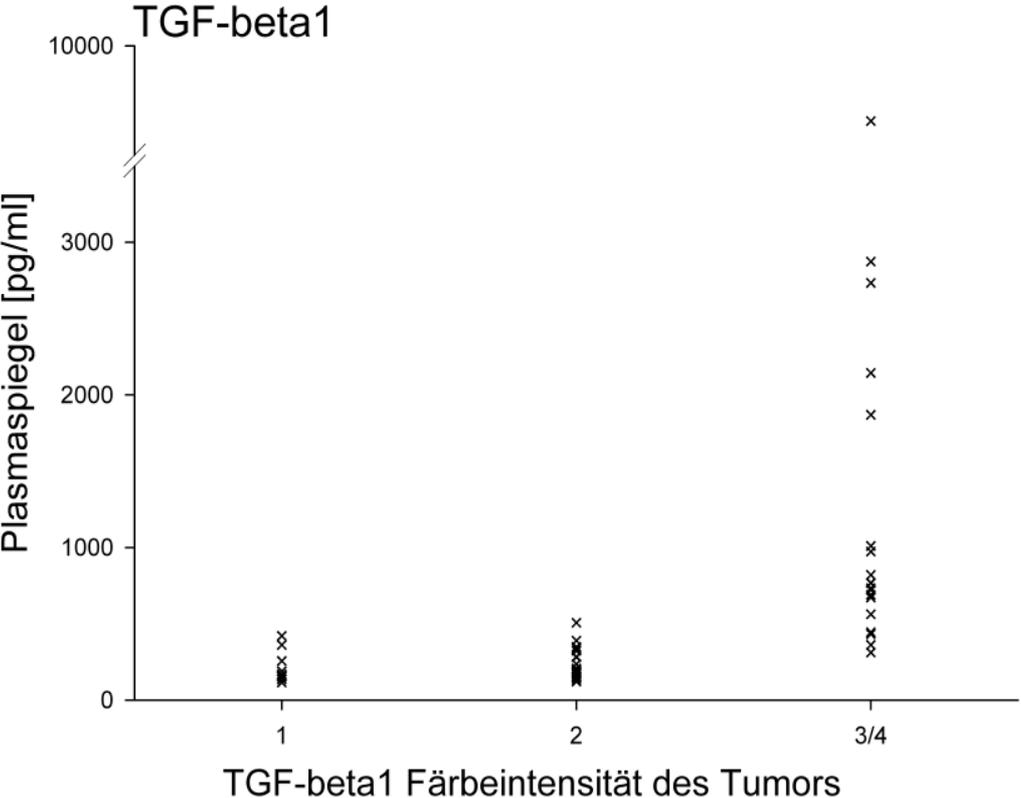


Diagramm 3

Diese graphische Darstellung zeigt eine statistisch signifikante Korrelation des prätherapeutischen TGF-beta1 Plasmaspiegels und der TGF-beta1 Immunreaktivität der entsprechenden Tumorbiopsien, was eine TGF-beta1 Freisetzung durch die malignen Zellen vermuten lässt ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.3.2 Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegels mit dem Tumoransprechen nach der Radiotherapie

In dem folgendem Diagramm wurde der TGF-beta1 Plasmaspiegel zu Zeitpunkten des Restagings gegen das Tumoransprechen nach der Radiotherapie geplottet:

