

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Auswirkungen ionisierender Strahlung auf das
Proliferationsverhalten humaner fetaler Lungenfibroblasten
im Ko-Kultur-Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Ulrike Hoffmann
aus
Erfurt

Würzburg, August 2002

Referent: Professor Dr. med. M. Schmidt

Koreferent: Professor Dr. med. G. Ertl

Dekan: Professor Dr. med. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2002

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhalt

Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Thorakale Radiatio und deren Nebenwirkungen	1
1.2	Rolle der Fibroblasten	1
1.3	Einfluß von Transforming Growth Factor-beta	2
1.4	Aufgabenstellung und Ziele dieser Arbeit	3
2	Material und Methoden	5
2.1	Versuchsprinzip	5
2.2	Zellkultur	6
2.3	Bestrahlung	6
2.4	Zugabe von Transforming Growth Factor-beta	7
2.5	Meßzeitpunkte	7
2.6	Proliferationsmessung	8
2.7	Bestimmung der Sekretionsleistung für Transforming Growth Factor-beta, Fibronectin und Prokollagen-I-Peptid	11
2.8	Ergebnisse und statistische Auswertung	12
3	Ergebnisteil	13
3.1	Auswirkungen von Radiatio auf das Proliferationsverhalten von Fibroblasten in Ko-Kultur	13
3.2	Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von Fibroblasten in Ko- Kultur durch Zugabe von Transforming Growth Factor-beta	24
3.2.1	Proliferationsverhalten von Fibroblasten in den Inserts der Ko-Kultur nach direktem Kontakt zu Transforming Growth Factor-beta	24
3.2.2	Proliferationsverhalten von Fibroblasten in den Wells der Ko-Kultur ohne direkten Kontakt zu Transforming Growth Factor-beta	26

4 Diskussion	29
4.1 Verhalten von kultivierten humanen fetalen Lungenfibroblasten nach Radiatio, Beeinflussung des Proliferationsverhaltens durch ionisierende Gamma-Strahlen.....	29
4.2 Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Fibroblasten in Ko-Kultur.....	34
4.3 Bedeutung von Cytokinen bei den reaktiven Vorgängen nach Einwirkung ionisierender Strahlung.....	38
4.3.1 Modell der Cytokinkaskade nach Radiatio.....	38
4.3.2 Transforming Growth Factor-beta.....	41
4.4 Einfluß von Transforming Growth Factor-beta auf das Proliferationsverhalten humaner fetaler Lungenfibroblasten in vitro.....	45
4.5 Schlußfolgerungen und mögliche Bedeutung für frühzeitige Diagnostik und Therapie der radiogenen Lungenfibrose.....	50
5 Zusammenfassung	53
6 Literatur	55

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

CO ₂ :	Kohlendioxid
Co 60:	Cobalt 60
CTGF:	connective tissue growth factor
DME:	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA:	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA:	enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS:	fetal calf serum
FGF:	fibroblast growth factor
b-FGF:	basic fibroblast growth factor
FHA:	Fokus-Herd-Abstand
G1-Phase	postmitotische Ruhephase des Zellzyklus
Gy:	Gray
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF:	insuline-like growth factor
IL-1 etc.:	Interleukin-1 etc.
LAP:	latency associated peptide
LTBP:	latent TGF-β-binding protein
MCP:	monocyte chemotactic protein
MF:	mitotic fibroblasts
m-RNA	messenger ribonucleic acid
NKZ	Natürliche Killerzellen
NO:	Stickstoffmonoxid
PBS:	Dulbecco's phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PDGF:	platelet derived growth factor
PMF:	postmitotic fibrocytes
S-Phase	Phase der DNA-Verdopplung des Zellzyklus
TβR-I bis III:	TGF-β-Rezeptoren Typ I bis III
TGF-β:	Transforming Growth Factor-beta
TNF-α:	Tumornekrosefaktor alpha

1 Einleitung

1.1 Thorakale Radiatio und deren Nebenwirkungen

Ein grundlegender Bestandteil der Therapie thorakaler Malignome stellt die Bestrahlung dieser Tumore dar. Dazu werden maligne Neoplasien wie das Mammakarzinom, das Bronchialkarzinom und auch mediastinale Tumore wie die Gruppe der Hodgkin-/Non-Hodgkin-Lymphome gezählt. Eine häufig das Therapieausmaß limitierende Nebenwirkung der Radiatio besteht in dem Auftreten einer Lungenschädigung, bedingt durch die ionisierenden Strahlen. Diese kann sich als radiologisch nachweisbare Verdichtung des Lungengewebes (ca. 43 % aller Patienten), als symptomatische Pneumonitis mit Dyspnoe, Husten und Fieber (7 bis 20 % der Patienten) oder als Lungenfibrose (bis 39 % der Patienten nach mehreren Jahren) manifestieren. Die verschiedenen Formen der Schädigung können zeitlich nacheinander, aber auch einzeln und unabhängig voneinander auftreten [(54); (48); (75)]. Das Auftreten und das Ausmaß der pulmonalen Veränderungen nach Radiatio hängen von verschiedenen Risikofaktoren wie verabreichte Gesamtdosis, Art der Dosenfraktionierung, Größe und Lokalisation des bestrahlten Lungenvolumens, vorausgegangene Bestrahlungen, begleitende Chemotherapie oder Bestehen pulmonaler Vorerkrankungen ab [(48); (65); (76); (75)].

1.2 Rolle der Fibroblasten

Die ortsständigen Bindegewebszellen der Lunge, die Fibroblasten, haben einen aktiveren Anteil an den Veränderungen nach Radiatio, als lange Zeit angenommen. Auf Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen reagieren sie mit einer vorzeitigen Differenzierung in den terminalen Reifezustand, verbunden mit einer deutlich erhöhten Kollagenproduktion [(19); (59); (8)]. Desweiteren weisen sie nach Bestrahlung eine erhöhte Syntheseleistung für interzelluläre Botenstoffe, sogenannte Cytokine, auf. Hierbei sei vor allem TGF- β genannt, dem profibrotische Eigenschaften nachgewiesen wurden [(35); (43); (16)]. Es ist bekannt, daß ein kompliziert aufgebautes Netzwerk von Cytokinen und Zellen über seine Interaktionen eine ursächliche Rolle in den reparativen Vorgängen nach eingetretener Gewebeschädigung spielt. Inwieweit dieses System der Selbstkon-

trolle und -limitierung versagt und zu fibrotischen Umbauprozessen führt, ist Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

1.3 Einfluß von Transforming Growth Factor-beta

Transforming Growth Factor-beta bezeichnet eine Gruppe von Cytokinen, innerhalb derer fünf Subtypen existieren (TGF- β 1 bis 5). Davon stellt TGF- β 1 bei den Säugetieren die quantitativ größte und wichtigste Unterform dar. Es wird in inaktiver Form von vielen Zellen gebildet. Dazu gehören neben Thrombozyten, Entzündungszellen, mesenchymalen Zellen und Typ-II-Pneumozyten auch die Fibroblasten. Die Aktivierung erfolgt durch Proteasen in vivo bzw. durch Säurekontakt oder andere unphysiologische Umgebungsbedingungen in vitro [(35); (12); (47)].

Die Wirkungen von TGF- β betreffen verschiedenste Organfunktionen und Regelkreisläufe. Teilweise bestehen antagonistische Wirkmechanismen, abhängig vom Zustand der Zellen und der umgebenden extrazelluläre Matrix [(67)]. In Kürze angesprochen, beeinflusst TGF- β die regelrechte Abfolge der embryonalen Entwicklungsstufen, greift regulierend in den Zellzyklus mit überwiegend inhibitorischer Wirkung ein, besitzt immunmodulierende Eigenschaften, ist in die Genese maligner Tumore involviert und kontrolliert die Homöostase der extrazelluläre Matrix [(43); (12); (47); (63)].

Im Hinblick auf den Bindegewebsmetabolismus beeinflusst TGF- β das Gleichgewicht von Synthese und Abbau des organstützenden Bindegewebes im Sinne eines Überwiegens der produzierenden Komponente. Es stimuliert die bindegewebsbildenden Zellen zu verstärkter Kollagensynthese und damit zu einer Zunahme der extrazellulären Matrix. Gleichzeitig wird deren Abbau durch eine verminderte Synthese von Proteasen bzw. vermehrte Bildung von Protease-Inhibitoren reduziert [(22)]. Zusätzlich beeinflusst TGF- β das Proliferationsverhalten verschiedener Zellen. Es konnte eine deutliche Wachstumshemmung von Epithelzellen nach TGF- β -Einwirkung nachgewiesen werden [(43); (47)]. In Bezug auf die Veränderung des Proliferationsverhaltens von Fibroblasten durch TGF- β existieren widersprüchliche Angaben in der Literatur. Sie reichen von einer deutlichen Proliferationsstimulation durch TGF- β [(28); (75)] bis zu einer gegenteiligen Hemmung des Wachstums [(9); (26)].

Diese vielseitigen und potentiell profibrotischen Eigenschaften von TGF- β haben dazu geführt, daß das Cytokin als eines der Schlüsselmoleküle im Hinblick auf die komplexen Vorgänge nach Gewebsverletzungen wie bei der Lungenschädigung nach Radiatio angesehen wird.

1.4 Aufgabenstellung und Ziele dieser Arbeit

Ionisierende Strahlen stellen einen nachgewiesenen profibrotischen Reiz für bindegewebsbildende Zellen dar und sind deshalb für systematische Untersuchungen der beteiligten Zellen und deren Verhalten ein geeignetes Modell.

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, folgende Fragen zu bearbeiten.

- 1) Wie reagieren in vitro kultivierte humane fetale Lungenfibroblasten auf Bestrahlung?
- 2) Wie wird das Proliferationsverhalten von Fibroblasten durch Radiatio beeinflusst?
- 3) Existieren Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Fibroblasten, welche Auswirkungen auf das zelluläre Proliferationsverhalten haben?
- 4) Welchen Einfluß hat TGF- β auf das Proliferationsverhalten von Lungenfibroblasten in Ko-Kultur?
- 5) Welche Schlußfolgerungen und mögliche Konsequenzen ergeben sich im Hinblick auf frühzeitige Diagnostik und Therapie der radiogenen Lungenfibrose?

Zu diesem Zweck wurden humane fetale Lungenfibroblasten in Zellkultur untersucht. Um parallele Aussagen zu Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Fibroblasten treffen zu können, wurde ein Ko-Kultur-Modell verwendet, in dem die bestrahlten Zellen über Poren in den Kulturplatten-Böden indirekt über zirkulierendes Kulturmedium mit den nicht bestrahlten Fibroblasten in Kontakt standen. Nach Radiatio der dafür vorgesehenen Fibroblasten wurden diese gemeinsam mit nicht bestrahlten Zellen als Ko-Kultur kultiviert und zu festgelegten Zeitpunkten die Zellzahlen bestimmt. Zusätzlich wurden quantitative Bestimmungen der in Zellkultur produzierten Interzellulärsubstanzen Prokollagen-I-Peptid, Fibronectin sowie des Cytokins TGF- β

durchgeführt. Die Ergebnisse und Auswertungen sind Gegenstand einer anderen Dissertationsarbeit [(37)].

Der zweite Aspekt der Arbeit, der Einfluß von TGF- β auf das Proliferationsverhalten von Fibroblasten ohne Radiatio, wurde mit einem ähnlichen experimentellen Ansatz untersucht. Auch hier kam das Ko-Kultur-Modell zum Einsatz. Statt der Bestrahlung wurden die Zellen des einen Kompartimentes für eine festgelegte Zeit zwei verschiedenen Konzentrationen von TGF- β ausgesetzt. Die Fibroblasten wurden ebenfalls in Ko-Kultur für bestimmte Zeiträume kultiviert und anschließend die Zellzahlen bestimmt.

Neben der Beobachtung des Proliferationsverhaltens der Fibroblasten unter den verschiedenen Bedingungen sollte das Ko-Kultur-Modell dazu dienen, potentielle Wechselwirkungen zwischen Fibroblasten mit und ohne externer Reizexposition zu untersuchen. Es wird vermutet, daß auch nach Beendigung einer Strahleneinwirkung über bisher noch nicht genau geklärte interzelluläre Kommunikationswege ein Fortschreiten der fibrotischen Veränderungen besteht [(61); (62)].

Daher wurde die Hypothese geprüft, daß Fibroblasten nach Radiatio profibrotische Substanzen produzieren, welche auf andere Fibroblasten proliferationsfördernd wirken und somit durch eine autokrine Stimulation die Fibrogenese beschleunigen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsprinzip

Für die Versuche wurden humane fetale Lungenfibroblasten verwendet. Um die Verhältnisse in Ko-Kultur zu untersuchen, wurde ein Modell der Firma Beckton Dickinson eingesetzt. Dieses besteht aus 6-Well-Kulturplatten mit dazu passenden, in die Kavitäten (Wells) einsetzbaren porenhaltigen Einsätzen (Inserts). Die Porengröße von $1\ \mu\text{m}$ erlaubte einen nährmediumvermittelten Stoffaustausch, ohne einen direkten Zellkontakt zu ermöglichen (s. Abb.1 bis 3).

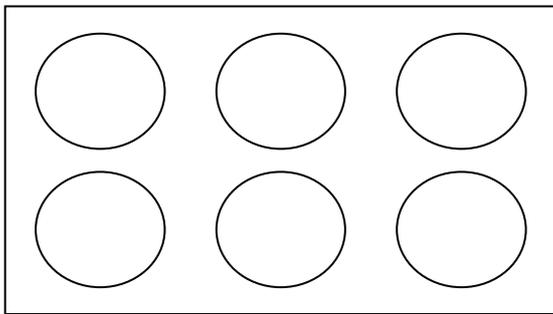


Abb. 1: Schematische Darstellung einer 6-Well-Platte

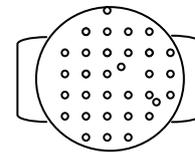


Abb. 2: Aufsicht eines Inserts mit sichtbaren Poren im Boden

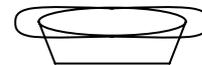


Abb. 3: Schematische Seitenansicht eines Inserts

Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die für die Radiatio vorgesehenen Fibroblasten des einen Ko-Kultur-Kompartiments (Inserts) mit drei (0; 7; 10 Gy), in einem weiteren Versuch mit vier verschiedenen Dosen (0; 4; 7; 10 Gy) bestrahlt. Parallel wurde im TGF- β -Stimulationstest statt der Bestrahlung das Cytokin in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 bzw. 0,5 ng/ml) den Fibroblasten des einen Ko-Kultur-Kompartiments zugegeben. Die Ko-Kultur-Modelle wurden nach Ende der zeitlich definierten Reizexposition zusammengesetzt, inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellzahlen aller Inserts / Wells mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Zusätzlich wurden die Mediumüberstände der Well-Insert-Komplexe, welche standardisiert 24 h vorher zugegeben wurden, abgenommen. Aus ihnen wurden die Konzentrationen der Interzellularsubstanzen Fibronectin, Prokollagen-I-Peptid und TGF- β mit Hilfe von ELISA-Immunoassays ermittelt [(37)].

2.2 Zellkultur

Es wurden humane fetale Lungenfibroblasten der 17., bzw. in einem späteren Versuch der 14. Passage der Zelllinie MRC-5 der Firma ICN Biomedicals, Eschwege, verwendet. Als Nährmedium wurde während der Experimente DME mit 10 % FCS plus 2 mmol L-Glutamin plus 2,5 µg/ml Amphotericin B plus 0,1 mg/ml Gentamicin plus 100 U/ml Penicillin G eingesetzt (Gibco Life Technologies und Sigma Chemicals). Um Interferenzen mit dem Medium bei der Cytokinbestimmung zu vermeiden, wurde den Fibroblasten in späteren Versuchen 24 h vor der Messung FCS-freies Medium zugegeben.

Die Zellen wurden im Inkubator (Bio Flow Technik; 37° C Lufttemperatur, 5 % CO₂-Gehalt, 100 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Nachdem sich ein konfluierender Zell-Monolayer gebildet hatte, wurden die Fibroblasten mit 5 ml 0,25 % Trypsin EDTA (Gibco) gelöst, mit DME gewaschen, zentrifugiert, in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt (s.u.) und 2 ml Fibroblasten-Nährmedium-Suspension mit einer Konzentration von 5000 Zellen/ml in die beschriebenen Wells bzw. Inserts eingebracht. Zu Beginn aller Versuche befanden sich also 10 000 Fibroblasten in jeder Kavität. Da die Well-Insert-Komplexe erst nach der Radiatio zusammengesetzt wurden, wurde das Kultivieren der entsprechenden Zellen in getrennten Wells bzw. Inserts vorgenommen.

Bei den regelmäßigen Mediuernerneuerungen (2 mal pro Woche) wurde jedes Well bzw. Insert mit 2 ml Nährmedium versorgt. In den kombinierten Ko-Kulturen befanden sich also 4 ml Medium.

2.3 Bestrahlung

Die Fibroblasten wurden für 24 Stunden nach dem Einbringen in die Wells / Inserts im Inkubator kultiviert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Adhäsion wurde den Inserts mit den zu bestrahlenden Zellen das Nährmedium abgenommen und durch eine Pufferlösung (PBS, Gibco) ersetzt. Die Bestrahlung der Fibroblasten in den Inserts erfolgte mit Co 60 (Gammatron, Philips, Dosisleistung 1 Gy/min, FHA 80 cm, 1 cm Aufbaumaterial und 1 cm Rückstreumaterial). Es wurden Einzeldosen von 4; 7 und 10 Gy, bzw. in späteren Versuchsdurchläufen von 7 und 10 Gy appliziert. Die nicht zu bestrahlenden Fibroblasten sowie die Kontrollgruppe wurden mit Ausnahme der Radiatio gleicherma-

ßen behandelt. Im Anschluß wurden alle Zellen zweimal mit DME gewaschen. Danach erhielten sie das beschriebene Nährmedium (2 ml pro Well bzw. 4 ml pro Well-Insert-Komplex). Die porenhaltigen Einsätze mit den bestrahlten Fibroblasten wurden auf die 6-Well-Kulturplatten mit den unbestrahlten Zellen gesetzt. Die Kultivierung bis zu den Meßzeitpunkten erfolgte im bereits beschriebenen Inkubator, ein Mediumwechsel wurde 2 mal pro Woche durchgeführt.

2.4 Zugabe von Transforming Growth Factor-beta

Für den TGF- β -Stimulationstest wurden aus TGF- β der Firma ICN Biomedicals, Eschwege, zwei Stammlösungen mit Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,5 ng/ml hergestellt. Die Fibroblasten wurden wie beschrieben in die Wells / Inserts ausgesät und 24 Stunden im Inkubator getrennt voneinander kultiviert. Anschließend wurde das Nährmedium der für die TGF- β -Gabe vorgesehenen Fibroblasten in den Inserts entfernt und durch 2 ml einer Mischlösung aus dem oben beschriebenen, FCS-haltigen Nährmedium und TGF- β in einer der beiden angegebenen Konzentrationen ersetzt. Eine Probe dieses Mediums wurde zur Leerwertermittlung tiefgefroren.