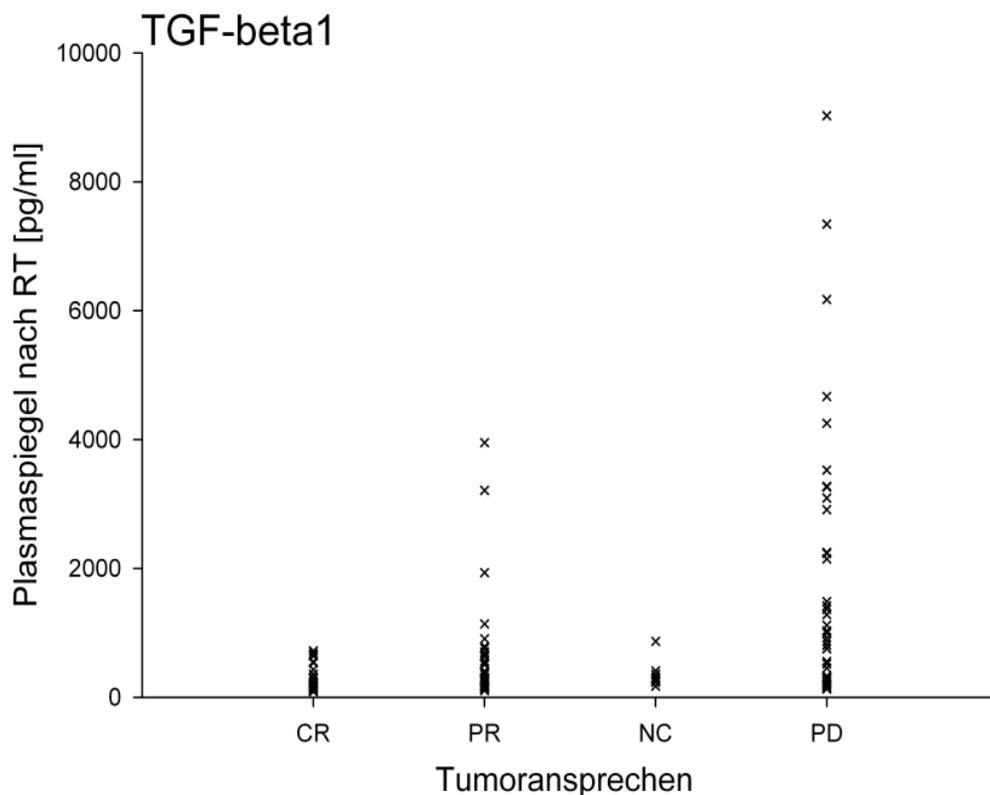


Diagramm 4

Patienten mit einem Tumorprogress wiesen im Mittel einen hochsignifikant höheren TGF-beta1 Spiegel auf als die Patienten mit einer kompletten Remission. Somit konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem TGF-beta1 Plasmaspiegel und dem Tumoransprechen nachgewiesen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Kritische Stellungnahme zur Klassifikation der radiogenen Pneumonitis

In den letzten Jahren wurden viele Studien zur Exploration von klinisch nutzbaren, sowohl physikalischen als auch biologischen Parametern, die eine Abschätzung des Pneumonitis-Risikos ermöglichen sollen, durchgeführt. Diese Parameter würden eine Diskriminierung der Patienten mit niedrigem bzw. hohem Risiko bezüglich der pulmonalen Komplikationen während einer Radiotherapie eines NSCLC und damit eine Individualisierung der Therapie ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch zum Teil recht kontrovers. Bereits die Inzidenz der radiogenen Pneumonitis weist in den verschiedenen Studien eine große Variationsbreite auf, was unter anderem auf die unterschiedlichen Patientenpopulationen, die unterschiedlichen Therapiestrategien und die Verwendung der unterschiedlichen Klassifikationssysteme zurückzuführen ist und somit einen direkten Vergleich erschwert. Diese Problematik wurde insbesondere in der von De Jaeger *et al.* veröffentlichten Studie deutlich, in der die radiogene Pneumonitis sowohl nach der „National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (CTC)“ als auch nach der „Southwest Oncology Group Criteria (SWOG)“ klassifiziert wurde. In der gleichen Patientenpopulation betrug die Inzidenz der strahleninduzierten Pneumonitis unter der Verwendung der CTC 31 %, bei Klassifizierung nach der SWOG jedoch nur 15 % (De Jaeger, K. *et al.*, 2004). In unserer Studie, wie auch in der Studie von Arpin *et al.*, die die Rolle der Interleukine bezüglich des Auftretens einer radiogenen Pneumonitis untersuchte (Arpin, D. *et al.*, 2005), wurde zur Klassifikation die RTOG/EORTC verwendet, die neben der klinischen Symptomatik auch die

radiologischen Veränderungen wie auch die objektivierbaren erforderlichen therapeutischen Maßnahmen wie den Einsatz von Steroiden und Sauerstoff berücksichtigt und dadurch eine reproduzierbare Klassifizierung ermöglicht. Des Weiteren konnte in einigen Fällen Begleiterkrankungen die Evaluation einer Pneumonitis erschweren. So konnte z. B. eine Exazerbation einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD), die eine häufige Grunderkrankung in dieser Patientenpopulation darstellt, eine ähnliche klinische Symptomatik wie die einer radiogenen Pneumonitis aufweisen bzw. die Symptome einer Pneumonitis verschleiern, was ebenfalls zu der großen Variationsbreite bezüglich der Inzidenz der radiogenen Pneumonitis Grad I und Grad II beigetragen haben könnte.

## **5.2 Vergleich mit anderen Studien**

### 5.2.1 bezüglich der Korrelation von TGF-beta1 und der radiogenen Pneumonitis

Viele in den letzten Jahren durchgeführte klinische Studien hatten das Ziel, die prognostische Bedeutung von TGF-beta1 für die radiogenen Pneumonitis im Rahmen einer Radiotherapie des NSCLC zu untersuchen, um somit die strahleninduzierte Schädigung des Lungenparenchyms auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

In tierexperimentellen Studien konnten durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen sowie durch PCR-Analysen die Mitwirkung von TGF-beta1 an inflammatorischen (Suzuki, Y. *et al.*, 1994; Rube, C. E. *et al.*, 2000) und fibrogenen Prozessen des Lungenparenchyms im

Rahmen einer Radiatio nachgewiesen werden. Durch den Einsatz unterschiedlicher spezifischer Antikörper konnte zudem gezeigt werden, dass nicht nur Entzündungen, Gewebeverletzungen und Heilungsvorgänge zu einer Aktivierung des in einer latenten Form sezernierten TGF-beta1 Komplexes, sondern auch ionisierende Strahlen führen (Barcellos-Hoff, M. H. *et al.*, 1994).

Bereits 1994 stellte Anscher als Ergebnis einer klinischen Studie die Hypothese auf, dass die Evaluation des TGF-beta1 Plasmaspiegels während der Radiotherapie eines NSCLC die Identifikation der Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine radiogene Pneumonitis ermöglicht (Anscher, M. S. *et al.*, 1994). In späteren klinischen Studien wurde jedoch diese Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegels mit der Inzidenz der radiogenen Pneumonitis in Frage gestellt (De Jaeger, K. *et al.*, 2004; Hart, J.P. *et al.*, 2005). Diese kontroversen Ergebnisse bezüglich der prognostischen Bedeutung von TGF-beta1 an der Entstehung der Pneumonitis gaben Anlass, diese von Anscher aufgestellte Hypothese zu überprüfen.

Unsere von 2002 bis 2005 durchgeführte prospektive Studie zeigte erstmals, dass der TGF-beta1 Plasmaspiegel bei 71,4 % der Patienten, die eine strahleninduzierten Pneumopathie erlitten, zu Beginn der Pneumonitis erhöht ist. Dies bestätigt Anschers Hypothese, dass eine strahleninduzierte Schädigung des Lungenparenchyms zu einer gesteigerten TGF-beta1 Expression und zu einem proportionalen Anstieg des TGF-beta1 Plasmaspiegels führt.

Die Annahme, dass TGF-beta1 an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist, konnte durch die Beobachtung eines enormen Anstiegs des TGF-beta1 Plasmaspiegels bereits vor dem Auftreten als auch im Verlauf einer Pneumonie, an der ein Studienteilnehmer erkrankte, bestärkt werden. Der zeitliche Verlauf des TGF-beta1 Anstiegs und der Manifestation der Erkrankung lässt eine aktive Mitwirkung des Zytokins an dem entzündlichen Prozess vermuten.

Sowohl der Anstieg zu Beginn der Pneumonitis bei einem Teil der Patienten sowie die enorme Erhöhung des TGF-beta1 Spiegels während einer Pneumonie verweisen somit auf eine Beteiligung des Zytokins TGF-beta1 an inflammatorischen Prozessen.

Eine prognostische Bedeutung bezüglich des TGF-beta1 Plasmaspiegel und einer symptomatischen radiogenen Pneumonitis war jedoch nicht erkennbar. Die von Anscher 1998 formulierte Hypothese, dass ein persistierender Anstieg des TGF-beta1-Plasmaspiegels bzw. der Quotient post-RT TGF-beta1/pre-RT TGF-beta1 mit der Inzidenz einer radiogenen Pneumonitis korreliert, konnte nicht bestätigt werden. Weder die Evaluation des TGF-beta1 Plasmaspiegelverlaufs noch des Quotienten erlaubten eine prognostische Beurteilung einer Pneumonitis. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der Studien von De Jaeger *et al.* und Hart *et al.* überein, die ebenfalls 2003 bestätigen konnten, dass TGF-beta1 kein prädiktiver Wert bezüglich einer symptomatischen radiogenen Pneumonitis darstellt (De Jaeger, K. *et al.*, 2004; Hart, J. P. *et al.*, 2005).

Entsprechend der Resultate mehrerer klinischer Studien (Anscher, M. S. *et al.*, 1994; De Jaeger, K. *et al.*, 2004) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass auch der prätherapeutisch bestimmte TGF-beta1-Plasmaspiegel nicht mit der Inzidenz und dem Schweregrad der Pneumonitis korreliert. Der bereits bei 90,4 % der Patienten prätherapeutisch erhöhte TGF-beta1 Wert lässt eine TGF-beta1 Produktion durch die Tumorzellen vermuten.

Demnach korreliert TGF-beta nicht mit der Inzidenz einer radiogenen Pneumonitis, jedoch ließen mehrere Studien hingegen eine Beteiligung von TGF-beta1 an den strahleninduzierten fibrogenen Prozessen vermuten. So zeigten tierexperimentelle Studien eine vermehrte TGF-beta1 Expression in fibrotischen Arealen (Rübe, C. E. *et al.*, 2000) sowie eine wesentliche

Beteiligung von TGF-beta1 an der Differenzierung von Fibroblasten zu Fibrozyten (Burger, A. *et al.*, 1998).

Auch in der von De Jaeger *et al.* geleiteten klinischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass ein persistierender Anstieg des TGF-beta1 Levels am Ende der Bestrahlung nicht mit einer akuten, sondern vielmehr mit einer chronischen morphologischen Veränderung des Lungenparenchyms korreliert (De Jaeger, K. *et al.*, 2004).

### 5.2.2 bezüglich der Korrelation von TGF-beta1 und der Tumorerkrankung

Die 2. Zielsetzung dieser Studie war die Exploration der potentiellen Korrelation von TGF-beta1 mit dem Verlauf der malignen Tumorerkrankung.

Unsere immunhistochemische Färbung des Zytokins TGF-beta1 zeigte, dass die Tumorzellen abhängig vom Differenzierungsgrad TGF-beta1 in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren. Dass die malignen Zellen selbst zur TGF-beta1 Produktion befähigt sind, entspricht den Resultaten der Studie von Asselin-Paturel, C. *et al.*. Dass sich diese TGF-beta1 Expression in einem erhöhten Plasmaspiegel widerspiegelt, wird durch die Tatsache, dass bereits bei 90,4 % der Patienten vor Therapiebeginn ein erhöhter TGF-beta1 Plasmaspiegel nachgewiesen werden konnte, verdeutlicht. Dies stimmt mit den Ergebnissen vorheriger Studien überein, in denen ebenfalls bei 50% (Kong, F. M. *et al.*, 1996), bei 51 % (De Jaeger, K. *et al.*, 2004) und bei 53 % (Anscher, M. S. *et al.*, 1998) der Patienten ein prätherapeutisch erhöhter TGF-beta1 Spiegel nachgewiesen werden konnte.