Die Lösung verblieb für 8 Stunden auf den Zellen. Dann wurde das TGF- β -haltige Medium abgenommen und die Fibroblasten in den Inserts zweimal mit je 1 ml reinem DME gewaschen. Anschließend erhielten alle Zellen, auch die nicht TGF- β -exponierten, je 2 ml frisches Nährmedium. Die Ko-Kultur-Komplexe wurden zusammen gesetzt und unter oben beschriebenen Bedingungen inkubiert sowie regelmäßigen Medienwechseln zugeführt. Analog den Bestrahlungsversuchen wurden an den Tagen 1; 3; 6; 9 und 12 nach TGF- β -Gabe die Zellzahlen mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt.

2.5 Meßzeitpunkte

Die Versuchsanordnung sah Meßzeitpunkte an den Tagen 1; 3; 6; 9 und 12 nach Radiation bzw. TGF- β -Gabe vor. 24 Stunden vor Beginn eines Meßzeitpunktes wurde das Nährmedium entfernt und durch frisches Medium ersetzt, um eine Standardisierung in der Aussage der enthaltenen Cytokine zu erreichen. Um eine Verfälschung der späteren

Cytokin-Bestimmung durch im FCS enthaltene Stoffe zu vermeiden, wurde für die zweite Hälfte der Experimente für diese 24 Stunden FCS-freies Medium verwendet. Zusätzlich wurde von diesem Medium jedes Mal eine Probe zur Leerwertermittlung eingefroren. An den Meßzeitpunkten wurde von den entsprechenden Fibroblasten-Kulturen das 24 Stunden zuvor aufgegebenes Medium abgenommen, aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Aus diesen Aliquots wurden später die Cytokin-Konzentrationen mit ELISA-Messungen bestimmt [(37)].

Die Zellen wurden mit 0,25 % Trypsin EDTA gelöst (erst 0,5 ml pro Well bzw. Insert für 1 min., dann 1 ml bis zur mikroskopisch sichtbaren Ablösung). Da sich die Fibroblasten aus den porenhaltigen Einsätzen nur schlecht mit Trypsin herauslösen ließen, wurden bei späteren Versuchen zu diesem Zweck cell-scraper der Firma Costar, Holland, verwendet.

Die Trypsin-Aktivität wurde nach dem Lösungsprozeß mit 2 ml 10 % FCS-haltigem DME-Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde abgenommen und bei 1250 U/min und 27°C für 6 min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Zellrückstand in Nährmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zählung mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer (s.u.).

Bei den später zu bearbeitenden Kulturansätzen wurde zweimal pro Woche ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.6 Proliferationsmessung

Zur Zellzahl-Bestimmung wurde die Fuchs-Rosenthal-Kammer eingesetzt [(52)]. Dabei handelt es sich um eine rechteckige, dicke Grundplatte aus Glas, von der Größe einem Objektträger vergleichbar. In das Glas sind vier zu den kurzen Seiten parallele Vertiefungen und eine zusätzliche Vertiefung rechtwinklig dazu in der Mitte eingeschliffen. Dadurch werden zwei Außenstege und ein geteilter Mittelsteg gebildet. Auf den Außenstegen, welche geringfügig höher liegen als der Mittelsteg, liegt das Deckglas auf. Zwischen Deckglas und Mittelsteg bildet sich ein Kapillarspalt aus, der durch die Teilung des Steges zwei getrennte Kammern bildet. In diesen Bereichen sind die Zählnetze in den Glasboden eingraviert (s. schwarze Bereiche in Abb. 4).

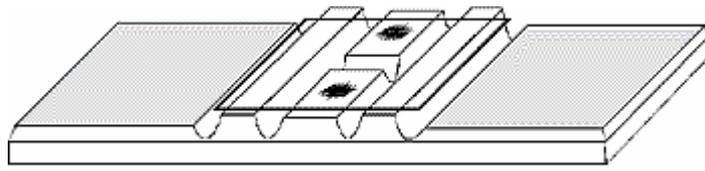


Abb. 4: Darstellung einer Fuchs-Rosenthal-Kammer [(52)]

Bei der verwendeten helllinigen Ausführung ist der Kammerboden mit Rhodium beschichtet und das Zählnetz in diese Rhodiumschicht eingeritzt. Dadurch ist es mit einer am Mikroskop vorgenommenen Kontrastverschiebung möglich, das Zählnetz wahlweise hell- oder dunkellinig erscheinen zu lassen. Ein Kammer-Zählnetz besteht aus sechzehn großen Quadraten, welche wiederum aus je sechzehn kleineren Quadraten aufgebaut sind. Die Fibroblasten wurden nach Zenrifugation und Absaugen des Überstandes in der verbliebenen Lösungsmenge resuspendiert und dabei das genaue Volumen der Suspension bestimmt, da dies in die Formel zur Berechnung der absoluten Zellzahl mit eingeht (s.u.). Anschließend wurden die gesäuberten und mit einem Deckglas versehenen Zählkammern mit Hilfe einer Pipette so beschickt, daß die Kammern vollständig und luftblasenfrei gefüllt waren. Für jede Versuchsbedingung wurde eine sechsfache Zählung durchgeführt. Die Zählung erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops mit 40-facher Vergrößerung und eines manuell zu bedienenden Zählgerätes. Es wurden stets vier der großen Quadrate ausgezählt. Der Zählvorgang erfolgte mäanderförmig, wobei darauf geachtet werden mußte, daß Fibroblasten, die auf den Grenzlinien lokalisiert waren, nur einfach in die Zählung eingingen. Das wurde erreicht, indem jeweils nur an zwei Grenzlinien eines zu



Abb. 5: Füllen der Kammern mit Hilfe einer Pipette unter Ausnutzung der Kapillarkräfte [(52)]

zählenden Quadrates, beispielsweise an der linken und oberen Linie, die Zellen gezählt wurden.

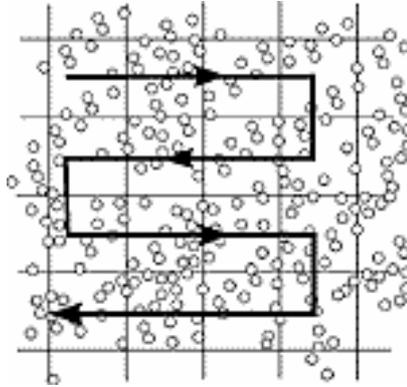


Abb. 6: Mäanderförmige Vorgehensweise der mikroskopischen Zellzählung [(52)]

Anschließend wurde aus den ermittelten Zählwerten der vier ausgezählten Quadrate die Zahl der Fibroblasten pro Kammer über folgende Formel errechnet:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen} \times 4 \times 1000}{3,2 \mu\text{l}} = \text{Zellen pro 1 ml}$$

4 : Faktor zur Aufrechnung auf die Gesamtquadratzahl einer Kammer

1000 : Faktor zur Umrechnung von μl in ml

3,2 μl : Rauminhalt einer Kammer (Produkt aus Fläche x Tiefe = 16 mm² x 0,2 mm)

Zur Ermittlung der absoluten Gesamtzahl der in den Wells bzw. Inserts befindlichen Zellen wurde das nach obiger Formel berechnete Ergebnis mit der Milliliter-Zahl der Zellsuspension nach Zentrifugation multipliziert.

2.7 Bestimmung der Sekretionsleistung für Transforming Growth Factor-beta, Fibronectin und Prokollagen-I-Peptid

Aus den Zellkultur-Überständen aller Versuchsanordnungen wurden die Konzentrationen von Fibronectin, Prokollagen-I-Peptid und TGF- β ermittelt. Dazu wurden Immunoassays vom ELISA-Typ eingesetzt (Fibronectin und Prokollagen-I-Peptid: Takara Biomedicals, Japan; TGF- β : Quantikine R&D Systems, Germany), [(37)].

Um Aussagen über die Herkunft der Interzellulärsubstanzen zu erhalten (bedingt durch die Poren in den Inserts kann das Nährmedium zwischen beiden Kompartimenten zirkulieren), wurde das beschriebene Versuchsprinzip erweitert und ausgebaut. Das Modell der Ko-Kultur wurde dafür durch zwei weitere Versuchsansätze ergänzt:

Ansatz 1: Kultivieren von je 10 000 Fibroblasten pro Insert eines Ko-Kultur-Systems; in den zugehörigen Wells befanden sich keine Zellen ($\hat{=}$ Ko-Kultur ohne Fibroblasten im unteren Well-Kompartiment); Radiatio der Fibroblasten in den Inserts mit 0; 7 bzw. 10 Gy

Ansatz 2: Kultivieren einer nicht bestrahlten Kontrollgruppe in 6-Well-Platten

Ansatz 3: Ko-Kultur-Modell wie bereits beschrieben (Kultivierung von je 10 000 Fibroblasten pro Well bzw. Insert, Radiatio der Zellen in den Inserts mit 0; 7 bzw. 10 Gy, anschließendes Zusammensetzen der Ko-Kulturen mit den nicht bestrahlten Fibroblasten der Wells)

Damit war es möglich, die Syntheseleistung der Fibroblasten mit und ohne unbestrahlte(n) Zellen in den benachbarten Wells zu vergleichen. Ansatz 2 wurde eingesetzt, um Aussagen über das ungestörte Verhalten kultivierter Fibroblasten in Bezug auf Wachstum und Cytokinproduktion ohne benachbarte Zellen und ohne Radiatio zu erhalten. Zu Ergebnissen und Analysen der Cytokinbestimmungen wird auf die Arbeit von E. Köberlein verwiesen [(37)].

2.8 Ergebnisse und statistische Auswertung

Die Zellzahl wurde für jede Versuchsbedingung 6-fach ermittelt. Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm Statistica® für Windows. Die dargestellten Diagramme zeigen die errechneten Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. In den Tabellen sind die Mittelwerte der Zellzahlen mit der zugehörigen Standardabweichung (Werte in Klammern) dargestellt, alle Werte wurden auf die zweite Zehnerpotenz gerundet.

3 Ergebnisteil

3.1 Auswirkungen von Radiatio auf das Proliferationsverhalten von Fibroblasten in Ko-Kultur

Für die Untersuchung der Proliferation humaner fetaler Lungenfibroblasten wurden die Zellen mit verschiedenen Dosen bestrahlt, mit nicht bestrahlten Fibroblasten ko-kultiviert und an festgesetzten Meßzeitpunkten die Zellzahlen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt.

Unabhängig von der Einwirkung externer Faktoren wurde eine Differenz der Zellzahlen innerhalb der einzelnen Ko-Kultur-Systeme zwischen Inserts und Wells beobachtet. Die Ausgangszellzahl war in allen Kompartimenten gleich mit 10 000 Zellen je Well bzw. Insert.

	Tage der Inkubation				
	1	3	6	9	12
Inserts (nicht bestrahlt)	3 800 (1 100)	12 600 (700)	60 000 (8 800)	174 100 (39 000)	444 300 (110 900)
Wells	11 300 (6 200)	37 900 (5 300)	318 300 (45 300)	860 400 (175 400)	2 355 100 (175 600)

Tab. 1: Zellzahlen des nicht bestrahlten Ko-Kultur-Systems (**Wells** und **Inserts**) im Vergleich (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

Für beide Ko-Kultur-Kompartimente herrschten identische Bedingungen. Bei einer daraufhin durchgeführten gleichzeitigen Inkubation von Fibroblasten in 6-Well-Platten (ohne Radiatio und ohne Ko-Kultur) und unbestrahlten Fibroblasten in den Inserts eines Ko-Kultur-Modells **ohne** Zellen im unteren Well-Kompartiment (um eine wechselseitige Beeinflussung auszuschließen) zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Die Wachstumskurven stiegen bei beiden Zellkulturen gleichmäßig an, die absoluten Zellzahlen der Inserts lagen aber parallel unter denen der Wells (s. Abb. 7).

Vergleich der Zellzahlen von nicht bestrahlten Fibroblasten in Wells bzw. Inserts

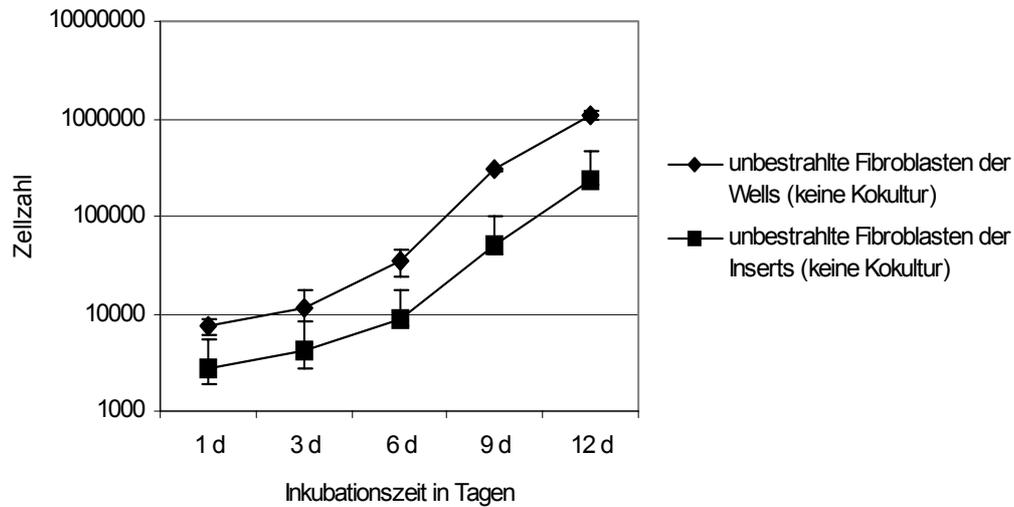


Abb. 7: Zellzahlen der nicht bestrahlten **Wells** und **Inserts** im Vergleich

Als Ursache sind am wahrscheinlichsten verschiedene Kultivierungsbedingungen anzusehen, bedingt durch die unterschiedliche Bodenbeschaffenheit der Kulturgefäße. Im Vergleich zum glatten Boden der Wells besitzen die Inserts eine kleinere und aufgrund der Poren unebenere Grundfläche. Da sich dieser Effekt der parallel versetzten Wachstumskurven in allen Versuchen unabhängig von äußeren Einflüssen reproduzieren ließ, kann von einem systemisch wirksamen Faktor ausgegangen werden.

In den bestrahlten **Inserts** zeigt sich eine Verminderung der Zellzahlen, welche verschieden stark nach Einwirkung unterschiedlicher Strahlendosen ausgeprägt war und am 12. Tag eine Dosisabhängigkeit erkennen ließ: mit steigender Strahlendosis erfolgte eine zunehmende Wachstumshemmung der Fibroblasten (s. Abb. 8).

Die nicht bestrahlte Kontrollgruppe wies die mit Abstand höchsten Zellzahlen auf. Zwischen allen Versuchsbedingungen waren die Unterschiede signifikant ($p < 0,05$).

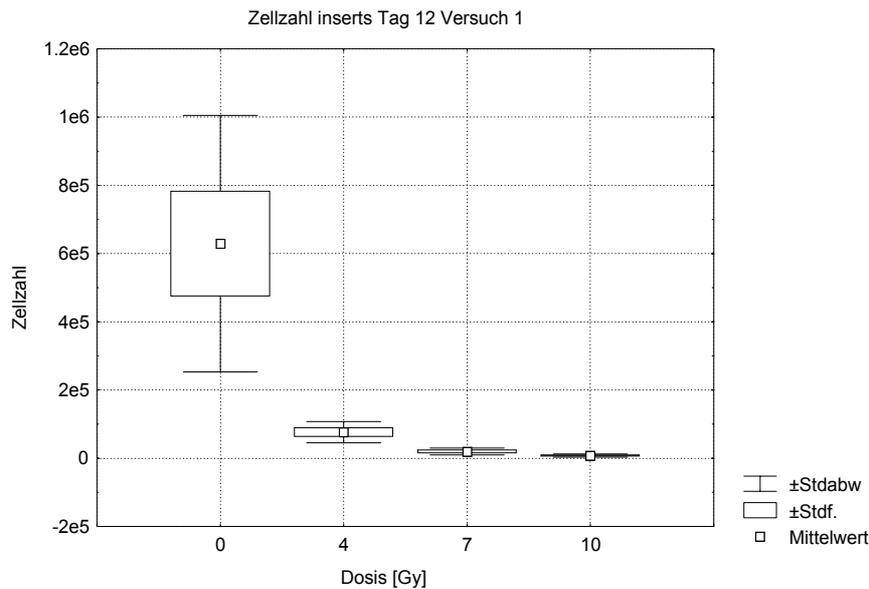


Abb. 8: Zellzahlen der bestrahlten **Inserts** am Tag 12 nach Radiatio ($p = 0,004$ für 0 Gy vs. 4 Gy; 0 Gy vs. 7 Gy; 0 Gy vs. 10 Gy; 4 Gy vs. 7 Gy; 4 Gy vs. 10 Gy; $p = 0,045$ für 7 Gy vs. 10 Gy)

Tag 12 nach Radiatio	Bestrahlungsdosis			
	0 Gy	4 Gy	7 Gy	10 Gy
Inserts	630 000 (376 200)	76 400 (31 300)	19 700 (10 200)	8 000 (4 900)

Tab. 2: Zellzahlen der **Inserts** am Tag 12 nach Bestrahlung (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

Über das Wachstumsverhalten der Fibroblasten in den zu den bestrahlten **Inserts** gehörigen **Wells** war bei diesem Versuch keine klare Aussage möglich. Als Tendenz konnte herausgearbeitet werden, daß die Fibroblasten, welche den mit 10 Gy bestrahlten **Inserts** benachbart waren, am stärksten proliferierten (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuchsdurchgang zeigte sich erneut und deutlicher als zuvor die dosisabhängige Proliferationshemmung der bestrahlten Fibroblasten in den **Inserts**.