Des weiteren zeigen unsere Resultate eine statistische signifikante Korrelation zwischen dem TGF-beta1 Plasmaspiegel nach der Radiotherapie und dem Tumoransprechen. Patienten, bei denen unter der Radiotherapie ein Progress der malignen Erkrankung vorlag, wiesen einen hochsignifikant höheren TGF-beta1

Plasmaspiegel auf als Patienten mit einer kompletten Remission. Dies bestätigt Kongs Hypothese, dass bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose erhöhte TGF-beta1 Werte aufwiesen, der Plasmaspiegel dieses Zytokins mit der Tumorprogression bzw. mit der -regression korreliert (Kong, F. M. *et al.*, 1996). Dies deutet auf die Möglichkeit hin, TGF-beta1 als Tumormarker bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu verwenden.

Viele in den letzten Jahren durchgeführte klinische Studien zeigten, dass TGF-beta1 auch bei vielen anderen malignen Erkrankungen, wie z. B. beim Mammakarzinom (Ghellal, A. *et al.*), kolorektalem Karzinom (Narai, S. *et al.*), Nierenzellkarzinom (Junker, U. *et al.*), Prostatakarzinom, Blasenkarzinom (Shariat, S. F. *et al.*), malignes Melanom (Krasagakis, K.), als Tumormarker dienen kann.

In einigen dieser Studien wird außerdem die Behauptung aufgestellt, dass TGF-beta1 ebenfalls eine prognostische Aussage bezüglich des Therapieansprechens erlaubt. In einer immunhistochemischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit einem Adenokarzinom, die kein TGF-beta1 exprimierten, 56 % beträgt, bei denen mit TGF-beta1 positiven Tumoren jedoch nur 16 % (Takanami, I. *et al.*, 1994). Auch eine im Jahre 1999 von Kong *et al.* geleitete klinische Studie zeigt, dass der prätherapeutisch erhobene TGF-beta1 Plasmaspiegel vor der Radiotherapie eines NSCLC mit dem Therapieansprechen der Patienten korreliert (Kong, F. M. *et al.*, 1999). Da sich das Resultat von Kong jedoch nur auf eine Analyse von 59 Patienten stützt, sind weitere Studien erforderlich, um diese Aussage zu verifizieren.

### **5.3 Kritische Stellungnahme zur Verwendung von TGF-beta1 als Tumormarker**

Tumormarker sind Substanzen, die entweder von malignen Tumorzellen unmittelbar synthetisiert werden oder deren Produktion in gesunden Zellen durch die Tumorzellen induziert wird und somit der Plasmaspiegel dieser Marker Auskunft über den Verlauf der Erkrankung gibt.

Der prätherapeutisch erhöhte TGF-beta1 Plasmaspiegel, der immunhistochemische Nachweis der TGF-beta1 Expression durch Tumorzellen sowie die positive Korrelation der TGF-beta1 Konzentration mit dem Tumoransprechen nach der Radiotherapie deuten auf die Möglichkeit hin, TGF-beta1 beim NSCLC als Tumormarker zu verwenden und damit durch eine einfache Blutentnahme den Verlauf der Tumorerkrankung bezüglich einer Progression oder Regression zu kontrollieren. Dies würde dem Patienten zusätzliche bildgebende Verfahren, die zur Verlaufsbeobachtung bisher erforderlich waren, ersparen.

Um TGF-beta1 als Tumormarker verwenden zu können, muss sowohl in der immunhistochemischen Untersuchung eine TGF-beta1 Expression als auch ein prätherapeutisch erhöhter TGF-beta1 Plasmaspiegel nachgewiesen werden können. Bei jedem Patienten ist es zudem erforderlich, einen individuellen Basiswert, in der Regel der prätherapeutisch erhobene Wert, zu ermitteln, da die Beurteilung des prozentualen Anstiegs bzw. Abfalls und nicht die Beurteilung des Einzelwertes gegenüber einem festgelegten Referenzbereich das empfindliche diagnostische Kriterium darstellt (Labor und Diagnose, Lothar Thomas, 2000). Somit ist anhand des TGF-beta1 Plasmaspiegels während oder nach erfolgter Behandlung eine Abschätzung des Therapieerfolges möglich.

Da die Halbwertszeit von TGF-beta1 nur sehr kurz ist – in der aktiven Form beträgt sie 2-3 min, in der inaktiven Form 100 min (Wakefield, L. M. *et al.*,

1990) – und somit der TGF-beta1 Plasmaspiegel unmittelbar den aktuellen Zustand der Tumorerkrankung angibt, ist eine Kontrolluntersuchung sofort zum Zeitpunkt des erwarteten Therapieerfolges möglich. Allerdings ist eine Beachtung von Begleiterkrankungen des Patienten, die zu einer Verzögerung der TGF-beta1 Clearance führen können, erforderlich, um ein falsch-positives Ergebnis zu vermeiden. So ist z. B. bei Patienten nach einer partiellen Hepatektomie der Abbau von TGF-beta1 um 80 % verzögert (Coffey R. J. *et al.*, 1987), was eine Kontrolluntersuchung zu einem späteren Zeitpunkt erfordert. Steigt nach Normalisierung der TGF-beta1 Konzentration der Plasmaspiegel wieder an, ist eine Progression der Tumorerkrankung wahrscheinlich und indiziert eine weitergehende Diagnostik. Somit kann durch eine einfach durchführbare und konsequente Verlaufsbeobachtung frühzeitig ein Rezidiv erkannt werden und dadurch die therapeutischen Möglichkeiten als auch die Prognose entscheidend verbessert werden.

Die Verwendung von TGF-beta1 als Tumormarker wird jedoch dadurch erschwert, dass es neben dem Verlauf der Tumorerkrankung weitere Faktoren gibt, die den TGF-beta1 Plasmaspiegel beeinflussen und daher berücksichtigt werden müssen:

- Inflammatorische Prozesse, z. B. eine strahleninduzierte symptomatische Pneumonitis oder eine infektiöse Pneumonie können bei einem Teil der Patienten zu einer Erhöhung der TGF-beta1 Konzentration führen.
- Ein während der Radiotherapie erhöhter TGF-beta1 Plasmaspiegel kann auf einen Tumorzerfall zurückzuführen sein.
- Andere Begleiterkrankungen können ebenfalls zu einem Anstieg des TGF-beta1 Plasmaspiegels führen, z. B.
  - Arterielle Hypertonie (Derhaschnig, U. *et al.*, 2002),
  - Koronare Herzkrankheit (KHK) (Wang X. L. *et al.*, 1997),
  - Lebererkrankungen (Coffey R. J. *et al.*, 1987),

- Wundheilung (Peters, T. *et al.*, 2005),
- fibrosierende Erkrankungen (Burger, A. *et al.*, 1998) sowie
- andere Tumorerkrankungen.

Ein während der Radiotherapie erhöhter TGF-beta1 Wert kann somit entweder Ausdruck einer radiogen induzierte Gewebeschädigung oder Hinweis auf ein fehlendes Tumoransprechen auf die Radiotherapie sein. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das zirkulierende TGF-beta1 bei Patienten mit einem fortgeschrittenen NSCLC überwiegend von Tumorzellen exprimiert wird. Die daraus resultierende erhöhte TGF-beta1 Konzentration weist somit eher auf ein Therapieversagen und einen Tumorprogress hin und überlagert meist eine geringe zusätzliche TGF-beta1 Freisetzung als Folge der radiogen induzierten Gewebeschädigung, die somit schwer erfassbar und eher zu vernachlässigen ist. Jedoch ist zu bedenken, dass die TGF-beta1 Produktion der Tumorzellen eine hohe Heterogenität aufweist und die in einer Tumorbiopsie hohe TGF-beta1 Expression nicht prinzipiell mit einer ausgeprägten TGF-beta1 Produktion der gesamten Tumormasse und einem daraus resultierendem hohen TGF-beta1 Plasmaspiegel korreliert.

Aufgrund dieser Heterogenität der TGF-beta1 Produktion sowie aufgrund fehlender Organ- und Krankheitsspezifität ist die Verwendung von TGF-beta1 als Tumormarker im klinischen Alltag fraglich.

## **5.4 Schlussfolgerung**

Das Resultat dieser klinischen Studie bestätigt nicht, dass der Plasmaspiegel des Zytokins TGF-beta1 eine prognostische Bedeutung für das Auftreten einer radiogen induzierte Pneumonitis im Rahmen einer Strahlentherapie eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms besitzt. Somit gestattet TGF-beta1 nicht die Identifikation von Patienten mit einem erhöhten Pneumonitisrisiko während der Radiatio.

Des weiteren zeigt die Studie eine Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegels mit der TGF-beta1 Expression der Tumorzellen sowie mit dem Tumoransprechen nach der Radiotherapie. Dies weist auf eine potentielle Verwendung des Zytokins TGF-beta1 als Tumormarker bei einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom hin, die jedoch aufgrund der Heterogenität der TGF-beta1 Expression im Tumorgewebe sowie aufgrund fehlender Organ- und Krankheitsspezifität erschwert ist.

## 6. Verzeichnis der Abbildungen und Diagramme

- Abbildung 1: Beispiel für die Dosisverteilung bei einem zentral lokalisiertem Bronchialkarzinom im Rahmen einer dreidimensionalen Bestrahlungsplanung
- Abbildung 2: Dosis-Volumen-Histogramm
- Abbildung 3: radiogene Pneumonitis im Röntgen- und CT-Thorax
- Abbildung 4: Strahlenfibrose im Röntgen- und CT-Thorax (Lunge im Netz)
- Abbildung 5: dreidimensionale Struktur von TGF-beta 1 (Hinck AP, Archer SJ, Quian SW, Roberts AB, Sporn MB, Weatherbee JA, Tsang ML, Lucas R, Zhang BL, Wenker J, Torchia DA (1996) Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2 Biochemistry 35:8517-34)
- Abbildung 6: TGF-beta vermittelte Effekte (Siegel PM, Massagué J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer 3:807-821)

- Abbildung 7: Quantifizierung der Färbeintensität der TGF-beta1 Immunhistologie bei NSCLC Tumorbiopsien Adenokarzinom (AC), Plattenepithelkarzinom (PEC)
- Diagramm 1: Korrelation des TGF-beta1 Plasmaspiegelverlaufs mit dem Auftreten einer symptomatischen radiogenen Pneumonitis, wobei zu jedem Zeitpunkt die mittlere TGF-beta1 Konzentration für jede Gruppe angegeben wird.
- Diagramm 2: Korrelation der TGF-beta1 Quotienten mit dem Auftreten einer symptomatischen radiogenen Pneumonitis: Die TGF-beta1 Plasmaspiegel am Ende der Radiotherapie wurden durch die entsprechenden prätherapeutischen Werte dividiert und logarithmiert. Die Quotienten wurden separat für die Patienten ohne Pneumonitis und mit Pneumonitis Grad I, II, III und IV aufgeführt.
- Diagramm 3: Korrelation der vor Beginn der Radiotherapie gemessenen TGF-beta1 Plasmaspiegel mit der TGF-beta1 Färbeintensität des Tumors (Grad 1-4)
- Diagramm 4: Korrelation der nach Radiotherapie gemessenen TGF-beta1 Plasmaspiegel mit dem Tumoransprechen nach der Radiotherapie (CR =Complete Remission, PR = Partial Remission, NC =No Change, PD = Progressive Disease)