Zellzahlen der Fibroblasten in den Inserts nach Radiatio

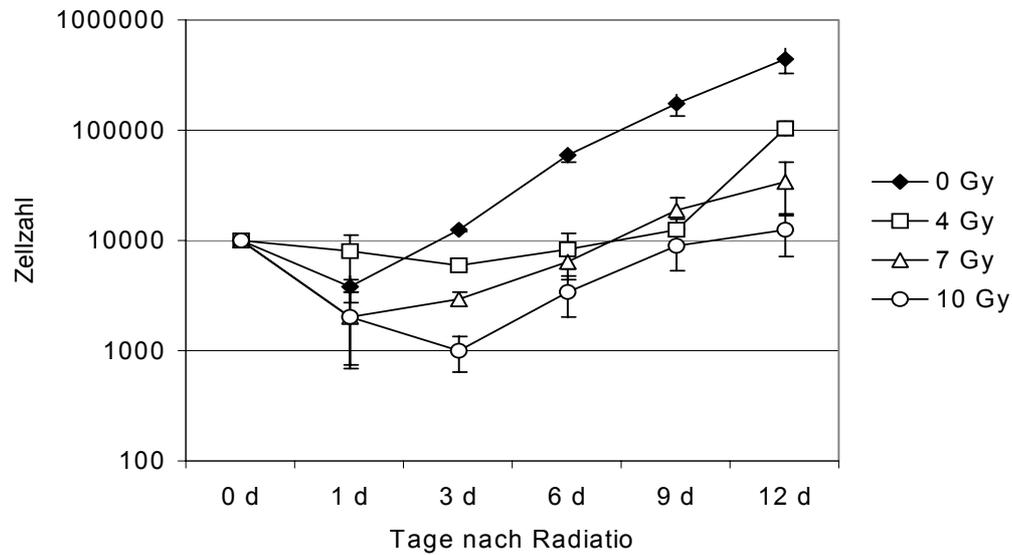


Abb. 9: Übersicht über die Zellzahlen in den **Inserts** nach Radiatio

Tag nach Radiatio	Bestrahlungsdosis			
	0 Gy	4 Gy	7 Gy	10 Gy
1	3 800 (1 100)	7 900 (3 500)	2 100 (1 400)	2 100 (1 300)
3	12 600 (700)	6 000 (400)	2 900 (400)	1 000 (400)
6	59 700 (8 800)	8 500 (3 000)	6 500 (2 000)	3 400 (1 400)
9	174 100 (39 000)	12 500 (3 300)	18 800 (5 800)	8 900 (3 500)
12	444 300 (110 900)	105 500 (14 700)	34 300 (17 500)	12 400 (5 100)

Tab. 3: Zellzahlen der bestrahlten **Inserts** der Ko-Kultur-Systeme (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

Vor allem an den Tagen 3 und 12 ist eine dosisabhängige Wachstumshemmung bei steigender Strahlendosis zu erkennen. In Prozenten ausgedrückt, wurde das Wachstum der Fibroblasten nach 12 Tagen nach Radiatio mit 4 Gy um 76 % im Vergleich zu den nichtbestrahlten Zellen reduziert, bei 7 Gy erfolgte eine Minderung um 92,3 % und nach Bestrahlung mit 10 Gy zeigten die Zellen ein um 97,2 % vermindertes Wachstum gegenüber der Kontrollgruppe. Im Verlauf der Versuchsreihe fiel eine prozentuale Steigerung der Wachstumshemmung auf. So war die Proliferation der mit 7 Gy bestrahlten Fibroblasten am 1. Tag nach Radiatio um 45 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt, am 3. Tag war sie um 77 % vermindert, am Tag 6 nach Radiatio lagen die Zellzahlen um 89 % niedriger, am Tag 9 um 89,2 % und am 12. Tag war, wie erwähnt, die Anzahl der Fibroblasten 92,3 % niedriger als in den nicht bestrahlten Inserts. Dasselbe Verhalten zeigten die mit 10 Gy bestrahlten Zellen (Tag 1: 45 % Erniedrigung, Tag 3: 92 %, Tag 6: 94,3 %, Tag 9: 94,9 % und Tag 12: 97,2 %). Hier war das Ausmaß der Proliferationseinschränkung allgemein höher als nach Bestrahlung mit 7 Gy.

An beiden Meßzeitpunkten (Tag 3 und 12) lagen signifikante Unterschiede zwischen allen Zellzahlen der verschiedenen Versuchsbedingungen vor ($p < 0,05$).

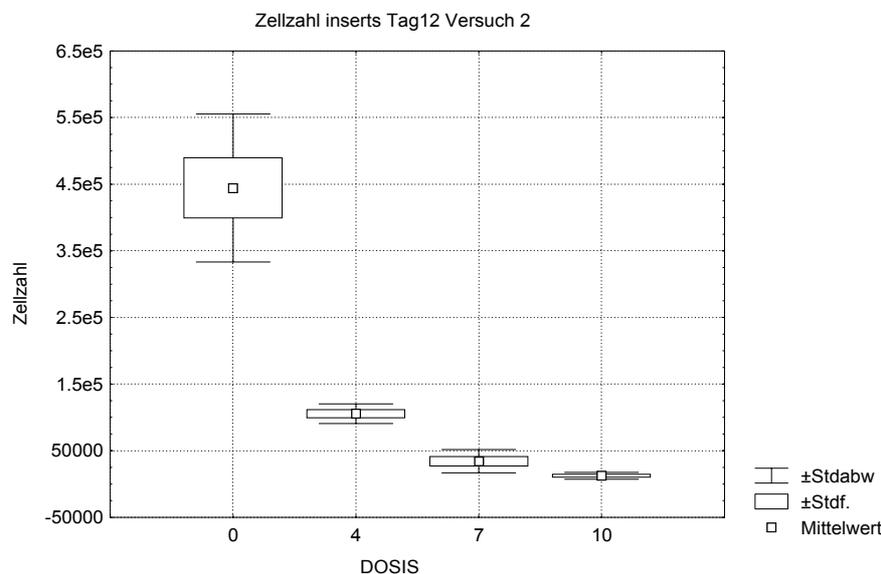


Abb. 10: Zellzahlen der bestrahlten **Inserts** am Tag 12 nach Radiatio ($p = 0,004$ für 0 Gy vs. 4 Gy; 0 Gy vs. 7 Gy; 0 Gy vs. 10 Gy; 4 Gy vs. 7 Gy; 4 Gy vs. 10 Gy; $p = 0,01$ für 7 Gy vs. 10 Gy)

Auffällig war der Rückgang der Zellzahlen am Tag 1; 3 und z.T. Tag 6 nach Radiatio deutlich unter den Ausgangswert von 10 000 Zellen pro Insert (s. Tab. 3). Ab dem 6. bzw. 9. Tag stiegen die Wachstumskurven der bestrahlten Zellen dann deutlich an, lagen aber wie erwähnt unter denen der Kontrollgruppe.

Die in den **Wells** des Ko-Kultur-Systems in direkter Nachbarschaft zu den bestrahlten Fibroblasten kultivierten Zellen zeigten über die 12 Versuchstage ein verschieden ausgeprägtes Wachstum. Wie die logarithmische Übersicht (s. Abb. 11) verdeutlicht, waren die Proliferationsunterschiede zwischen den einzelnen Dosen der Ko-Kultur-Modelle nicht von vergleichbarer Prägnanz wie bei den direkt bestrahlten Inserts. Die statistischer Auswertung erbrachte jedoch signifikante Differenzen im Wachstumsverhalten.

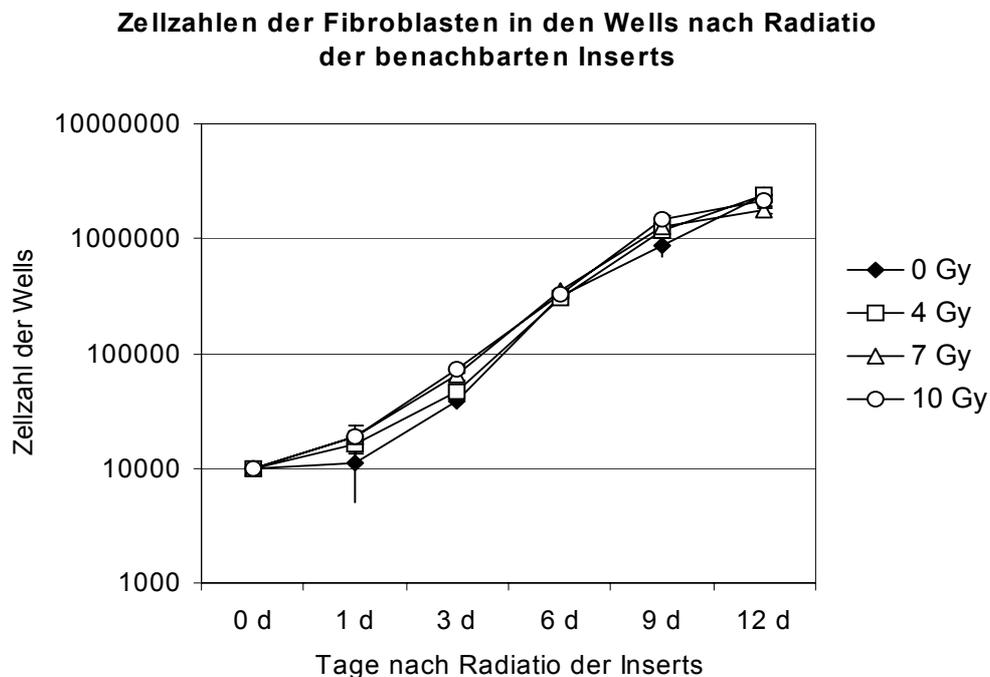


Abb. 11: Übersicht über die Zellzahlen in den **Ko-Kultur-Wells** (nicht bestrahlt), Dosisangaben in Gy beziehen sich auf die bestrahlten Fibroblasten in den Inserts, welche den Wells benachbart waren

Bereits am 1. Tag nach Radiatio ließ sich ein statistisch signifikanter Proliferationsunterschied zwischen den Fibroblasten in den Wells des nicht bestrahlten bzw. des mit 10 Gy bestrahlten Ko-Kultur-Modells beobachten. Es kam, genau gegensätzlich zu den oben beschriebenen Verhältnissen in den bestrahlten Inserts, zu einem deutlich stärker-

ren Zellwachstum in den Wells, welche den mit 10 Gy bestrahlten Fibroblasten benachbart waren (s. Abb. 12).

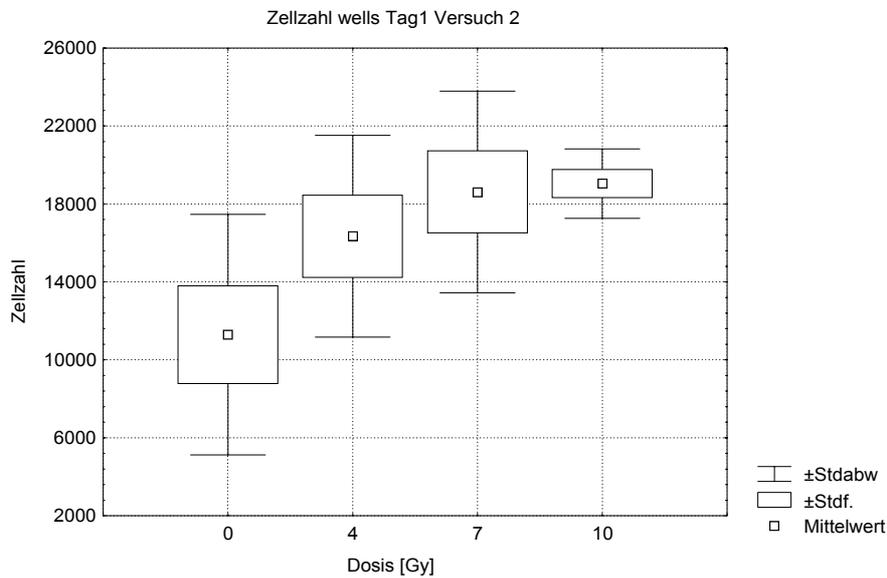


Abb. 12: Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** (nicht bestrahlt) am Tag 1 nach Radiatio der benachbarten Inserts ($p = 0,016$ für 0 Gy vs. 10 Gy)

In dieser Population betrug die Zellzahl im Durchschnitt 19 000 Fibroblasten pro Well. Die Wells des nicht bestrahlten Kontroll-Ko-Kultur-Systems zeigten dagegen ein vergleichsweise niedriges Wachstum mit durchschnittlich 11 300 Zellen pro Well.

Am Tag 3 nach Radiatio war der Unterschied signifikant dosisabhängig - in gegensinniger Weise zu den bestrahlten Inserts der Ko-Kultur-Systeme. Die den nicht bestrahlten Fibroblasten benachbarten Zellen proliferierten am wenigsten, gefolgt von den Zellen des 4 Gy und 7 Gy Ko-Kultur-Systems. Das stärkste Wachstum wiesen die Fibroblasten in den Wells des mit 10 Gy bestrahlten Systems auf (s. Abb. 13).

Tag nach Radiatio	Bestrahlungsdosis der Inserts			
	0 Gy	4 Gy	7 Gy	10 Gy
1	11 300 (6 200)	16 300 (5 200)	18 600 (5 200)	19 000 (1 800)
3	37 900 (5 300)	46 100 (3 300)	64 300 (5 600)	72 900 (5 900)
6	318 300 (45 300)	308 000 (15 800)	351 400 (19 700)	322 400 (16 200)
9	860 400 (175 400)	1 190 400 (248 400)	1 282 200 (255 800)	1 492 500 (101 900)
12	2 355 100 (175 600)	2 397 200 (332 000)	1 785 500 (163 300)	2 128 000 (307 700)

Tab. 4: Übersicht über die Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** (nicht bestrahlt) in Nachbarschaft der bestrahlten Inserts (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

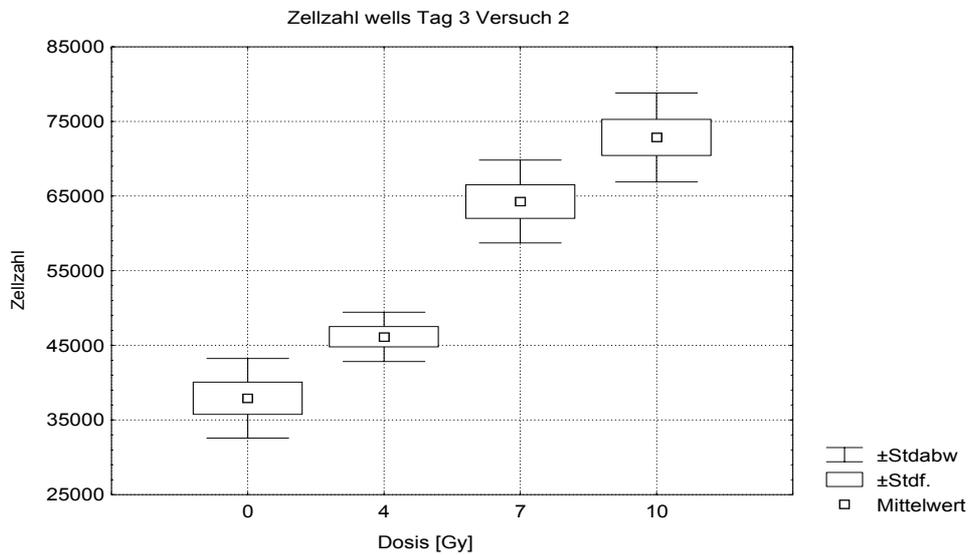


Abb. 13: Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** (nicht bestrahlt) in Nachbarschaft der bestrahlten Inserts am Tag 3 nach Radiatio. Es herrscht Signifikanz zwischen allen Bedingungen ($p = 0,037$ für 0 Gy vs. 4 Gy; $p = 0,004$ für 0 Gy vs. 7 Gy; 0 Gy vs. 10 Gy; 4 Gy vs. 7 Gy; 4 Gy vs. 10 Gy; $p = 0,016$ für 7 Gy vs. 10 Gy).

Diese Tendenz setzte sich auch am Tag 9 nach Radiatio fort. Statistisch signifikante Unterschiede traten hier zwischen den Zellzahlen der Wells der nicht bestrahlten Kontrollgruppe und allen anderen, bestrahlten Ko-Kultur-Wells auf. Eine Signifikanz zwischen den einzelnen Radiatio-Dosen bestand nur im Vergleich der Wells von mit 4 und 10 Gy bestrahlten Systeme (s. Abb. 14).

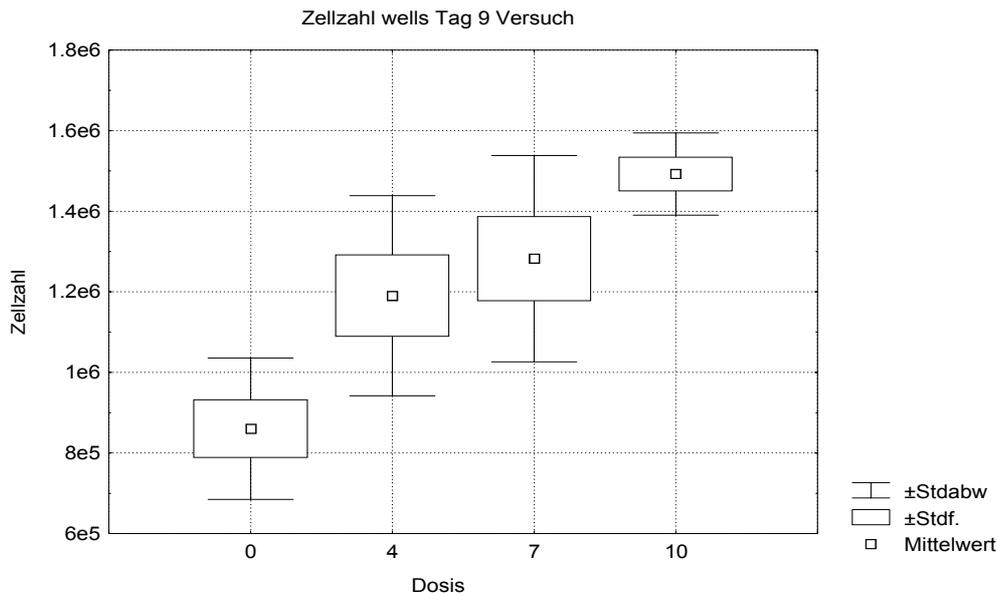


Abb. 14: Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** (nicht bestrahlt) am 9. Tag nach Radiatio der benachbarten Inserts ($p = 0,037$ für 0 Gy vs. 4 Gy; $p = 0,01$ für 0 Gy vs. 7 Gy; $p = 0,004$ für 0 Gy vs. 10 Gy; $p = 0,037$ für 4 Gy vs. 10 Gy)

Wird das Proliferationsverhalten in prozentualen Werten ausgedrückt, wurden am 1. Tag nach Radiatio in den Wells des mit 10 Gy bestrahlten Ko-Kultur-Systems 68 % mehr Fibroblasten gezählt als bei der nicht bestrahlten Kontrollgruppe. Bei der bereits geschilderten signifikanten Dosisabhängigkeit am Tag 3 war das Wachstum der Zellen in den Wells des 4 Gy-Ko-Kultur-Systems im Vergleich zur Kontrollgruppe um 22 % erhöht, bei 7 Gy um 70 % und bei 10 Gy um 92 %. Diese Tendenz setzte sich bis zum 9. Tag nach Radiatio fort. Am Tag 12 des Versuches hatten sich die Fibroblastenzahlen in den Wells aller Bedingungen einer Zellzahl von ca. 2 000 000 angenähert, ohne weitere dosisbezogene Unterschiede aufzuweisen.

Während der Experimentreihen wurden zusätzlich zu den Proliferationsbestimmungen durch Zellzählung auch Messungen von Interzellulärsubstanzen in den Mediumüber-

ständen der Zellkulturen durchgeführt. Dabei handelte es sich um Prokollagen-I-Peptid, TGF- β und Fibronectin. Um reproduzierbare Aussagen zur Lokalisation der Synthese treffen zu können - das bisher verwendete Ko-Kultur-Modell erlaubt eine porenvermittelte Zirkulation des Mediums zwischen Inserts und Wells - wurde der Versuchsaufbau ausgebaut und durch zwei weitere Ansätze erweitert (genauerer siehe Abschnitt 2 „Material und Methoden“). Die Ergebnisse und Analysen der Syntheseleistung bestrahlter Fibroblasten sind Gegenstand einer anderen Dissertationsarbeit [(37)].