## 7. Literaturverzeichnis

1. Tod durch Lungenkrebs – bei Frauen keimt etwas Hoffnung auf. Ärzte Zeitung (13.07.2005)
2. Anscher MS, Murase T, Prescott DM, Marks LB, Reisenbichler H, Bentel GC, Spencer D, Sherouse G, Jirtle RL (1994) Changes in plasma TGF- $\beta$  levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30:671-67
3. Anscher MS, Kong FM, Andrews K, Clough R, Marks LB, Bentel G, Jirtle RL (1998) Plasma transforming growth factor  $\beta$  1 as a predictor of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 41:1029-1035
4. Arpin D, Perol D, B JY, Falchero L, Claude L, Vuillermoz-Blas S, Martel-Lafay I, Ginestet C, Alberti L, Nosov D, Etienne-Mastroianni B, Cottin V, Perol M, Guerin JC, Cordier JF, Carrie C (2005) Early Variations of Circulating Interleukin-6 and Interleukin-10 Levels During Thoracic Radiotherapy Are Predictive for Radiation Pneumonitis. *J Clin Oncol* 23:8748-8756
5. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunewald D, Chouaib S, Mami-Chouaib F (1998) Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF- $\beta$  1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 77:7-12
6. AWMF Leitlinien: Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft: Therapie des SCLC (Nr. 032/006, aktueller Stand 01/2004, gültig bis 06/2006), Therapie des NSCLC (Nr. 032/007, aktueller Stand 01/2004, gültig bis 06/2006)
7. Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA (1994) Transforming growth factor- $\beta$  activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 93:892-899

8. Burger A, Loffler H, Bamberg M, Rodemann HP (1998) Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* 73:401-408
9. Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Berdel W (1994) *Innere Medizin*. Urban und Fischer, München, Jena
10. Coffey RJ, Kost LJ, Lyons RM, Moses HL, La-Russo MF (1987) Hepatic processing of TGF- $\beta$  in rat. Uptake, metabolism and biliary excretion. *J Clin Invest* 80:750-757
11. De Jaeger K, Seppenwolde Y, Kampinga HH, Boersma LJ, Belderbos JS, Lebesque JV (2004) Significance of Plasma Transforming Growth Factor- $\beta$  Levels in radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5:1378-1387
12. Derhaschnig U, Shehata M, Herkner, Bur A, Woisetschlager C, Laggner AN, Hirschl MM (2002) Increased levels of transforming growth factor-beta 1 in essential hypertension. *Am J Hypertens* 15:207-211
13. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. (2001) TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet* 29:117-129
14. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- $\beta$  1 knock out mice. *Development* 121:1845-1854
15. Fine A, Goldstein RH (1987) The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem*. 262:3897-3902
16. Ghellal A, Li C, Hayes M, Byrne G, Bundred N, Kumar S (2000) Diagnostic significance of TGF-beta 1 and TGF-beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer* 20:4413-4418
17. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21. *Science* 271:350-353

18. Hart JP, Broadwater G, Rabbani Z, Moller BJ, Clough R, Huang D, Sempowski GA, Dewhirst M, Pizzo SV, Vujaskovic Z, Anscher MS (2005) Cytokine profiling for prediction of symptomatic radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63:1448-1454
19. Herold G (eds) (2005) *Innere Medizin*, Köln
20. Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP (1998) The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 3:12-15
21. Hinck AP, Archer SJ, Quian SW, Roberts AB, Sporn MB, Weatherbee JA, Tsang ML, Lucas R, Zhang BL, Wenker J, Torchia DA (1996) Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* 35:8517-34
22. Jhappan C, Geiser AG, Kordon EC, Bagheri D, Hennighausen L, Roberts AB, Smith GH, Merlino G (1993) Targeting expression of a transforming growth factor  $\beta$  1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactatio. *EMBO J.* 12:1835-1845
23. Junker U, Knoefel B, Nuske K, Rebstock K, Steiner T, Wunderlich H, Junker K, Reinhold D (1996) Transforming growth factor  $\beta$  1 is significantly elevated in plasma of patients suffering from renal cell carcinoma. *Cytokine* 8:794-798
24. Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL (1995) Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 level in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 222:155-162
25. Kong FM, Washington MK, Jirtle RL, Anscher MS (1996) Plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 reflects disease status in patients with lung cancer after radiotherapy: a possible tumor marker. *Lung Cancer* 16:47-59

26. Kong F, Jirtle RL, Huang DH, Clough RW, Anscher MS (1999) Plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 level before radiotherapy correlates with long term outcome of patients with lung carcinoma. *Cancer* 86:1712-1719
27. Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Manmann U, Orfanos CE (1998) Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta 1 and TGF-beta 2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 77:1492-1494
28. Kulkarni AB, Hugh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S (1993) Transforming growth factor  $\beta$ 1 null mutation in mice causes inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:770-774
29. Lebeau B, Urban T, Brechot JM, Paillot D, Vincent J, Leclerc P, Meekel P, L'Her P, Lebas FX, Chastang C (1999) A randomised clinical trial comparing concurrent and alternating thoracic irradiation for patients with limited small cell lung carcinoma. "Petites Cellules" Group. *Cancer* 86 :1480-1487
30. Lin Y, Kikuchi S, Obata Y, Yagyu K ; Tokyo Research Group on Prevention of Gastric Cancer (2006) Serum levels of transforming growth factor beta1 are significantly correlated with venous invasion in patients with gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 21:432-437
31. Martin M, Lefaix JL, Delanian S. (2000) TGF- $\beta$ 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target. *Int J Radiat Oncol Bio Phys* 47:277-290
32. Massagué J, Blain SW, Lo RS. (2000) TGF $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103:295-309
33. Müller M (eds) (2004/05) *Chirurgie für Studium und Praxis*, Breisach
34. Narai S, Watanabe M, Hasegawa H, Nishibori H, Endo T, Kubota T, Kitajima M (2002) Significance of transforming growth factor beta1 as a new tumor marker for colorectal cancer. *Int J Cancer* 97:508-511

35. Nestle U, Nieder C, Walter K, Abel U, Ukena D, Sybrecht GW, Schnabel K (2001) A palliative accelerated irradiation regimen for advanced non-small-cell lung cancer vs. conventionally fractionated 60 GY : results of a randomized equivalence study. *Int J Radiat Oncol Phys* 48:95-103
36. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E (1996) TGF- $\beta$ 1 and H-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* 10:2462-2477
37. Oshima M, Oshima H, Taketo MM (1996) TGF- $\beta$  receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculoogenesis. *Dev Biol* 179:297-302
38. Pierce DF Jr, Johnson MD, Matsui Y, Robinson SD, Gold LI, Purchio AF, Daniel CW, Hogan BL, Moses HL (1993) Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF- $\beta$  1. *Genes Dev* 7:2308-2317
39. Pignon JP, Arriagada R, Ihde DC, Johnson DH, Perry MC, Souhami RL, Brodin O, Joss RA, Kies MS, Lebeau B et al. (1992) A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 327:1618-1624
40. Pantsulaia I, Trofimov S, Kalichman L, Kobylansky E, Livshits G (2004) The contribution of familial resemblance to variation in circulatory levels of tissue inhibitors of metalloproteinases and transforming growth factor-beta1. *Calcif Tissue Int* 74:47-54
41. Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EA, Holzwarth K, Oreshkova T, Wang H, Kess D, Walzog B, Sulyok S, Sunderkotter C, Friedrich W, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K (2005) Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. *EMBO J* 24:3400-3410.

42. Port Meta-Analysis Trialists Group (1998) Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: Systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised clinical trials. *Lancet* 352:257-263
43. Quantikine. Human TGF- $\beta$ 1 Immunoassay. Catalog Number DB100. For the quantitative determination of activated human transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) concentrations in cell culture supernate, serum, and plasma.
44. Reiser M, Kuhn FP, Debus J (2004) *Radiologie. Duale Reihe*, Thieme, Stuttgart
45. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (eds) (2004) *Basislehrbuch Innere Medizin*. Urban und Fischer, München, Jena
46. RTOG Late Effects Working Group (1995) LENT SOMA scales for all anatomic sites. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:1049-1091
47. Rube CE, Uthe D, Schmid KW, Richter KD, Wessel J, Schuck A, Willich N, Rube C et al. (2000) Dose-dependent induction of Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47:1044-1042
48. Saunders M, Dische S, Barraett A, Harvey A, Gibson D, Parmar M (1997) Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial. *Lancet* 350:156-157
49. Shariat SF, Shalev M, Menessees-Diaz A, Kim IY, Kattan MW, Wheeler TM, Slawin KM (2001) Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 19:2856-2864

50. Shariat SF, Kim JH, Andrews B, Kattan MW, Wheeler TM, Kim IY, Lerner SP, Slawin KM (2001) Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) strongly predict clinical outcome in patients with bladder carcinoma. *Cancer* 92:2985-2992
51. Shim KS, Kim KH, Han WS, Park EB (1999) Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer* 85:517-519
52. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G Calvin D et al (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$  1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699
53. Siegel PM, Massagué J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3:807-821
54. Suzuki Y, Tanigaki T, Heimer D, Wang W, Ross WG, Murphy GA, Sakai A, Sussmann HH, Vu TH, Raffin TA (1994) TGF-beta 1 causes increased endothelial ICAM-1 expression and lung injury. *J Appl Physiol* 77:1281-1287
55. Takanami I, Imamura T, Hashizume T, Kikuchi K, Yamoto Y, Kodaira S (1994) Transforming growth factor beta 1 as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 47:1098-1100
56. Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kodaira S (1997) Roles of the transforming growth factor  $\beta$ 1 and its type I and II receptors in the development of a pulmonary adenocarcinoma: results of an immunohistochemical study. *J Surg Oncol* 64:262-267