Im Vergleich des Proliferationsverhaltens der bestrahlten Fibroblasten in den **Inserts** von Ansatz 1 (Fibroblasten in den Inserts bei zellfreien Wells) und 3 (Ko-Kultur mit Fibroblasten in den Inserts und unbestrahlten Zellen in den Wells) konnten keine signifikanten Unterschiede aufgedeckt werden. In beiden Fällen zeigte sich wie in den Versuchen vorher eine z.T. dosisabhängige Verminderung der Zellzahlen nach Radiatio (Daten nicht gezeigt). Auch bei der Betrachtung der Wachstumsverhältnisse in den **Wells** der Ko-Kulturen (Ansatz 3) fiel wie zuvor auf, daß die Fibroblasten in Nachbarschaft der mit 10 Gy bestrahlten Inserts höhere Zellzahlen aufwiesen als die Zellen in den Wells des 0 Gy-Ko-Kultur-Systems (s. Tab. 5).

Tag nach Radiatio	Bestrahlungsdosis der Inserts		
	0 Gy	7 Gy	10 Gy
3	5 400 (1 800)	10 800 (3 200)	12 400 (5 900)
9	260 100 (71 500)	62 900 (18 000)	315 900 (23 500)
12	961 500 (65 500)	830 600 (156 500)	1 225 600 (165 500)

Tab. 5: Übersicht über die Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** (nicht bestrahlt) in Nachbarschaft der bestrahlten Inserts (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

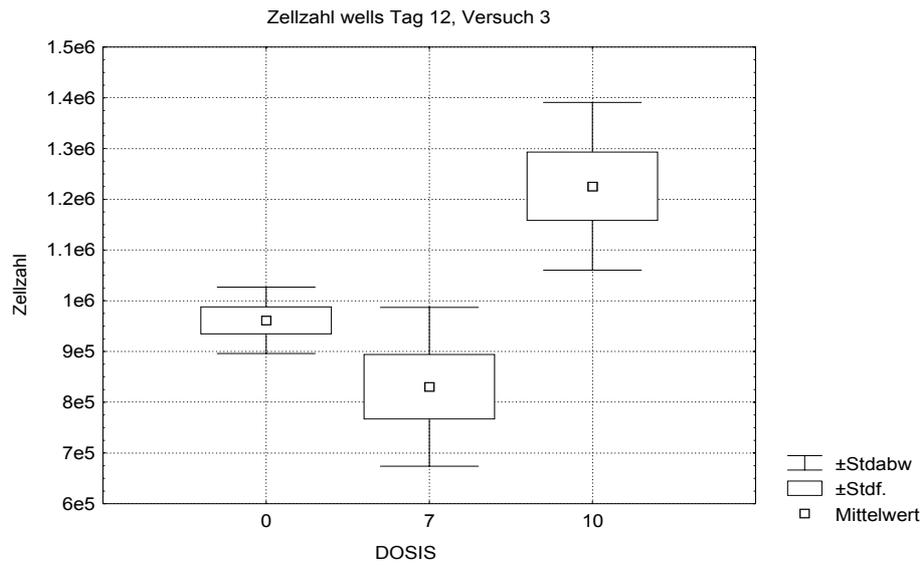


Abb. 15: Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** (nicht bestrahlt) am Tag 12 nach Radiatio der benachbarten Inserts ($p = 0,006$ für 0 Gy vs. 10 Gy u. 7 Gy vs. 10 Gy)

Die Fibroblasten in den Wells des 7 Gy-Ko-Kultur-Systems zeigten dagegen kein einheitliches Wachstumsverhalten; die ermittelten Zellzahlen lagen teilweise unter den Zahlen der anderen Dosisstufen.

Im Vergleich der Proliferationseigenschaften von nicht bestrahlten Fibroblasten der Kontrollgruppen von Ansatz 2 (6-Well-Platten ohne Ko-Kultur) und Ansatz 3 (Ko-Kultur-System) ergaben sich keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

3.2 Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von Fibroblasten in Ko-Kultur durch Zugabe von Transforming Growth Factor-beta

3.2.1 Proliferationsverhalten von Fibroblasten in den Inserts der Ko-Kultur nach direktem Kontakt zu Transforming Growth Factor-beta

In einem weiteren Versuch wurde TGF- β in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 und 0,5 ng/ml) zu humanen fetalen Lungenfibroblasten in Inserts eines Ko-Kultur-Modells für die Zeit von 8 Stunden zugegeben. Nach TGF- β -Exposition wurden sie mit den parallel in den Wells der Ko-Kultur kultivierten Fibroblasten (ohne TGF- β -Kontakt) zusammen gesetzt und an festgelegten Tagen die Zellzahlen aller Kompartimente bestimmt.

Die ermittelten Zellzahlen in den Cytokin-exponierten Inserts bei einer Ausgangszahl von 10 000 Fibroblasten pro Kavität stellten sich wie folgt dar:

Tag nach TGF- β -Exposition	zugegebene TGF- β -Konzentration		
	0 ng/ml	0,1 ng/ml	0,5 ng/ml
1	8 300 (3 900)	8 300 (5 500)	9 600 (5 700)
3	14 300 (9 300)	40 600 (24 700)	33 100 (13 300)
6	66 300 (41 800)	54 400 (16 600)	145 500 (55 800)
9	289 200 (110 200)	238 500 (108 000)	745 500 (173 000)
12	629 200 (376 200)	1 256 900 (199 700)	1 065 100 (240 100)

Tab. 6: Zellzahlen in den **Inserts** der Ko-Kultur nach 8-stündiger TGF- β -Exposition (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

Im Vergleich der Zellzahlen der Kontrollgruppe und mit 0,1 ng/ml TGF- β behandelte Fibroblasten-Kultur zeigte sich kein einheitlicher Effekt. Das Wachstum der Fibrobla-

sten mit TGF- β -Kontakt war z.T. ähnlich der Kontrollgruppe (Tag 1; 6), lag aber auch über (Tag 3; 12) bzw. unter (Tag 9) deren Werten.

Dagegen ließ die Beobachtung der Fibroblasten, welchen TGF- β in einer Konzentration von 0,5 ng/ml zugegeben wurde, ein verstärktes Wachstum erkennen. Vor allem an den Tagen 6 und 9 nach Exposition lagen die Zellzahlen deutlich höher als die der Kontrollgruppe bzw. der mit 0,1 ng/ml TGF- β stimulierten Fibroblasten (s. Abb. 16).

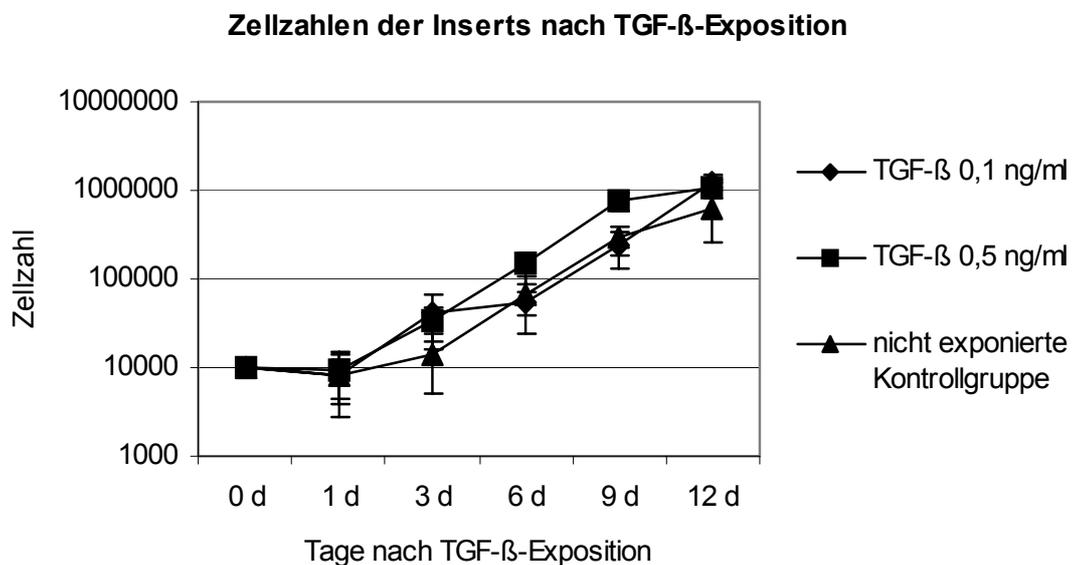


Abb. 16: Übersicht über die Zellzahlen der **Inserts** der Ko-Kultur nach Zugabe von TGF- β

Prozentual ausgedrückt, zeigten die Fibroblasten, die der höheren TGF- β -Konzentration ausgesetzt wurden, ein Mehrwachstum von bis zu 158 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (1. Tag: 16 % höhere Zellzahlen, 3. Tag 132 %, 6. Tag 120 %, 9. Tag 158 %, 12. Tag 70 % Mehrproliferation).

Am Tag 12 des Versuchs war das Wachstum in den Inserts mit TGF- β -Exposition ebenfalls höher als in der Kontrollgruppe, eine Dosisabhängigkeit zeigte sich aber nicht (s. Tab. 6).

3.2.2 Proliferationsverhalten von Fibroblasten in den Wells der Ko-Kultur ohne direkten Kontakt zu Transforming Growth Factor-beta

Bei der Analyse des Proliferationsverhaltens der Fibroblasten in den Wells zeigte sich erneut für alle Bedingungen die generell höhere Zellzahl pro Well, verglichen mit den Inserts desselben Ko-Kultur-Systems. Wie bereits weiter vorn ausgeführt, ist hierfür die Ursache in den verschiedenen Kultivierungsbedingungen der Wells (glattbödig) bzw. Inserts (porenhaltiger Boden) zu sehen. Eine Übersicht über die Zellzahlen-Entwicklung in den Ko-Kultur-Wells der verschiedenen Meßzeitpunkte gibt folgende Tabelle:

Tag nach TGF- β -Exposition	TGF- β -Konzentration in den benachbarten Inserts		
	0 ng/ml	0,1 ng/ml	0,5 ng/ml
1	13 800 (9 100)	14 700 (6 200)	19 300 (8 100)
3	45 800 (25 500)	78 800 (21 400)	78 800 (17 600)
6	158 800 (58 000)	475 000 (46 700)	625 000 (67 700)
9	466 300 (99 600)	1 043 800 (179 400)	1 122 900 (453 600)
12	1 620 000 (192 700)	2 277 900 (395 300)	1 877 000 (418 700)

Tab. 7: Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** nach 8-stündiger TGF- β -Gabe zu den Fibroblasten der benachbarten Inserts (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

Wie auch bei den Inserts zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellzahlen der Kontrollgruppe und dem Ko-Kultur-System, welchem 0,5 ng/ml TGF- β zugesetzt worden war. Die Zahlen in den Wells der letztgenannten Bedingung lagen zu allen Meßzeitpunkten höher als die Anzahl der Fibroblasten der nicht TGF- β -exponierten

Kontrollgruppe (s. Tab. 7). Der prozentuale Vergleich ergab ein Mehrwachstum von 40 % am Tag 1, 72 % am Tag 3, 294 % am Tag 6, 141 % am Tag 9 und 16 % am Tag 12.

Im Gegensatz zum weiter oben dargestellten Wachstumsverhalten der mit 0,1 ng/ml behandelten Fibroblasten in den Inserts, welches keine klaren Unterschiede zu den Inserts der Kontrollgruppe aufwies, zeigten die Fibroblasten in den **Wells** des 0,1 ng/ml-Ko-Kultur-Systems ein deutlich stärkeres Zellwachstum als die Wells der Kontrollgruppe. Die Wachstumskurve orientiert sich an den Werten der Wells des 0,5-ng/ml-Ko-Kultur-Systems. Besonders deutlich wurde dies an den Tagen 6 und 9 nach TGF- β -Exposition der Inserts.

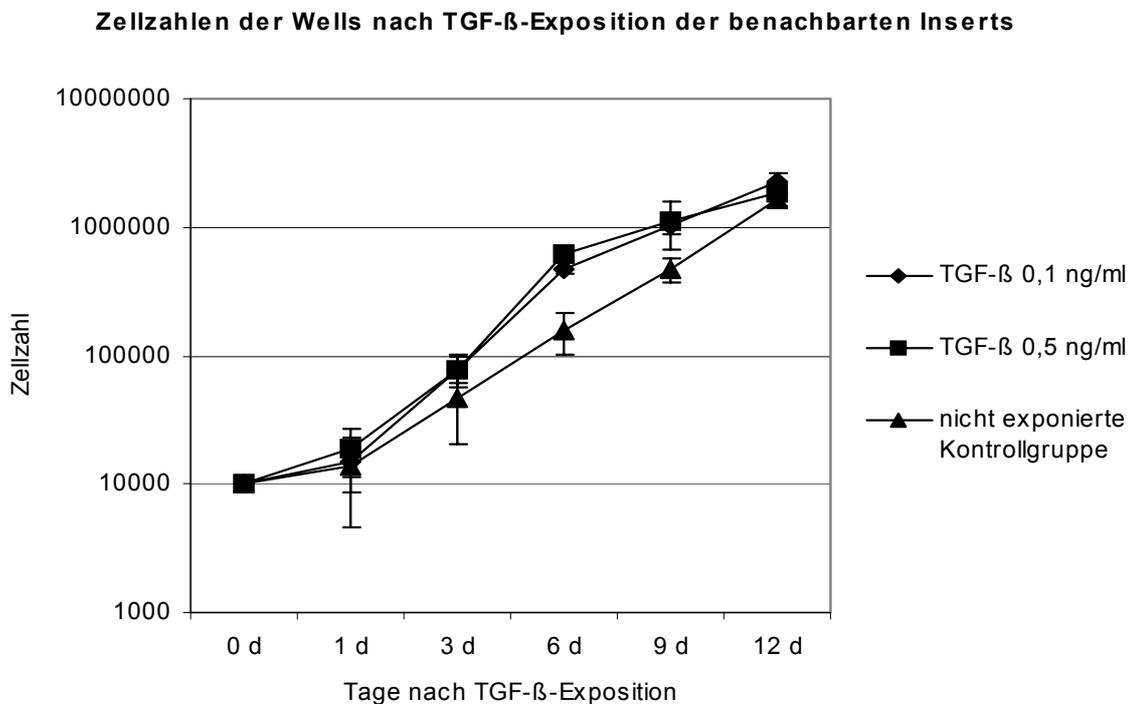


Abb. 17: Übersicht über die Zellzahlen der **Ko-Kultur-Wells** nach TGF- β -Exposition der benachbarten Inserts

Das prozentuale Mehrwachstum der Wells der 0,1 ng/ml-Ansätze reichte von 6,5 % (Tag 1) bis zu 200 % höheren Zellzahlen am Tag 6. Auch an den anderen Tagen war die Anzahl der Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Tag 3: 72 %, Tag 9: 124 %; Tag 12: 41 %).

An den Versuchstagen 1; 6 und 9 zeigte die Wachstumssteigerung eine Dosisabhängigkeit: Fibroblasten in den Wells der Kontrollgruppe proliferierten weniger als Fibroblasten in der Nachbarschaft von Zellen mit Kontakt zu 0,1 ng/ml TGF- β . Diese wiederum wiesen geringe Zellzahlen auf als die Wells des Ko-Kultur-Systems mit Zugabe von 0,5 ng/ml TGF- β zu den Inserts. Am Tag 12 waren die Zellzahlen der Kontrollgruppe ebenfalls niedriger als die der cytokinexponierten Ansätze, eine Dosisabhängigkeit zeigte sich aber nicht (s. Tab. 7).

4 Diskussion

4.1 Verhalten von kultivierten humanen Lungenfibroblasten nach Radiatio, Beeinflussung des Proliferationsverhaltens durch ionisierende Gamma-Strahlen

An den fibrotischen Umbauprozessen nach pulmonaler Radiatio sind die Fibroblasten des Lungengerüsts in aktiver Form beteiligt. Das früher postulierte Modell passiver narbiger Umbauvorgänge nach stattgehabtem Trauma als Ursache einer Fibrose nach Bestrahlung wurde verworfen [(63)].

Um das Proliferationsverhalten menschlicher Lungenfibroblasten *in vitro* nach Radiatio zu untersuchen, wurden humane fetale Lungenfibroblasten in einem Ko-Kultur-Modell kultiviert. Dabei sollte neben der direkten Beeinflussung des Zellwachstums durch Gamma-Strahlen mögliche Interaktionen mit nicht bestrahlten Fibroblasten untersucht werden.

Die Fibroblasten reagierten auf die durchgeführten Bestrahlungen mit einem deutlich vermindertem Wachstum, welches zusätzlich einem dosisabhängigen Effekt unterlag. So zeigte sich an einigen Meßzeitpunkten eine statistisch signifikante, dosisabhängige Reduktion der Fibroblastenzahlen in den Inserts (s. 3.1, Tab. 3 u. Abb. 10). Die nicht bestrahlten Fibroblasten proliferierten durchgehend am meisten, die mit 4 Gy bestrahlten Zellen zeigten ein stärkeres Wachstum als die mit 7 Gy bestrahlten Fibroblasten, und die Zellen der mit 10 Gy bestrahlten Inserts wiesen die geringsten Zellzahlen auf. Prozentual ausgedrückt, zeigte sich eine Zellzahlreduktion bis um 97,2 % der mit 10 Gy bestrahlten Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Desweiteren wurde im zeitlichen Verlauf eine prozentuale Steigerung der Wachstumshemmung innerhalb einer Dosis beobachtet. Diese Resultate im Sinne einer dosisabhängigen Beeinträchtigung der Proliferation konnten mehrfach reproduziert werden.

Im Kulturüberstand zeigen sich keine erhöhten Werte für LDH als Parameter einer radiogen bedingte Zytolyse (Daten nicht gezeigt). Die verminderten Zellzahlen sind somit Ausdruck einer echten Proliferationshemmung als Folge der Bestrahlung.

Zur Erklärung des verminderten zellulären Wachstums nach Radiatio mit ionisierenden Strahlen existieren verschiedene Ansätze. Die schwersten Auswirkungen für die Zelle stellen die DNA-Schäden wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Basenschäden, pathologische Quervernetzungen oder sogenannte „Bulky Lesions“ (irreparable Kombinationen der genannten Möglichkeiten) dar. Dafür verantwortlich sind im Gewebe entstehende freie Radikale wie O_2^- , H_2O_2 und OH^\cdot , welche die Zelle und die DNA angreifen und ihr Teilungspotential noch vor einem Verlust der Proteinsynthese und damit der Wachstumsfähigkeit schädigen oder zerstören können [(64)].

Eine diese Hypothese stützende Beobachtung ist der Arrest von in vitro kultivierten Fibroblasten in der G_1 - und G_2 -Phase des Zellzyklus nach Radiatio [(21); (13)]. Als Mechanismus wird eine spezifische Hemmung von Zellzyklus-Kinasen durch das Tumorsuppressor-Genprodukt p53 postuliert, welches durch Bestrahlung vermehrt exprimiert wird [(10)]. Diese Veränderung in der Abfolge des normalen Zyklus trat dosisabhängig nach Applikation von α - bzw. γ -Strahlung bei menschlichen Hautfibroblasten auf. Als Erklärung für diese Beobachtung wird angenommen, daß dadurch den Zellen vermehrt Zeit zur Verfügung gestellt wird, um entstandene DNA-Schäden zu reparieren. Dieser Stillstand in der normalen Abfolge des Zellzyklus mit dadurch ausbleibender Mitosephase könnte also neben einer direkten Beeinflussung des Teilungsapparates durch die einwirkenden Strahlen eine weitere Erklärung für die hier dargestellte Verminderung der Zellzahlen in den Kulturen bestrahlter Zellen darstellen.

Eine weitere, dritte Ursache für das reduzierte Teilungspotential bestrahlter Fibroblasten liegt in der von Bayreuther, Rodemann u.a. postulierten Differenzierungsfolge, welche Fibroblasten nacheinander durchlaufen [(7)]. Nach dieser Theorie ist das Fibroblasten-Zell-System hinsichtlich der beteiligten Subpopulationen, welche entsprechend einer bestimmten Abfolge ineinander übergehen, weitgehend gleich: die erste Stufe in der Differenzierung stellen die mitotisch aktiven Fibroblasten (MF = mitotic fibroblasts) mit jeweils drei Unterformen (MF I bis III) dar. Sie sind zu Zellteilungen befähigt und bilden die quantitative Mehrheit des Fibroblasten-Pools. Nach einer festen Anzahl von Teilungen erreichen sie das Stadium der postmitotischen, nicht mehr zur Zellteilung befähigten Fibrozyten (PMF = postmitotic fibrocytes) [(7); (59); (60); (26); (31)]. Auch letztere treten in drei Unterformen auf (PMF IV bis VI). Während die MF nur in geringem Maß Bestandteile der extrazelluläre Matrix wie Kollagene, Proteoglykane oder

Fibronectin produzieren, sind die PMF die Hauptlieferanten für Wachstumsfaktoren, bindegewebbildende Komponenten und andere Proteine zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase. Das physiologischerweise vorkommende Verhältnis von MF zu PMF liegt bei einem relativ konstanten Wert von ca. 2:1 [(8); (60); (31); (9)]. Wie Experimente verschiedener Forschungslabors ergaben, reagiert das Fibroblastenzellsystem auf ionisierende Strahlung mit einer vorzeitigen terminalen Differenzierung zu postmitotischen Fibrozyten [(58); (59); (60); (8); (40); (9); (30)]. Sind physiologischerweise ca. 25 bis 35 Zellzyklen für die Differenzierung zu postmitotischen Fibroblasten nötig, erreichten bestrahlte mitotisch aktive Fibroblasten das PMF-Stadium schon nach 3 bis 4 Zyklen [(60)].

So erhöhte sich der Anteil von postmitotischen menschlichen Lungenfibroblasten von 3 % aller Fibroblasten vor der Bestrahlung auf 70 % nach Radiatio mit 1 Gy bzw. 93 % nach einer einmaligen Radiatio mit 7 Gy [(58)].

Es ist möglich, daß eine durch die Bestrahlung induzierte, vorzeitige Differenzierung der Fibroblasten zu postmitotischen Fibrozyten zu der beschriebenen Zellzahlenverminderung der Zellkulturen beigetragen hat. Noch vorhandene mitotisch aktive Fibroblasten können zwar weiterhin Zellteilungen durchführen, doch ist wahrscheinlich, daß deren Wachstumspotential nicht ausreicht, vergleichbare Zellzahlen wie nicht bestrahlte Zellkulturen zu erbringen.

Neben diesen direkt durch eine Radiatio bedingten Änderungen des Proliferationsverhaltens von Fibroblasten sollen noch andere Aspekte erläutert werden. Wie im Ergebnisteil geschildert, wurde ein generell vermindertes Zellwachstum in allen Inserts beobachtet, verglichen mit dem Wachstum der Fibroblasten in den Wells gleicher Bedingungen. Der Anstieg der Wachstumskurven beider Kompartimente war dagegen gleich, die Kurvenverläufe bilden sich parallel im Diagramm ab (s. 3.1, Abb.7).

Dies lag am ehesten an den verschiedenen Kultivierungsbedingungen, bedingt durch die unterschiedliche Bodenbeschaffenheit der Kulturgefäße. Die Wells besitzen einen glatten Boden ohne Unebenheiten. Die Inserts dagegen verfügen über Poren im Boden und über eine kleinere Grundfläche, welche Voraussetzung für die Einsetzbarkeit in die Wells ist. Die Poren, welche zu klein für eine Migration der Fibroblasten sind, könnten ein „Einhaken“ der Zellausläufer der Fibroblasten bewirkt haben. Dadurch wäre ein

Lösen der Zellen erschwert und weniger Fibroblasten würden in die Zellzählung mit eingehen.

Dieser Effekt der parallel verlaufenden Wachstumskurven der Fibroblasten in den Wells / Inserts ließ sich in gleicher Weise während aller Experimente reproduzieren. Es ist demnach von einem systemisch wirksamen Einflußfaktor auf das Proliferationsverhalten der Fibroblasten in den Wells bzw. Inserts auszugehen.

Bei einer Beurteilung der in den Experimenten ermittelten Zellzahlen muß ebenfalls berücksichtigt werden, daß die verwendeten Fibroblasten der Linie MRC-5 der Passage 17 ein teilweise sehr unterschiedliches Wachstumspotential zeigten. Die Grundtendenzen der Ergebnisse während verschiedener Versuchsdurchführungen waren zwar ähnlich - gerade auch im Hinblick auf die prozentuale Verminderung der Proliferation nach Radiatio -, die genauen Zellzahlen wiesen aber z.T. größere Unterschiede auf. Folgende Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen Zellzahlen der bestrahlten Ko-Kultur-Inserts zweier Versuche:

	Tage der Inkubation				
	1	3	6	9	12
Inserts Versuch 2 (nicht bestrahlt)	3 800 (1 100)	12 600 (700)	59 700 (8 800)	174 100 (39 000)	444 300 (110 900)
Inserts Versuch 3 (nicht bestrahlt)	5 400 (1 700)	2 800 (1 000)	19 400 (3 100)	39 500 (8 600)	232 500 (50 100)
Inserts Versuch 2 (mit 7 Gy bestrahlt)	2 100 (1 400)	3 000 (400)	6 500 (2 000)	18 800 (5 800)	34 300 (17 500)
Inserts Versuch 3 (mit 7 Gy bestrahlt)	3 100 (1 800)	2 900 (1 000)	2 200 (900)	4 700 (1 200)	6 500 (2 300)

Tab. 8: Vergleich der Zellzahlen der bestrahlten **Inserts** von Versuch 2 und 3 (Mittelwerte, Standardabweichung in Klammern)

Die Fibroblasten-Zellzahlen des Versuchs 3 waren fast durchgehend niedriger als die Zellzahlen der gleichen Bedingungen von Versuch 2. An den Tagen 3 und 6 nach Radiatio mit 7 Gy sanken die Zahlen von Versuch 3 jeweils noch unter die Werte der vor-

herigen Meßzeitpunkte ab. Diese Einschränkung der Vitalität wurde möglicherweise durch die Phase des Tieffrierens vor Versuchsbeginn hervorgerufen. Die Aussagekraft der vorgelegten Daten wurde durch diese Variabilität nicht beeinträchtigt.

In der Zusammenfassung läßt sich feststellen, daß das Proliferationsverhalten von in vitro kultivierten Fibroblasten nach Radiatio in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis inhibiert wurde. Die prozentuale Verminderung des Zellwachstums ließ über die Meßzeitpunkte hinweg deutliche Unterschiede in der Stärke der Inhibition durch die einzelnen Dosen erkennen.

Diese Beobachtung wird theoretisch unterstützt von den Auswirkungen ionisierender Strahlen auf lebende Zellen und hat auch unter der Beachtung möglicher Störquellen einer exakten Arbeit mit Zellkulturen Bestand.

4.2 Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Fibroblasten in Ko-Kultur

Nach Radiatio mit 4; 7 bzw. 10 Gy wurden die bestrahlten Fibroblasten zusammen mit nicht bestrahlten Zellen in einem Ko-Kultur-System für einen festgelegten Zeitraum von 12 Tagen kultiviert. Über gemeinsames Nährmedium standen bestrahlte und unbestrahlte Fibroblasten, welche erst nach der Radiatio der dafür vorgesehenen Inserts gemeinsam kultiviert wurden, während der gesamten Zeit in indirektem Kontakt. Es wurde die Hypothese untersucht, daß Fibroblasten nach Bestrahlung das Proliferationsverhalten nicht bestrahlter Fibroblasten beeinflussen.

Es zeigte sich, daß die ko-kultivierten, nicht selbst bestrahlten Fibroblasten ein gegenseitiges Wachstumsverhalten im Vergleich zu den bestrahlten Fibroblasten aufwiesen: während die Proliferation der Zellen in den bestrahlten Inserts dosisabhängig gehemmt wurde (siehe 4.1), waren die Zellzahlen der **Wells** der bestrahlten Ko-Kultur-Systeme höher als die der Wells der Kontrollgruppe. Es konnte eine auf die Bestrahlungsdosis der Inserts bezogene, direkt proportionale Wachstumsförderung der nicht bestrahlten Fibroblasten nachgewiesen werden. Diese Dosisabhängigkeit war an einigen Meßzeitpunkten statistisch signifikant (s. 3.1, Abb. 12-14, Tab. 4). So zeigte sich am Tag 3 nach Radiatio ein Mehrwachstum der Fibroblasten in den Wells des 4 Gy-Ko-Kultur-Systems von 22 %, bei 7 Gy lagen 70 % und bei 10 Gy 92 % höhere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Bei einer Zellzahl von ungefähr 2 Millionen pro Kavität glichen sich die einzelnen Werte an. Möglicherweise wurden durch eine dann einsetzende Kontaktinhibition weitere Proliferationsunterschiede verhindert. Zusammenfassend weisen diese Beobachtungen auf eine Wachstumsstimulation nicht bestrahlter Fibroblasten durch benachbarte, bestrahlte Fibroblasten.

Desweiteren wurde die Hypothese zellulärer Interaktionen innerhalb des Ko-Kultur-Modells ohne Radiatio des einen Kompartiments geprüft. Dafür wurden die Zellzahlen fibroblastengefüllter Wells ohne benachbarte Inserts (Ansatz 2, s. 2.7) mit den Zahlen der Ko-Kultur-Wells (Ansatz 3) verglichen. Hier zeigten sich keine von der normal auftretenden Zellzahl-Varianz abweichende Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Die beob-

achtete Mehrproliferation von Fibroblasten in Ko-Kultur mit bestrahlten Zellen ist also am ehesten Folge der Radiatio.

Die vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, daß Fibroblasten nach Radiatio über bestimmte Mechanismen, z.B. Produktion wachstumsfördernder Substanzen, einen proliferationsstimulierenden Effekt auf benachbarte Fibroblasten ausüben können. Ionisierende Strahlen können eine verstärkte zelluläre Genexpression bewirken. So wurden vermehrt bestimmte Transkriptionsfaktoren (c-Jun, c-Fos oder egr-1) nach Radiatio nachgewiesen. Diese Faktoren aktivieren die Gentranskription verschiedener Cytokine und auch anderer Genprodukte, welche an normalen reparativen Vorgängen nach Gewebsverletzung beteiligt sind. So wurden an verschiedenen Zeitpunkten nach pulmonaler Bestrahlung eine erhöhte Aktivität von Interleukin-I, TNF- α , PDGF und TGF- β nachgewiesen [(19); (75)]. Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) gehört zu den am besten untersuchten und charakterisierten Botenstoffen bezüglich der radiogen bedingten Gewebeschädigung. TGF- β hat vielseitige Wirkungen auf die Regulierung des Immunsystems, beeinflußt die Migration und Proliferation verschiedener Zellarten und kontrolliert das metabolische Gleichgewicht der extrazelluläre Matrix [(35); (44); (56)]. Es wurde mehrfach gezeigt, daß TGF- β bei der entzündlichen Gewebsreaktion und der Reparatur nach Radiatio mit ionisierenden Strahlen eine wichtige Rolle spielt [(3); (28); (63)].

Auf die detaillierten Wirkungen von TGF- β hinsichtlich Zellproliferation, extrazellulärer Matrix, Immunsystem u.a. wird im Abschnitt 4.3.2 und 4.4 eingegangen. Im Zusammenhang mit den zellulären Interaktionen zwischen Fibroblasten nach Radiatio ist vor allem die Beziehung: Bestrahlung - erhöhte Synthese von TGF- β und anderen Cytokinen - Induktion fibrogener Umwandlungsprozesse interessant. In Tierexperimenten wurde gezeigt, daß bereits wenige Stunden bis Tage nach thorakaler Radiatio von Mäusen sowohl die Genexpression als auch die Proteinsynthese von TGF- β in der Lunge stimuliert waren und diese erhöhten Level bis zu mehreren Wochen nach Bestrahlung persistierten [(19); (62); (63)]. Der PCR-Nachweis für die Genexpression von TGF- β war bereits wenige Stunden nach Radiatio stark positiv. Auch eine Dosisabhängigkeit der reaktiven TGF- β -Mehrexpression war erkennbar. Während nach 12 Gy die

Erhöhung der mRNA-Expression für TGF- β deutlich und mehrgipflig über einige Wochen nachweisbar war, trat nach einer einmaligen Radiatio mit 6 Gy eine nur geringgradige Erhöhung über eine Dauer von wenigen Stunden auf [(63)]. In immunhistochemischen Untersuchungen konnten neben Alveolarmakrophagen und Typ-II-Pneumozyten auch Fibroblasten als Bildungsorte von TGF- β eruiert werden [(19); (62); (63)]. Die Regionen mit erhöhter Genexpression und Produktion von TGF- β zeigten sich identisch mit den histopathologisch nachgewiesenen Gebieten reparativer und in späterer Folge fibrotischer Umbauprozesse.

Auch bei direkter Untersuchung von Fibroblasten in Zellkultur nach Radiatio konnte eine erhöhte Produktion von TGF- β beobachtet werden [(40); (59)]. Humane Lungenfibroblasten (vorwiegend mitotisch aktive Fibroblasten) reagierten auf eine Radiatio mit steigenden Dosen von 0 bis 8 Gy mit einer dosisabhängigen vermehrten Synthese von TGF- β innerhalb von 48 Stunden nach Bestrahlung. Kulturen, welche großenteils aus postmitotischen Fibrozyten bestanden, zeigten dagegen keine Veränderung ihrer TGF- β -Produktion nach Radiatio [(60)]. Andere Versuchsmodelle ergaben, daß kultivierte Rattenfibroblasten nach einer einmaligen Bestrahlung mit 4 Gy eine 40 %-ige Steigerung ihrer TGF- β -Synthese aufwiesen [(26)].

Ein weiterer wichtiger Umstand in der Beurteilung der Cytokinwirkung nach Radiatio ist die Tatsache, daß ionisierende Strahlen latentes TGF- β aktivieren können [(5)]. Dieser Vorgang tritt schon bei geringen Dosen ab 0,1 Gy auf [(15)]. Zusätzlich wird durch die Bestrahlung induziertes, neu gebildetes TGF- β bereits in seiner aktiven Form sezerniert [(4); (5)]. Damit wird ein wichtiger, sonst von körpereigenen Proteasen durchgeführter Schritt in der Regulation der Cytokinaktivität der physiologischen Kontrolle enthoben. Dies ist besonders bei Patienten mit therapeutischer Radiatio aufgrund maligner Tumore von Bedeutung, da angenommen wird, daß nicht erhöhte Plasma-TGF- β -Level per se, sondern nur vermehrt zirkulierendes aktives TGF- β zu pulmonalen Schädigungen führt [(3)].

Damit im Zusammenhang steht die Beobachtung von Murrell et al. von 1990, wonach Fibroblasten humaner Muskelfaszien auf den Kontakt mit freien Sauerstoffradikalen in subletalen Dosen mit einer vermehrten Proliferation reagierten. Der Einsatz von Radikalfängern führte zu einer Hemmung des Zellwachstums. Als Erklärung wird postuliert,

daß über diese Reaktion der Prozess der Wundheilung nach erfolgter Schädigung verstärkt wird [(51)]. Unter Berücksichtigung späterer Experimente, wonach - wie oben bereits erwähnt - Cytokine und insbesondere TGF- β durch ionisierende Strahlen direkt aktiviert werden können, kann man vermuten, daß die damals beobachtete Proliferationsförderung über zwischengeschaltete Cytokine vermittelt wurde.

In der Zusammenfassung läßt sich feststellen, daß Fibroblasten auf Bestrahlung sowohl in vitro als auch in vivo mit der vermehrten Synthese von TGF- β reagieren. TGF- β ist eine potente fibrogene Substanz mit Auswirkungen auf das Synthese- und Proliferationsverhalten der matrixbildenden Fibroblasten. Die hier vorgestellten Daten zur sichtlichen Wachstumsstimulation nicht bestrahlter Fibroblasten durch ko-kultivierte, bestrahlte Fibroblasten ergänzen und unterstützen die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen und lassen einen cytokinvermittelten Mechanismus vermuten. Dabei ist neben anderen Cytokinen eine Beteiligung von TGF- β wahrscheinlich. Es ist bekannt, daß TGF- β über para- und autokrine Mechanismen Fibroblasten zur vermehrten Synthese des Cytokins stimulieren und damit auch nach Wegfall externer Reize wie z.B. der Radio eine persistierende Proliferation und Proteinsynthese bewirken kann (siehe 4.4). Eine Verifizierung dieser Hypothese durch den Einsatz spezifischer Anti-TGF- β -Antikörper wurde in den vorgestellten Versuchsreihen nicht durchgeführt und bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

4.3 Bedeutung von Cytokinen bei den reaktiven Vorgängen nach Einwirkung ionisierender Strahlung

4.3.1 Modell der Cytokinkaskade nach Radiatio

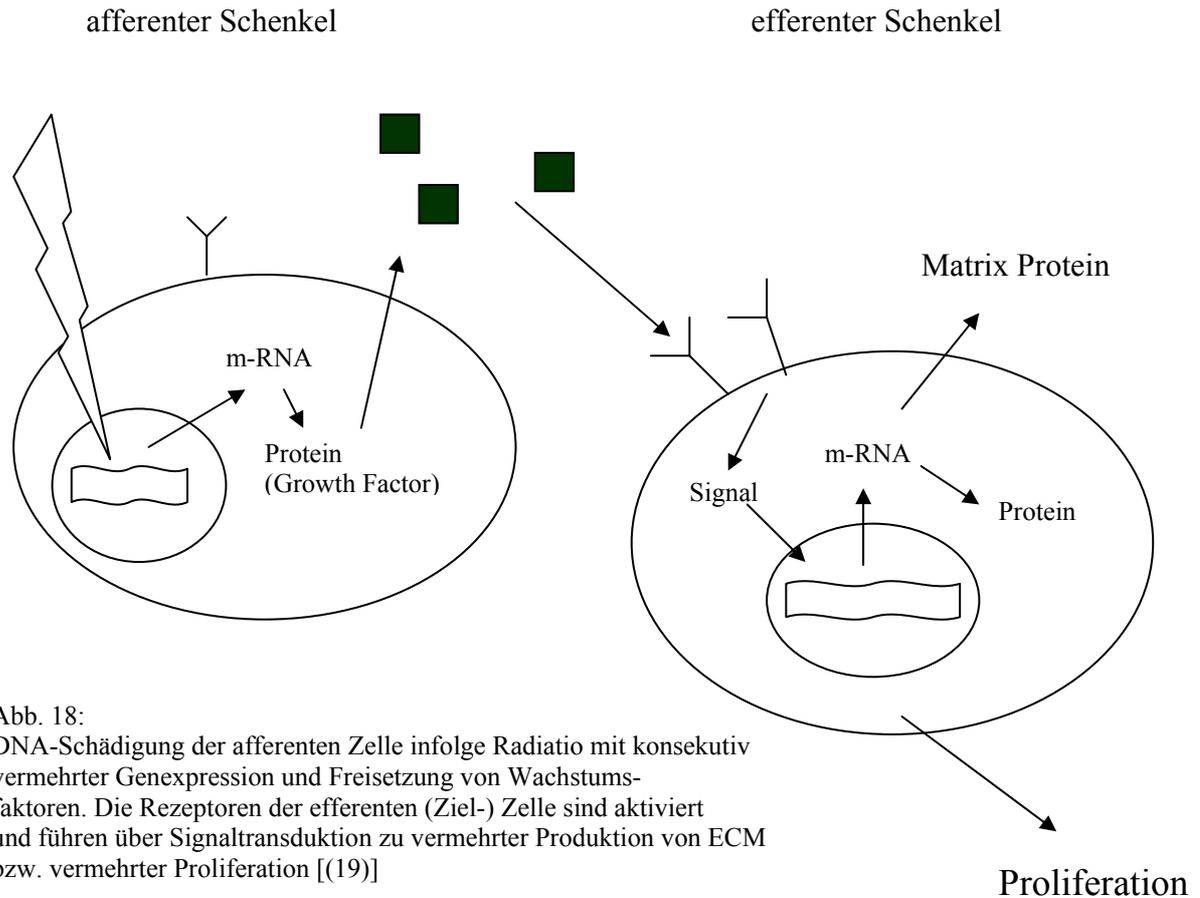
Entgegen der noch vor wenigen Jahren geltenden Meinung vertritt man heute die Ansicht, daß eine Fibrose per se keine passive reparative Reaktion auf eine erfolgte Gewebeschädigungen ist, sondern ein eigenständig kontrolliertes und unabhängiges Netzwerk zellulärer Interaktionen mit der Beteiligung zahlreicher Zellen und von ihnen produzierter Botenstoffe, sogenannter Cytokine, darstellt. Als Cytokine bezeichnet man von einer Vielzahl von Zellen gebildete und sezernierte Substanzen, die als Mediatoren weitere Zellen in ihren Eigenschaften beeinflussen. In diese Gruppe gehören neben Interleukinen, Lymphokinen und Monokinen auch die Wachstumsfaktoren [(57)].