57. Taylor NA, Liao ZX, Cox JD, Stevens C, Roth J, Walsh G, Chang JY, Guerrero T, Jeter M, Putnam J Jr, Fossella FV, Allen P, Komaki R (2004) Equivalent outcome of patients with clinical stage IIIA non-small-cell lung cancer treated with concurrent chemoradiation compared with induction chemotherapy followed by surgical resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:204-212
58. Thomas L (2000) *Labor und Diagnose*. 5. erweiterte Auflage. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main
59. Thomas M, Baumann M, Deppermann M, Freitag L, Gatzemeier U, Huber R, Passlick B, Serke M, Ukena D (2002) Empfehlungen zur Therapie des Bronchalkarzinoms. *Pneumologie* 56:113-131
60. Travis EL, Komaki R. (1996) Treatment-related lung damage. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH (eds). *Lung cancer: principles and practice*. Philadelphia: Lippincott-Raven.
61. Turrisi A, Kim K, Blum R, Sause WT, Livingston RB, Komaki R, Wagner H, Aisner S, Johnson DH (1999) Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell-lung cancer treated currently with cisplatin and etoposide. *N Engl J Med* 340:265-271
62. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA (1987) Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247:597-604
63. Vokes EE, Herndon JE, Crawford J, Leopold KA, Perry MC, Miller AA, Green MR (2002) Randomized phase II study of cisplatin with gemcitabine or paclitaxel or vinorelbine as induction chemotherapy followed by concomitant chemoradiotherapy for stage IIIB non-small-cell-lung cancer: Cancer and Leukemia Group B study 9431. *J Clin Oncol* 20:4191-4198

64. Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD, Sporn MB (1990) Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1 and a different tissue distribution. *J Clin Invest* 86:1976-1984
65. Wang XL, Liu SX, Wilcken DE (1997) Circulating transforming growth factor beta 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 34:404-410
66. Wisnivesky JP, Bonomi M, Henschke C, Ianuzzi M, McGinn T (2005) Radiation therapy for the treatment of unresected stage I-II non-small cell lung cancer. *Chest.* 128:1461-1467
67. Xiong B, Gong LL, Zhang F, Hu MB, Yuan HY (2002) TGF beta1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol.* 8:496-498

## 8. Publikationen/Dank

### Publikation:

Die Studienergebnisse wurden zur Veröffentlichung im „International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics“ eingereicht.

### Dank:

Hiermit möchte ich mich recht herzlich bei Frau PD Dr. med. Claudia E. Rube für die sehr gute Betreuung dieser klinischen Studie bedanken. Ihre gute Anleitung, Erklärungen und ihr Zeitaufwand erlaubten, ein gutes Resultat in dieser Studie zu erzielen. Unter ihrer Betreuung erlangte ich viele Kenntnisse der wissenschaftlichen Arbeit, die eine sehr gute Grundlage für weitere zukünftige Studienarbeiten darstellen.

Ich möchte mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. med. Ch. Rube bedanken, der als Chefarzt der Strahlentherapie die Durchführung dieser Studie in seiner Klinik ermöglichte. Herzlichen Dank auch an die gesamte Belegschaft – Ärzte, Pflegepersonal und Physiker – der Strahlentherapie, die mich sehr unterstützte. Insbesondere möchte ich auch Herrn J. Palm danken, der mir sowohl im klinischen Bereich bei der Aufnahme der Patienten in diese Studie als auch bei der Darstellung der Diagramme sehr hilfreich war.

Ganz besonders möchte ich Frau PD Dr. med. C. E. Rube und Herr Prof. Dr. med. Ch. Rube dafür danken, dass sie mir einen Aufenthalt in Wuhan, China, ermöglichten, der mir neben neuen Erfahrungen im klinischen Bereich in der Radioonkologie von Wuhan auch den Einblick in ein anderes Land und eine andere Kultur erlaubte.

Ebenso bin der Belegschaft der Pathologie, Homburg, sehr dankbar, die mich bei der Auswertung der Histologie und Immunhistochemie sehr unterstützte.

Vielen Dank auch an Herrn J. König, aus dem Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie, und medizinische Informatik, Homburg, der mir sehr bei der statistischen Auswertung der Daten geholfen hat.

Herzlichen Dank auch an meine Kommilitonin und Mitdotorandin Claudia Böttger für die gute Zusammenarbeit an dieser Studie.

Schließlich möchte ich natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Verständnis Danke sagen.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Nachname: Gompelmann  
Vorname: Daniela Rosa  
Geb. am: 26.02.1982  
Geburtsort: Prüm  
Adresse: Steinhübel 13,  
66424 Homburg

### Ausbildung:

1988-1992: St. Gertrud-Schule Lünebach, Grundschule, Deutschland  
1992-2001: Regino-Gymnasium Prüm, Deutschland  
Oktober 2001: Beginn des Medizinstudiums in der Universitätsklinik des  
Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland  
September 2003: 1. Staatsexamen (Ärztliche Vorprüfung)  
August 2006: Beginn des Praktischen Jahres

### Medizinische Erfahrungen:

März 2004: Famulatur in der Strahlentherapie  
Universitätsklinik Homburg/Saar, Deutschland  
Juli 2004: Famulatur in der Pädiatrie  
Praxis, Prüm, Deutschland

- August 2004: Famulatur in der Neurologie  
Universitätsklinik Homburg/Saar, Deutschland
- März 2005: Famulatur in der Radioonkologie, Akupunktur und  
Traditionelle chinesische Medizin  
Tongii Medical College,  
Huazhong university of science and technology  
Wuhan, China
- September 2005: Famulatur in der Inneren Medizin  
Evangelisches Krankenhaus, Zweibrücken, Deutschland
- März 2006: Famulatur in der Anästhesiologie  
Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australien