Nach der Einwirkung ionisierender Strahlen auf Lungengewebe konnten ansteigende Konzentrationen von Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) gemessen werden [(19); (75)]. Sie werden als proinflammatorische Cytokine bezeichnet und vorwiegend von Monocyten und Makrophagen, aber auch von Endo- und Epithelzellen, Fibroblasten und anderen Zellen sezerniert. Es wird angenommen, daß durch den Reiz der Radiatio diese temporär einwandernden Entzündungszellen und auch ortsständige Zellen zur Bildung dieser Botenstoffe stimuliert werden [(62); (28)]. Sie wirken chemotaktisch und aktivierend auf gewebeständige Zellen und weitere Entzündungszellen und stimulieren die Produktion gewebelysierender Enzyme.

Zusätzlich wurde beobachtet, daß neben den inflammatorischen Cytokinen auch sogenannte profibrotische Cytokine nach Bestrahlung vermehrt im Gewebe und im Plasma nachweisbar waren. Dazu zählen platelet derived growth factor (PDGF), insulin like growth factor 1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (b-FGF) und transforming growth factor beta (TGF- β). Auch hier stellen Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten zunächst die Hauptbildungsstelle dar. Man geht davon aus, daß diese Cytokine entweder als direkte Reaktion auf die Bestrahlung oder nach Stimulation durch zuvor gebildete proinflammatorische Substanzen sezerniert werden. Diese profibrotischen Faktoren sind in die Vorgänge der Gewebereparatur involviert und wirken chemotaktisch, mitogen und synthesefördernd auf Endothelzellen und Fibroblasten

[(62); (72)]. Sie sind bei allen physiologischen Reparationsvorgängen mit ihren proliferationsfördernden Wirkungen und ihrem Vermögen, die Fibroblasten zu einer erhöhten Bindegewebsproduktion zu stimulieren, beteiligt.

Es konnte nachgewiesen werden, daß nach Abklingen der akuten strahlenbedingten Entzündungsreaktion viele profibrotische Faktoren weiterhin im Gewebe persistierten und im Sinne einer autokrinen Aktivierungsschleife von den ortsständigen Lungenzellen produziert wurden [(62); (28)]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem in Abschnitt 4.4 geschilderten gesteigerten Wachstumspotential von TGF- β -exponierten Fibroblasten auch noch lange nach Ende des Cytokinkontaktes. Der Zusammenhang zwischen profibrotischen Cytokinen und zellulärer Proliferation und Proteinsynthese in bestrahltem Lungengewebe kann durch ein von Finkelstein et al. etabliertes Modell veranschaulicht werden (s. Abb. 18). Danach werden Makrophagen und Typ-II-Pneumozyten dem afferenten Schenkel zugerechnet. Durch die Bestrahlung kommt es bei diesen Zellen zu DNA-Schäden mit Strangbrüchen und veränderter Genexpression innerhalb von Stunden. Es resultiert eine vermehrte Bildung von Wachstumsfaktoren, insbesondere von TGF- β . Die Zellen des efferenten Schenkels (Fibroblasten) zeigen daraufhin einen erhöhten Aktivierungszustand ihrer Wachstumsfaktor-Rezeptoren und reagieren auf den Kontakt mit diesen Cytokinen mit einer Mehrsynthese von extrazellulärer Matrix sowie mit erhöhtem Wachstumspotential [(19); (62)]. Diese Verhältnisse mit resultierenden fibrotischen Umbauprozessen sind noch Wochen bis Monate nach erfolgter Bestrahlung nachweisbar.



Es ist bekannt, daß die beschriebene Cytokinkaskade, einmal initiiert, einen sich selbst unterhaltenden Prozeß darstellt und während aller Phasen der Lungenschädigung bis zum Eintreten chronisch-fibrotischer Veränderungen aktiv ist. Welche Mechanismen daran ursächlich beteiligt sind und wie man durch Eingreifen in diese Abläufe eine Limitierung dieser überschießenden Bindegewebsbildung erreichen kann, muß weiter geklärt werden.

4.3.2 Transforming Growth Factor-beta

Das Cytokin Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) ist an Pathogenese und Verlauf fibrotischer Erkrankungen ursächlich beteiligt.

Erstmals 1981 beschrieben, fiel es zunächst durch die Fähigkeit auf, Zellen hinsichtlich ihrer geforderten Umgebungsbedingungen zu transformieren [(33); (43)]. Nach dem Einfluß des Cytokins sind Zellen dazu befähigt, in soft agar Kolonien zu bilden und ein als „anchorage independent growth“ bezeichnetes Wachstumsverhalten zu zeigen. Dies bedeutet, daß nicht-neoplastische Zellen, welche normalerweise eine feste Grundlage zum Wachsen benötigen, ohne Bodenverankerung wachsen können. Diese Fähigkeit besitzen physiologischerweise nur Fibroblasten aus fibrotischem Gewebe und neonatale Fibroblasten, adulte Fibroblasten dagegen nicht [(33); (22); (71)].

Es existieren fünf Subtypen von TGF- β (TGF- β 1 bis TGF- β 5), von denen die Typen 1 bis 3 bei Säugetieren vorkommen und Typ 1 den Hauptanteil der TGF- β -vermittelten Wirkungen trägt [(35); (12)]. Das humane TGF- β 1 wird ubiquitär von vielen Zellen gebildet und zirkuliert im Plasma als großer, inaktiver, an α 2-Makroglobulin gebundener Proteinkomplex von 390 Aminosäuren [(35); (3); (47)]. Dieser Komplex besteht aus dem eigentlichen TGF- β -Molekül von der Größe 25 kDa, dem latency associated peptide (LAP) und dem latent TGF- β -binding protein (LTBP). Die Disulfidbrückenbindung zwischen LAP und LTBP ist Voraussetzung für die Funktion des LTBP, Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix einzugehen und dadurch die dortige Speicherung des inaktiven Cytokinkomplexes zu vermitteln [(50); (12)].

Während des Aktivierungsschritts wird TGF- β vom LAP mittels Proteasen in vivo oder Säurekontakt bzw. anderen unphysiologischen Bedingungen in vitro abgespalten [(50); (12); (47)]. Der Vorgang der Aktivierung des latenten TGF- β stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus dar. Für diesen Prozess spielt ein spezifischer TGF- β -Rezeptor eine wichtige Rolle, der eine Mannose-6-Phosphat-Kette beinhaltet und von vielen Zellen exprimiert wird [(3); (56)]. Nach Bindung an diesen Rezeptor kann die enzymatische Abspaltung des LAP hauptsächlich durch Plasmin und andere Proteasen wie Katherpsin erfolgen.

Als Reaktion auf Gewebeschädigungen bewirken Makrophagen und andere inflammatorische Zellen eine verstärkte TGF- β -Aktivierung. Durch Einwirkung ionisierender

Strahlen kann bereits vorhandenes TGF- β direkt aktiviert werden. Als Mechanismus wird eine Aktivierung des Cytokins durch entstandene Sauerstoffradikale angenommen [(5)]. Desweiteren können bestrahlte Zellen TGF- β unmittelbar in seiner metabolisch aktiven Form sezernieren und so den Regulationsmechanismus der kontrollierten proteolytischen Aktivierung umgehen [(4); (15); (50)].

Die von TGF- β hervorgerufenen Effekte werden über spezifische Rezeptoren vermittelt. Sie werden als TGF- β -Rezeptoren Typ I, Typ II und Typ III (T β R-I, T β R-II und T β R-III) bezeichnet. T β R-I und T β R-II sind membrangebundene Rezeptoren und beide an der intrazellulären Weiterleitung der TGF- β -Wirkung beteiligt [(43); (56)]. Der Typ-III-Rezeptor kommt in einer membranständigen und löslichen Form vor und ist offensichtlich nicht zur Signaltransduktion befähigt. Seine Aufgabe liegt wahrscheinlich in einer Transportfunktion für TGF- β im Plasma [(35)]. Nach Bindung des TGF- β -Moleküls an die membrangebundenen Rezeptoren erfolgt über intrazelluläre Transduktionswege (Aktivierung von Kinasen, Phosphorylierungsschritte) die Regulation von Gentranskription und Proteinsynthese [(12); (47); (53); (27)].

Makrophagen und Typ-II-Pneumozyten sind die quantitativ wichtigsten Bildungsorte für TGF- β . Aber auch neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten, mesenchymale Zellen wie glatte Muskelzellen, Bronchialepithelzellen und Fibroblasten sind in der Lage, TGF- β zu produzieren [(22); (46); (63); (66)].

Die Familie der TGF- β -Proteine stellt eine Gruppe multifunktionaler Wachstumsfaktoren dar, welche an der embryonalen Entwicklung, Tumorgenese, Fibrose, Wundheilung, Hämatopoese und immunoregulatorischen Vorgängen beteiligt sind [(35); (43); (12); (56)]. Der Isoform TGF- β 1 wird der Hauptanteil an der Vermittlung der beschriebenen Wirkungen bei Säugetieren zugesprochen.

TGF- β 1 kontrolliert das Gleichgewicht von Synthese und Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) mit Verschiebung zu einer positiven Bilanz. Die Fibroblasten werden zu vermehrter Produktion von Kollagen und Fibronectin angeregt. Gleichzeitig wird deren Abbau durch verminderte Synthese von Proteasen sowie durch vermehrte Bildung von Protease-Inhibitoren reduziert. [(22); (5); (12); (47)]. Desweiteren beeinflusst TGF- β 1 das Proliferationsverhalten verschiedener Zellen. Es ist ein potenter Inhibitor des Wachstums von Epithelzellen, Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen, kann aber

auf einige mesenchymale Zellen auch proliferationsfördernd wirken [(47)]. Die detaillierten Ausführungen zur Proliferationsmodulation durch TGF- β werden in Abschnitt 4.4 vorgestellt.

Die Einflüsse auf das Immunsystem sind generell negativ regulierender Art. Experimente mit TGF- β -knock out-Mäusen zeigten, daß das Cytokin eine äußerst wichtige Rolle bei der Modulation und Terminierung immunologischer Vorgänge in vivo hat. Diese knock out-Mäuse sind gekennzeichnet durch eine vermehrte Entwicklung und Aktivität entzündlicher Prozesse mit erhöhter Stimulation immunologischer Zellen und gehäufte Manifestation autoimmun-ähnlicher Erscheinungen [(45); (12); (47); (56)].

TGF- β hemmt die Proliferation von B- und T-Lymphozyten, ihr Reaktionsvermögen auf den Einfluß von Cytokinen sowie die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen [(35); (12); (56); (47)].

Desweiteren wird die Immunglobulin-Produktion durch B-Lymphozyten mit Ausnahme von IgA durch TGF- β supprimiert. Makrophagen bilden weniger NO und haben damit eine geringere toxische Wirkung [(73); (43)]. Die Phagozytose von Makrophagen wird dagegen nicht eingeschränkt. Man kann spekulieren, daß TGF- β dadurch zwar ein Abtransportieren schädlicher Pathogene im Gewebe ermöglicht, die Ausbildung einer unerwünscht starken Entzündungsreaktion mit exzessiver Lymphozytenaktivierung dagegen zum Teil unterdrückt [(46)]. In diese Richtung weisen auch Beobachtungen, wonach TGF- β das Anheften von Leukozyten an Gefäßendothelzellen als Voraussetzung einer Migration der inflammatorischen Zellen in verletzte Regionen verhindern kann [(63); (56)].

Neben einigen Unterformen der T-Lymphozyten sind auch Natürliche Killerzellen (NKZ) dazu befähigt, spontan bedeutende Mengen an aktivem und latentem TGF- β zu produzieren. Dadurch verstärken CD8(+) T-Suppressorzellen ihren inhibitorischen Einfluß auf die Antikörper-Produktion und tragen somit zur Beendigung von Abwehrreaktionen bei [(32)]. Man kann TGF- β somit als ein immunsuppressives Cytokin bezeichnen, welches einen physiologischen Toleranzzustand des Organismus gegenüber eindringenden Fremdstoffen aufrechterhält, Immunreaktionen zusammen mit anderen Molekülen terminiert und durch sein ubiquitäres Auftreten im Plasma und den meisten Organen eine Reservoir- und Präventionsfunktion für diese Aufgaben erfüllt [(56)].

Eine weitere Eigenschaft von TGF- β ist die Fähigkeit zur Autoinduktion. Darunter versteht man eine vermehrte zelluläre Cytokin-Synthese unmittelbar nach Kontakt des entsprechenden Cytokins mit der Zielzelle. In Bezug auf TGF- β bedeutet dies, daß Fibroblasten auf Stimulation mit der Substanz mit einer vermehrten Produktion von TGF- β reagieren [(36)]. Nach 4-stündiger Gabe von TGF- β in den Dosen von 1 bis 10 ng/ml zu normalen fetalen Lungenfibroblasten konnte beispielsweise eine bis auf das Vierfache verstärkte Genexpression sowie erhöhte Proteinkonzentration von TGF- β im Kulturüberstand nachgewiesen werden [(34)]. Dieses TGF- β lag in seiner latenten Form vor [(42); (34)] und wurde als Isoform TGF- β 1 identifiziert. Erhöhte Konzentrationen von TGF- β 1 wurden bereits 9 Stunden nach externer Zugabe von TGF- β gemessen, erreichten das Maximum nach 16 Stunden und waren bis zum Ende des Versuches nach 72 Stunden nachweisbar. Damit konnte die Persistenz der endogenen Cytokin-Produktion auch nach Wegfall des externen Stimulus nachgewiesen werden. Adulte normale und aus fibrotischem Gewebe stammende Lungenfibroblasten reagierten ebenfalls auf eine TGF- β -Stimulation mit einer erhöhten autokrinen Synthese des Cytokins.

Eine ebenfalls gesteigerte autokrine TGF- β -Produktion durch Fibroblasten kann durch Radiatio der Zellen induziert werden (siehe auch 4.2). Es konnte mehrfach gezeigt werden, daß Mediumüberstände von kultivierten und bestrahlten Zellen erhöhte TGF- β -Konzentrationen aufwiesen und auf andere, nicht vorbehandelte Fibroblasten-Kulturen eine proliferations- und differenzierungsfördernde Wirkung hatten [(60)].

Es kann somit davon ausgegangen werden, daß TGF- β bei Fibroblasten über die Zeit des direkten Kontaktes hinaus zu persistierenden Aktivierungszuständen hinsichtlich der Produktion wachstumsfördernder Stoffe führt und damit die Ausbildung und Progredienz fibrotischer Umwandlungsprozesse fördert.

4.4 Einfluß von Transforming Growth Factor-beta auf das Proliferationsverhalten humaner fetaler Lungenfibroblasten in vitro

Bei fibrosierenden Erkrankungen wie der Lungenfibrose nach Radiatio trägt TGF- β neben anderen Cytokinen einen Hauptanteil an der Initiation und Progredienz der bindegewebigen Umbauvorgänge. In den hier vorgestellten Versuchen sollte geklärt werden, ob und welchen Einfluß diese Substanz auf das Proliferationsverhalten humaner fetaler Lungenfibroblasten in vitro hat. Dazu wurde TGF- β in zwei verschiedenen Konzentrationen zu Fibroblasten zugegeben und diese im Anschluß mit Fibroblasten ohne TGF- β -Kontakt ko-kultiviert. Damit wurde die Hypothese untersucht, ob Fibroblasten nach Kontakt mit TGF- β selbsttätig benachbarte Zellen zu verstärktem Wachstum anregen und dadurch das Fortschreiten fibrosierender Vorgänge begünstigen.

Die Experimente ergaben, daß humane fetale Lungenfibroblasten auf die Gabe von TGF- β mit einer Zunahme der Proliferation reagierten. Innerhalb dieser Wachstumsstimulation ließ sich ein zunehmender Effekt mit steigender Dosis erkennen. Nach der Applikation von 0,1 ng/ml TGF- β über 8 Stunden zeigte das Proliferationsverhalten eine uneinheitliche Reaktion. Die mit 0,5 ng/ml stimulierten Fibroblasten dagegen zeigten über alle 12 Versuchstage hinweg höhere Fibroblastenzahlen als parallel kultivierte Kontrollgruppen. Der prozentuale Unterschied im Zellzahlvergleich betrug bis zu 158 % mehr Fibroblasten je Kulturgefäß als bei den nicht stimulierten Kontrollen (siehe auch 3.2.1).

Diese Beobachtung einer dosisabhängigen Proliferationsstimulation galt ebenfalls für die ko-kultivierten, nicht selbst mit TGF- β in Kontakt gekommenen Fibroblasten. Hier trat die konzentrationsgebundene Erhöhung der Zellzahlen noch klarer hervor. Sowohl bei den Wells in Nachbarschaft zu den mit 0,1 als auch mit 0,5 ng/ml TGF- β behandelten Inserts wurden höhere Fibroblastenzahlen ermittelt als bei den Kontrollkulturen ohne Cytokinkontakt. In der ersteren Gruppe wurden bis zu 200 % mehr Fibroblasten in den Wells der Ko-Kultur gezählt. Die Wells der Ko-Kultur-Modelle mit der höheren TGF- β -Stimulation wiesen bis zu fast 300 % höhere Zellzahlen auf als die Kontrollen (siehe 3.2.1).

An den Tagen 1; 3; 6 und 9 lag eine Dosisabhängigkeit des Zellwachstums im Sinne einer Mehrproliferation bei steigender Cytokindosis vor. Am letzten Tag des Versuches (Tag 12) wiesen die Wells der Kontrollgruppe ebenfalls niedrigere Zellzahlen auf als die Wells der TGF- β -stimulierten Ko-Kultur-Systeme, eine Dosisabhängigkeit war jedoch nicht mehr nachweisbar. Die Zahlen lagen zwischen 1,6 und 2,3 Mio. Fibroblasten pro Well. Bei allen durchgeführten Versuchen zeigte sich bei Erreichen vergleichbarer Zellzahlen keine signifikanten Unterschiede im weiteren Wachstum. Als mögliche Ursachen werden zelluläre Interaktionen (Kontaktinhibition), eine veränderte Sensibilität gegenüber proliferationsbeeinflussenden Faktoren sowie eine zunehmende Konkurrenz um Lebensfaktoren wie Nährmedium und Raum diskutiert.

In der Zusammenfassung der vorgestellten Versuche läßt sich feststellen, daß humane fetale Lungenfibroblasten auf einen direkten TGF- β -Kontakt mit verstärkter Proliferation reagieren, welche bei einer Dosis von 0,1 ng/ml TGF- β nicht zuverlässig zu beobachten ist, bei einer Dosis von 0,5 ng/ml allerdings deutlich auftritt. Demgegenüber zeigte sich bei Fibroblasten in direkter Nachbarschaft ohne eigenen TGF- β -Kontakt eine noch stärker auftretende Wachstumsstimulation gegenüber den Kontrollkulturen als bei den direkt cytokinexponierten Zellen. Dieser Effekt trat bereits bei der niedrigeren TGF- β -Konzentration auf und zeigte eine Dosisabhängigkeit. Als Erklärung kann vermutet werden, daß TGF- β als profibrotisches Cytokin zum einen selbst einen proliferationsfördernden Einfluß auf Fibroblasten hat und zum anderen in der Lage ist, über induktive Vorgänge Fibroblasten zur Synthese von wachstumsfördernden, parakrin wirkenden Substanzen anzuregen.

In der Literatur existieren eine Vielzahl zum Teil widersprüchlicher Aussagen über die Auswirkungen von TGF- β auf die Proliferation von Fibroblasten. Die Angaben reichen von einer Proliferationsstimulation [(35); (28); (75); (68)] bis zu einer gegenteiligen Hemmung des Wachstums [(18); (9); (69); (26)]. Detaillierte Untersuchungen ergaben, daß die Wirkung von TGF- β auf die Proliferation von Fibroblasten abhängig von einer Vielzahl von Faktoren ist wie Spezies, Organ, Reifegrad, Dichte der Zellkultur, isolierte oder im Zellverband verbliebene Fibroblasten, Konzentration von TGF- β , Zusammensetzung des Nährmediums oder zwischengeschaltete Cytokine. Daher sind pauschalisierende Aussagen ohne genaue Prüfung der bestehenden Bedingungen nicht möglich und

auf den ersten Blick widersprüchliche Resultate relativiert. Im Folgenden sollen einzelne Hypothesen der TGF- β -vermittelten Regulationsmechanismen dargestellt werden.

Zweifellos hemmt TGF- β das Wachstum der meisten von ihm beeinflussten Zellarten, z.B. von Endothelzellen, Epithelzellen und hämatopoetischen Zellen [(35); (47)]. Der postulierte Wirkmechanismus ähnelt dem Zellzyklus-Arrest, wie er durch Radiatio bewirkt wird. TGF- β kann die Expression der Gene p21, p15 und p27 induzieren und dadurch die Aktivität spezifischer Zellzyklus-Kinasen längerfristig hemmen. Als Konsequenz unterbleibt eine Phosphorylierung des Rb-Proteins, welches für die Entlassung der Zelle von der G1- in die S-Phase Voraussetzung ist [(11); (9); (12); (47)]. Verschiedene Autoren vertreten die Ansicht, daß TGF- β aus diesen genannten Gründen eine ebenfalls hemmende Wirkung auf das Proliferationsverhalten von Fibroblasten hat.

Demgegenüber stehen Auffassungen anderer Forschungsgruppen, welche gegenteilige Auswirkungen von TGF- β beschreiben. Untersuchungen ergaben, daß TGF- β als bifunktionales Cytokin befähigt sein kann, den oben geschilderten Mechanismus der p21-vermittelten Proliferationshemmung ins Gegenteil zu verkehren und über eine Inhibition der p21-Expression eine Wachstumsstimulation zu erreichen. Dieses Phänomen wurde Berichten zufolge für verschiedene Fibroblasten-Zellreihen nachgewiesen (menschliche embryonale Lungenfibroblasten der Reihe IMR-90, menschliche Fibroblasten der Reihe WI 38) [(47); (48)]. Finkelstein et al. [(19)] postulierten, daß TGF- β nach Radiatio verstärkt von Makrophagen und Typ-II-Pneumozyten gebildet wird und neben einer synthesessteigernden auch eine proliferationsstimulierende Wirkung auf Fibroblasten hat. Für die Wirkmechanismen, über die TGF- β eine Wachstumsstimulation bei Fibroblasten erreicht, existieren verschiedene Cytokin-Interaktionsmodelle.

Eines dieser Modelle beinhaltet die TGF- β -vermittelte autokrine Synthese von platelet derived growth factor (**PDGF**) durch Fibroblasten. Diese Substanz kann bei Fibroblasten zu einer Wachstumsförderung führen [(6); (28)]. Demgegenüber stehen wiederum die Beobachtungen von Kelley et al., wonach die Addition von Anti-PDGF-Antikörpern die proliferationssteigernden Effekte von zu kultivierten Rattenfibroblasten gegebenem TGF- β nicht beeinflusste [(33)]. Strutz et al. trafen differenziertere Aussagen zu diesem Themenkomplex. Nach Applikation von TGF- β zu humanen Nierenmark-, Nierenrin-

den- und dermalen Fibroblasten und dadurch erfolgter Proliferationsstimulation wurde ein spezifischer Anti-PDGF-Antikörper zu den verschiedenen Zellkulturen gegeben. Im Ergebnis wurden die renalen Fibroblasten in ihrem Wachstum kaum, die dermalen Fibroblasten dagegen deutlich in ihrer Proliferation gehemmt [(68)]. Auch andere Autoren berichten über die Fähigkeit von PDGF, allein oder im Zusammenhang mit anderen Cytokinen zu einer Fibroblastenproliferation in vivo oder in vitro zu führen [(77); (25)]. Ein weiteres Cytokinmodell bezieht den basic fibroblast growth factor (**FGF**) in die TGF- β -vermittelte Zellwachstumsmodulation mit ein. Demnach konnte nach der Zugabe von TGF- β zu humanen Nieren- und Hautfibroblasten ein bis zu dreifacher Anstieg der mRNA-Expression für basic fibroblast growth factor 2 (FGF-2) ermittelt werden. Dieses Cytokin ist wie auch TGF- β bei Prozessen mit vermehrt gebildeter renaler extrazellulärer Matrix wie der tubulointerstitiellen renalen Fibrose anzutreffen und hat ein starkes proliferationsförderndes Potential für Fibroblasten. In den beschriebenen Versuchen ging die Erhöhung der Konzentration an FGF-2 mit einer Verdopplung des Zellwachstums einher. Der Nachweis der Beteiligung von FGF-2 wurde mit einem spezifischen Antikörper erbracht, welcher die erwähnten proliferationsfördernden Effekte vollständig aufhob [(68)]. Auch für menschliche Lungenfibroblasten konnte eine vermehrte Rezeptorexpression für FGF mit einhergehendem verstärktem mitogenem Potential nach TGF- β -Exposition nachgewiesen werden [(70)].

Ein drittes Modell, welches für die TGF- β -vermittelte Proliferationsstimulation von Fibroblasten eine Cytokininteraktion als Erklärung annimmt, ist die selektive Induktion von connective tissue growth factor (**CTGF**) in verschiedenen Fibroblasten-Arten nach Kontakt mit TGF- β [(39); (24)]. CTGF führt wie TGF- β nach subkutaner Injektion im Tiermodell zu ausgeprägter Bildung von extrazellulärer Matrix und hat einen mitogenen Effekt auf Fibroblasten. Manche Autoren schreiben die durch TGF- β induzierte vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix durch Fibroblasten generell diesem Mechanismus der nachgestellten CTGF-Synthese zu, da nach Blockade mit Anti-CTGF-Antikörpern eine Bildung von Substanzen der ECM durch Fibroblasten unterbleibt [(14)]. Nach subkutaner Injektion von TGF- β bei Ratten konnten deutlich erhöhte Konzentrationen von CTGF-mRNA in den dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden [(20)]. Die Regulation der CTGF-Synthese als Antwort auf den Stimulus TGF- β erfolgt über ein Response-Element am CTGF-Genpromotor, wodurch ein verstärktes Ablesen

des CTGF-Gens induziert wird [(41); (1)]. Dieser Regulationsmechanismus existiert nur bei Fibroblasten. Das legt die Vermutung nahe, daß dieser spezifische Mechanismus die sonst multizellulären und vielseitigen Wirkungen von TGF- β im Falle von bindegewebigen Umbauprozessen für Fibroblasten spezifiziert und vereinheitlicht [(24)].

Wie sich daraus erkennen läßt, sind eine Vielzahl von Faktoren an den Wirkungen von TGF- β auf das Proliferationsverhalten von Fibroblasten beteiligt. In verschiedenen Experimenten wurde der Einfluß der Zellkulturdichte untersucht. Bei Pratsinis et al. führt TGF- β in dünn besiedelten Kulturen von humanen fetalen Lungenfibroblasten zu einer Proliferationsstimulation, in konfluierenden Kulturen der gleichen Zellart dagegen zu einer Wachstumshemmung. Im Unterschied dazu zeigten adulte humane Lungefibroblasten unabhängig von der Zelldichte stets einen Proliferationszuwachs als Reaktion auf eine TGF- β -Exposition [(55)]. Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene ergaben, daß in subkonfluenter Form kultivierte Kornea-Fibroblasten eine höhere TGF- β -Rezeptoraktivität und eine vermehrte nukleare Signaltransduktion via Smad-Proteine aufwiesen als konfluente Zellkulturen [(53)]. Daraus läßt sich schließen, daß kultivierte Fibroblasten abhängig von der Zelldichte ein verändertes Reaktionsprofil auf die proliferationsfördernde Wirkung von Cytokinen zeigen. Damit wäre ein Erklärungsansatz für die in den hier vorgestellten Experimenten beobachtete Angleichung der Zellzahlen nach 12 Tagen Kultivierung gegeben.

In der Zusammenschau dieser keinesfalls vollständigen Auflistung der vielfachen Faktoren, welche das Zellwachstum nach Einwirkung von TGF- β beeinflussen, wird deutlich, daß keine pauschalisierenden Aussagen zu proliferationsstimulierenden oder -hemmenden Eigenschaften von TGF- β getroffen werden können.

Unsere Versuche mit humanen fetalen Lungenfibroblasten zeigten unter den geschilderten Bedingungen einen proliferationsfördernden Effekt von TGF- β . Über eine eventuelle Involvierung weiterer, nachgeschalteter Cytokine konnten aufgrund der Versuchsanordnung keine Aussagen getroffen werden. Das ebenfalls aufgetretene Mehrwachstum benachbarter ko-kultivierter Fibroblasten ohne eigenen TGF- β -Kontakt interpretieren wir als Ausdruck einer Cytokin-Autoinduktion (s. 4.3.2). Wir vermuten, daß Fibroblasten nach Exposition zu TGF- β auch nach Wegfall dieses Stimulus dazu angeregt werden, selbst TGF- β mit proliferationsfördernden Eigenschaften zu produzieren.

4.5 Schlußfolgerungen und mögliche Bedeutung für frühzeitige Diagnostik und Therapie der radiogenen Lungenfibrose

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Versuche bestätigen, daß das Wachstum von Lungenfibroblasten nach Bestrahlung reduziert wird. Es zeigte sich jedoch auch, daß ko-kultivierte, nicht selbst bestrahlte Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollgruppen deutlich stärker proliferierten. Beide Effekte waren bereits bei der geringsten verwendeten Dosis von 4 Gy zu beobachten und zeigten eine teilweise statistisch signifikante Dosisabhängigkeit. Als Erklärung kann angenommen werden, daß Fibroblasten nach Radiatio parakrin wirkende Wachstumsfaktoren sezernieren.

Vor dem Hintergrund einer ablaufenden Cytokinkaskade nach Radiatio mit daraus resultierendem anhaltendem Aktivierungszustand sowohl ortsständiger als auch inflammatorischer Zellen und erhöhter Produktion von bindegewebigen Komponenten kommt dem Cytokin TGF- β eine besondere Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit konnte eine proliferationsfördernde Wirkung von TGF- β auf kultivierte humane fetale Lungenfibroblasten nachgewiesen werden. Auch ko-kultivierte Fibroblasten ohne eigenen TGF- β -Kontakt zeigten ein Mehrwachstum im Vergleich zu Kontrollgruppen. Man kann vermuten, daß eine autokrine Produktion von Wachstumsfaktoren nach Induktion durch TGF- β die Ursache dieser Beobachtungen darstellt.

Bei Untersuchungen, die klinische Rolle von TGF- β bei Bestrahlungspatienten zu erfassen, zeigte sich, daß bei einigen Patienten nach kurativer thorakaler Bestrahlung erhöhte TGF- β -Plasmaspiegel vorlagen, bei anderen jedoch nicht. Anscher et al. führten dazu verschiedene klinische Studien durch und zeigten mehrfach, daß erhöhte TGF- β -Werte nach Abschluß der Radiotherapie mit dem Auftreten pulmonaler Affektionen korrelierten. Die normale TGF- β -Konzentration im Plasma gesunder Probanden betrug ≤ 10 ng/ml. Bei allen Patienten mit erhöhten TGF- β -Plasmaspiegeln nach Bestrahlung traten Symptome einer Pneumonitis auf. Die Patienten mit normalen TGF- β -Spiegeln dagegen gaben keine pulmonalen Beschwerden an (bei 8 beobachteten Patienten; [(2)]) Eine erweiterte Studie mit 36 eingeschlossenen Patienten zeigte ähnliche Ergebnisse. Interessanterweise hatten physikalische Parameter wie applizierte Gesamtdosis oder Größe des Bestrahlungsareals sowohl eine parallel durchgeführte Chemotherapie keinen Einfluß auf das Auftreten einer pulmonalen Beeinträchtigung [(2); (3)]. Die genaueste

Erfassung von Patienten mit erhöhtem Risiko einer Lungenschädigung wird für die Verwendung des Quotienten: TGF- β im Serum vor Radiatio / TGF- β nach Radiatio angegeben [(75)]. Sollte sich dies weiterhin bestätigen, wäre es in Zukunft möglich, Patienten mit geringem Risiko für eine Pneumonitis weiteren Therapieformen zuzuführen, bei Patienten mit hohem Risiko jedoch durch Adaptation des Behandlungsplanes eine auftretende Lungenaffektion zu minimieren oder zu verhindern.

Dies wäre ein großer Fortschritt in der Prävention der radiogen induzierten Lungenfibrose, welcher gerade in Anbetracht der begrenzten Therapiemöglichkeiten einer manifesten Fibrose ein wichtiger Stellenwert zukommt. Bisher beschränkt sich der Maßnahmenkatalog bei strahleninduzierten Lungenschäden auf die Applikation von Glukokortikoiden als antiinflammatorische Therapie, evtl. in Kombination mit Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid oder Azathioprin bei weiterer Progredienz [(74); (17)].

Die theoretischen Überlegungen zu möglichen kausalen Therapieansätzen verteilen sich auf verschiedene Angriffspunkte. Zum einen wird versucht, den bei einer Radiatio entstehenden, durch Radikale erzeugten oxidativen Streß durch antioxidativ wirkende Substanzen zu vermindern. Gute Ergebnisse konnten dabei *in vitro* bzw. bei Tierexperimenten mit den Enzymen Superoxid-Dismutase und Katalase sowie mit einer Anhebung des Glutathion-Spiegels erreicht werden [(54); (74)]. Ein weiterer Ansatzpunkt verfolgt das Ziel, die erhöhte Kollagenproduktion von Fibroblasten selektiv, ohne Einfluß auf die sonstige Proteinsynthese zu hemmen. In dieser Hinsicht hat sich Gamma-Interferon als potenter Inhibitor gezeigt und wird in ersten klinischen Studien bei idiopathischer Lungenfibrose getestet [(66)]. Ein dritter Aspekt behandelt die Frage, wie das erhöhte Wachstumspotential matrixbildender Zellen nach Radiatio reduziert werden kann. Die Cytokinkaskade nach Radiatio und die hier vorgestellten Resultate hinsichtlich des proliferationsfördernden Einflusses von TGF- β auf Fibroblasten machen deutlich, daß Cytokinen und Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle zukommt. In unterschiedlichen Modellen wurde gezeigt, daß eine TGF- β -Hemmung über spezifische Antikörper, lösliche TGF- β -II-Rezeptoren oder endogene Regulatorproteine die experimentell erzeugte Gewebsfibrose in Lungen, Nieren und Haut verhindern kann [(23); (47)]. Decorin, ein ubiquitär vorkommendes Proteoglykan, bindet beispielsweise TGF- β -Isoformen und kann deren Aktivität unterdrücken. In entsprechenden Versuchen konnte eine erfolgreiche Stimulation lokaler pulmonaler Decorin-Produktion nach Gentransfer bei

Bleomycin-induzierter Lungenfibrose im Tiermodell gezeigt werden. Bei diesen Tieren wurde eine signifikant verminderte Kollagenproduktion und damit ein geringerer Fibrosegrad beobachtet [(38)].

Ein systemischer Einsatz solcher Substanzen beim Menschen liegt zwar noch in der Zukunft, basiert aber auf einer soliden pathophysiologischen Grundlage und kann als vielversprechende Option angesehen werden.

5 Zusammenfassung

Die nach Radiatio auftretende Lungenschädigung im Sinne einer Pneumonitis bzw. Fibrose stellt nach wie vor ein Problem bei der Strahlentherapie thorakaler Malignome dar. Da konservative Therapieformen oft ungenügende Ergebnisse bringen, besteht an der Aufklärung der ursächlichen Mechanismen der Strahlenfibrose großes Interesse, um kausale Therapien oder präventive Maßnahmen zu entwickeln.

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, quantitative Aussagen über das Proliferationsverhalten menschlicher Lungenfibroblasten nach Bestrahlung zu treffen, da diese matrixbildenden Zellen einen wichtiger Anteil an den fibrotischen Umbauprozessen haben. Um die Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Fibroblasten untersuchen zu können, wurde ein Ko-Kultur-Modell verwendet, welches freien Stoffaustausch zwischen den Fibroblasten ermöglichte, einen direkten Zellkontakt aber verhinderte. Die Ergebnisse zeigten, daß humane fetale Lungenfibroblasten als direkte Reaktion auf die Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen dosisabhängig dezimiert wurden. Im Gegensatz dazu reagierten die in Nachbarschaft zu den bestrahlten Fibroblasten ko-kultivierten Zellen mit einer signifikanten Zunahme ihres Zellwachstums.

Es kann daraus geschlossen werden, daß Fibroblasten nach Radiatio parakrin wirkungsvolle und für benachbarte Zellen wachstumsfördernde Substanzen produzieren. Die vorliegenden Versuche zeigten, daß humane fetale Lungenfibroblasten nach Zugabe von exogenem TGF- β verstärkt proliferierten. Bei ko-kultivierten, nicht selbst TGF- β -exponierten Zellen konnte ebenfalls ein Mehrwachstum über die Dauer bis zu 12 Tagen beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, daß nach kurzem Kontakt mit TGF- β die autokrine und damit von äußeren Stimuli unabhängige Produktion von Wachstumsfaktoren durch Fibroblasten erfolgen kann. Ob es sich dabei um TGF- β selbst oder nachgeschaltete, synergistisch wirkende Substanzen handelte, konnte mit der angewendeten Versuchsordnung nicht geklärt werden und bleibt nachfolgenden Untersuchungen vorbehalten.

Die Resultate der hier vorgestellten Arbeit unterstützen die Hypothesen anderer Untersucher, nach denen Lungenfibroblasten einen aktiven Anteil an den fibroproliferativen Umbauprozessen nach Einwirkung ionisierender Strahlen einnehmen [(63); (47)]. Di-

rekt von der Radiatio betroffene Fibroblasten können über cytokinvermittelte Interaktionen mit benachbarten Zellen diese in einen erhöhten Aktivierungszustand mit verstärkter Proliferation und Produktion von Interzellulärsubstanzen versetzen [(19); (62)]. Die Ursache für die ausbleibende Terminierung der profibrotischen Aktivitäten nach Wegfall des traumatischen Agens und damit die Verhältnisse „einer Wunde, die nicht heilt“ (Martin) sind noch nicht geklärt. Die Lösung dieses Problems könnte zu kausalen Präventions- und Therapiemaßnahmen führen, welche die Inzidenz und Ausprägung von Lungenschädigungen als Folge thorakaler Bestrahlung vermindern und die Radiotherapie von malignen Tumoren intensivieren helfen könnte.

Literatur

- (1) Abraham, D.J.; Shiwen, X.; Black, C.M. u.a.: Tumor Necrosis Factor alpha suppresses the induction of Connective Tissue Growth Factor by Transforming Growth Factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, S. 15220-15225.
- (2) Anscher, Mitchell S.; Murase, Tadashi; Prescott, Deborah M. u.a.: Changes in plasma TGF- β levels during pulmonary radiotherapy as a predictor of the risk of developing radiation pneumonitis, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 1994, Vol. 30, Nr. 3, S. 671-676.
- (3) Anscher, Mitchell S.; Kong, Feng-Ming; Jirtle, Randy L.: The relevance of Transforming Growth Factor- β 1 in pulmonary injury after radiation therapy, *Lung Cancer* 1998, 19, S. 109-120.
- (4) Barcellos-Hoff, M.H.; Derynck, R.; Tsang, M.L. u.a.: Transforming Growth Factor-beta activation in irradiated murine mammary gland, *J. Clin. Invest.* 1994, 93, S. 892-899.
- (5) Barcellos-Hoff, Mary Helen: How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues, *Radiation Research* 1998, 150 (Suppl.), S. 109-120.
- (6) Battegay, E.J.; Raines, E.W.; Seifert, R.A. u.a.: TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop, *Cell* 1990, 2, 63, S. 515-524.
- (7) Bayreuther, K.; Rodemann, H.P.; Francz, P.I. u.a.: Differentiation of fibroblast stem cells, *J. Cell. Sci.* 1988, Suppl., 10, S. 115-130.
- (8) Bumann, J.; Santo-Holtje, L.; Loffler, H. u.a.: Radiation-induced alterations of the proliferation dynamics of human skin fibroblasts after repeated irradiation in the subtherapeutic dose range, *Strahlentherapie und Onkologie* 1995, Vol. 171, S. 35-41.
- (9) Burger, A.; Loffler, H.; Bamberg, M. u.a.: Molecular and cellular basis of radiation fibrosis, *Int. J. Radiation Biology* 1998, Vol. 73 Nr. 4, S. 401-408.
- (10) Chang-Liu, Chin-Mei; Woloschak, Gayle E.: Effects of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression, *Cancer Letters* 1997, 113, S. 77-86.
- (11) Datto, Michael B.; Li, Yan; Panus, Joanne F. u.a.: Transforming Growth Factor β induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, Vol. 92, S. 5545-5549.
- (12) De Visser, K.E.; Kast, W.M.: Effects of TGF- β on the immune system: Implications for cancer immunotherapy, *Leukemia* 1999, Vol. 13, S. 1188-1199.
- (13) Dimitrijevic-Bussod, Mira; Balzaretto-Maggi, Viviana S.; Gadbois, Donna M.: Extracellular matrix and radiation G1 cell cycle arrest in human fibroblasts, *Cancer Research* 1999, 59, S. 4843-4874.

- (14) Duncan, M.R.; Frazier, K.S.; Abramson, S. u.a.: Connective Tissue Growth Factor mediates Transforming Growth Factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP, *The FASEB Journal* 1999, 13, S. 1774-1786.
- (15) Ehrhart, E.J.; Segarini, Patricia; Tsang, Monica L.-S. u.a.: Latent Transforming Growth Factor Beta-1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose gamma-irradiation, *The FASEB Journal* 1997, 11, S. 991-1002.
- (16) Eickelberg, Oliver; Köhler, Eleonore; Reichenberger, Frank u.a.: Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- β 1 and TGF- β 3, *American Physiological Society* 1999, S. L814-L824.
- (17) Eschenbach, Ch.M.: Interstitielle Lungenerkrankungen, in: Fabel (Hrsg.): *Fabel-Pneumologie*. Urban & Schwarzenberg 2. Auflage. 1995, S. 485-486.
- (18) Fine, Alan; Goldstein, Ronald H.: The effect of Transforming Growth Factor- β on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts, *The Journal of Biological Chemistry* 1987, Vol. 262, Nr. 8, S. 3897-3902.
- (19) Finkelstein, J.N.; Johnston, C.J.; Baggs, R. u.a.: Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis, *Int. J. Radiation Oncology Biology Physics* 1994, Vol. 28 Nr. 3, S. 621-631.
- (20) Frazier, Ken; Williams, Shawn; Kothapalli, Devashish u.a.: Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production and granulation tissue formation by Connective Tissue Growth Factor, *Journal of Investigative Dermatology* 1996, 107, S. 404-411.
- (21) Gadbois, Donna M.; Crissman, Harry A.; Nastasi, Anthony u.a.: Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays, *Radiation Research* 1996, 146, S. 414-424.
- (22) Gauldie, Jack; Jordana, Manel; Cox, Gerard: Cytokines and pulmonary fibrosis, *Thorax* 1993; 48, S. 931-935.
- (23) Giri, Shri N.; Hyde, Dallas M.; Hollinger, Manfred A.: Effect of antibody to Transforming Growth Factor- β on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice, *Thorax* 1993, Vol. 48, S. 959-966.
- (24) Grotendorst, G.R.: Connective Tissue Growth Factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts, *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997, 8, S. 171-179.
- (25) Haichao, Li; Bing, He; Chengli, Que u.a.: Expression of TGF- β , PDGF and IGF-1 mRNA in lung of Bleomycin-A₅-induced pulmonary fibrosis in rats, *Chinese Medical Journal* 1996, 109, S. 533-536.
- (26) Hakenjos, L.; Bamberg, M.; Rodemann, H.P.: TGF-beta 1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype, *International Journal of Radiation Biology* 2000, Vol. 76 Nr. 4, S. 503-509.
- (27) Hashimoto, Shu; Yasuhiro, Gon; Takeshita, Ikuko u.a.: Transforming Growth Factor- β 1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH₂-terminal kinase-dependent pathway, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001, Vol. 163, S. 152-157.

- (28) Herskind, Carsten; Bamberg, Michael; Rodemann, Hans Peter: The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy, *Strahlentherapie und Onkologie* 1998, 174: Suppl. III, S. 12-15.
- (29) Herskind, C.; Bentzen, S.M.; Overgaard, J. u.a.: Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy, *Radiother. Oncol.* 1998, 47(3), S. 263-269.
- (30) Herskind, C.; Rodemann, H.P.: Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts, *Experiment. Gerontol.* 2000, 35 (6-7), S. 747-755.
- (31) Hill, R.P.; Rodemann, H.P.; Hendry, J.H.: Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic, *Int. J Radiation Oncology Biol. Phys.* 2001, Vol. 49 Nr. 2, S. 353-365.
- (32) Horwitz, David A.; Gray, J. Dixon; Ohtsuka, Kazuo: Role of NK cells and TGF- β in the regulation of T-cell-dependent antibody production in health and autoimmune disease, *Microbes and Infection* 1999, S. 1305-1311.
- (33) Kelley, Jason; Fabisiak, James P.; Hawes, Karen u.a.: Cytokine signaling in lung: Transforming Growth Factor- β secretion by lung fibroblasts, *American Journal of Physiology* 1991, 260, S. L123-L128.
- (34) Kelley, Jason; Shull, Susan; Walsh, James J. u.a.: Auto-Induction of Transforming Growth Factor-beta in human lung fibroblasts, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1993, Vol. 8, S. 417-424.
- (35) Kelley, Jason: Transforming Growth Factor- β , in: Kelley, Jason (Hrsg.): *Cytokines of the Lung*. New York 1993, S. 101-137.
- (36) Kim, Seong-Jin; Angel, Peter; Lafyatis, Robert u.a.: Autoinduction of Transforming Growth Factor-beta 1 is mediated by the AP-1 complex, *Molecular and Cellular Biology* 1990, S. 1492-1497.
- (37) Köberlein, Eva: Bestrahlung von Lungenfibroblasten in vitro induziert TGF- β und Synthese von extrazellulärer Matrix. Würzburg 2002 (Diss. med. Julius-Maximilians-Universität Würzburg).
- (38) Kolb, Martin; Margetts, Peter J.; Galt, Tom u.a.: Transient transgene expression of Decorin in the lung reduces the fibrotic response to Bleomycin, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001, Vol. 163, S. 770-777.
- (39) Kothapalli, D.; Frazier, K.S.; Welply, A. u.a.: Transforming Growth Factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a Connective Tissue Growth Factor-dependent signaling pathway, *Cell. Growth. Differ.* 1997, 8, S. 61-68.
- (40) Lara, P.C.; Russell, N.S.; Smolders, I.J.H. u.a.: Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production, *Int. J. Radiation Biology* 1996, Vol. 70 Nr. 6, S. 683-692.
- (41) Lasky, Joseph A.; Ortiz, Luis A.; Tonthat, Boihoang u.a.: Connective Tissue Growth Factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis, *American Journal of Physiology* 1998, 275, S. L365-L371.

- (42) Lawrence, David A.; Pircher, R.; Kryceve-Martinerie, C. u.a.: Normal embryo fibroblasts release Transforming Growth Factor-beta in a latent form, *J. Cell. Physiol.* 1984, 121, S. 184-188.
- (43) Lawrence, David A.: Transforming Growth Factor- β : A general review, *European Cytokine Network* 1996, Vol. 7 Nr. 3, S. 363-374.
- (44) Letterio, John J.; Roberts, Anita B.: Molecule of the month. TGF- β : A critical modulator of immune cell function, *Clinical Immunology and Immunopathology* 1997, Vol. 84 Nr. 3, S. 244-250.
- (45) Letterio, John J.; Böttinger, Erwin P.: TGF- β knockout and dominant-negative receptor transgenic mice, *Mineral and Electrolyte Metabolism* 1998, 24, S. 161-167.
- (46) Magnan, Antoine; Frachon, Irène; Rain, Bernadette u.a.: Transforming Growth Factor-beta in normal human lung: preferential location in bronchial epithelial cells, *Thorax* 1994, 49, S. 789-792.
- (47) Martin, Michèle; Lefaix, Jean-Louis; Delanian, Sylvie: TGF- β 1 and radiation fibrosis: A master switch and a specific therapeutic target?, *Int. J. Radiation Oncology Biology Physics* 2000, Vol. 47 Nr. 2, S. 277-290.
- (48) Miyazaki, M.; Ohashi, R.; Tsuji, T. u.a.: Transforming Growth Factor-beta 1 stimulates or inhibits cell growth via down- or up-regulation of p 21/Waf 1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 246, S. 873-880.
- (49) Movsas, Benjamin; Raffin, Thomas A.; Epstein, Alan H. u.a.: Pulmonary radiation injury, *Chest* 1997, 111, S. 1061-1076.
- (50) Munger, John S.; Harpel, John G.; Gleizes, Pierre-Emmanuel u.a.: Latent Transforming Growth-Factor-beta: Structural features and mechanisms of activation, *Kidney International* 1997, Vol. 51, S. 1376-1382.
- (51) Murrell, George A.; Francis, Martin J.O.; Bromley, Linda: Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals, *Biochem. J.* 1990, Vol. 265, S. 659-665.
- (52) Paul Marienfeld GmbH & Co. KG: Info Zählkammer. URL: http://www.superior.de/infodat/inf4_zkd.htm (10.07.2001).
- (53) Petridou, Sevastiani; Maltseva, Olga; Spanakis, Spiro u.a.: TGF- β receptor expression and Smad 2 localization are cell density dependent in fibroblasts, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000, Vol. 41, Nr. 1, S. 89-95.
- (54) Pickrell, John A.; Abdel-Mageed, Asim B.: Radiation-induced pulmonary fibrosis, in: Phan, S.H. (Hrsg.): *Pulmonary Fibrosis* Vol. 80. Marcel Dekker Verlag 1995, S. 363-377.
- (55) Pratsinis, Harris; Kletsas, Dimitris, Stathakos, Dimitri: Autocrine growth regulation in fetal and adult human fibroblasts, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, 237, S. 348-353.
- (56) Prud'homme, Gérald J.; Piccirillo, Ciriaco A.: The inhibitory effects of Transforming Growth Factor-Beta-1 (TGF- β 1) in autoimmune disease, *Journal of Autoimmunity* 2000, 14, S. 23-42.
- (57) Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*. 257. Auflage. Berlin, New York 1994, S. 1709.

- (58) Rodemann, H.P.; Peterson, H.P.; Schwenke, K. u.a.: Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation, *Scanning Microsc.* 1991, 5 (4), S. 1135-1142.
- (59) Rodemann, Hans Peter: Radiation-Induced Fibrosis: Experimental Studies, in: Dunst, E.J. and Sauer, R. (Hrsg.): *Late Sequela in Oncology*. New York 1995, S. 93-97.
- (60) Rodemann, Hans Peter; Binder, Anke; Burger, Anke u.a.: The underlying cellular mechanism of fibrosis, *Kidney International* 1996, Vol. 49, Suppl. 54, S. 32-36.
- (61) Rubin, Philip; Finkelstein, Jacob; Shapiro, Donald: Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: Interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast, *Int. J. Radiation Oncology Biology Physics* 1992, Vol. 24, S. 93-101.
- (62) Rubin, Philip; Johnston, Carl J.; Williams, Jaqueline P. u.a.: A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis, *Int. J. Radiation Oncology Biology Physics* 1995, Vol. 33 Nr. 1, S. 99-109.
- (63) Rube, Claudia E.; Uthe, Daniela; Schmid, Kurt W. u.a.: Dose-dependent induction of Transforming Growth Factor β (TGF- β) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation, *Int. J. Radiation Oncology Biology Physics* 2000, Vol. 47 Nr. 4, S. 1033-1042.
- (64) Sauer, Rolf: *Strahlentherapie und Onkologie für MTA-R*. 3. Aufl. München, Wien, Baltimore 1998.
- (65) Schraube, P.; Schell, R.; Wannemacher, M. u.a.: Pneumonitis nach Strahlentherapie des Bronchialkarzinoms - Inzidenz und Einflußfaktoren, *Strahlenther. Onkol.* 1997, 173 (7), S. 369-378.
- (66) Sime, Patricia J.; O'Reilly, Katherine M.A.: Fibrosis of the lung and other tissues: New concepts in pathogenesis and treatment, *Clinical Immunology* 2001, Vol. 99, Nr. 3, S. 308-319.
- (67) Sporn, Michael: The importance of context in cytokine action, *Kidney International* 1997, Vol. 51, S. 1352-1354.
- (68) Strutz, Frank; Zeisberg, Michael; Renziehausen, Anja u.a.: TGF- β 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2), *Kidney International* 2001, Vol. 59, S. 579-592.
- (69) Sundarshan, C.; Yaswen, L.; Kulkarni, A. u.a.: Phenotypic consequences of Transforming Growth Factor Beta-1 gene ablation in murine embryonic fibroblasts: autocrine control of cell proliferation and extracellular matrix biosynthesis, *J. Cell. Physiol.* 1998, 176, S. 67-75.
- (70) Thannickal, Victor J.; Aldweib, Kristen D.L.; Rajan, Thomas u.a.: Upregulated expression of Fibroblast Growth Factor (FGF) receptors by Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 251, S. 437-441.

- (71) Torry, D.J.; Richards, C.D.; Podor, T.J. u.a.: Anchorage-independent colony growth of pulmonary fibroblasts derived from fibrotic human lung tissue, *Journal of clinical investigation* 1994, Vol. 93, S. 1525-1532.
- (72) Vaillant, P.; Menard, O.; Vignaud, J.M. u.a.: The role of cytokines in human lung fibrosis, *Monaldi Arch Chest Dis.* 1996, 51, S. 145-152.
- (73) Vodovotz, Yoram; Bogdan, Christian; Paik, John u.a.: Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by Transforming Growth Factor β , *J. Exp. Med.* 1993, Vol. 178, S. 605-613.
- (74) Vogelmeier, C.; Behr, J.: Lungengerüsterkrankungen, in: Paumgartner (Hrsg.): *Therapie innerer Krankheiten.* Springer-Verlag 9. Auflage. Berlin u.a. 1999, S. 342-357.
- (75) Vujaskovic, Z.; Marks, L.B.; Anscher, M.S.: The physical parameters and molecular events associated with radiation-induced lung toxicity, *Seminars in Radiation Oncology* 2000, Vol. 10 Nr. 4, S. 296-307.
- (76) Yamada, M.; Kudoh, S.; Hirata, K. u.a.: Risk factors of pneumonitis following chemoradiotherapie for lung cancer, *Eur. J. Cancer* 1998, Vol. 34 Nr. 1, S. 71-75.
- (77) Yi, Eunhee S.; Lee, Hyesun; Yin, Songmei u.a.: Platelet-Derived Growth Factor causes pulmonary cell proliferation and collagen deposition in vivo, *American Journal of Pathology* 1996, Vol. 149, Nr. 2, S. 539-548.

Danksagung

Bei der Entstehung dieser Arbeit haben mich viele Menschen unterstützt. Ihnen ist diese Danksagung gewidmet. Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Michael Schmidt, Leiter des Schwerpunkts Pneumologie der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg, für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. med. G. Ertl, Direktor der Medizinischen Klinik, möchte ich für die Möglichkeit danken, an seiner Klinik die Arbeit anfertigen zu können. Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Martin Kolb sowie Herrn Dr. med. Jochen Willner für die ständige und intensive Betreuung bei allen die Arbeit betreffenden Fragen bedanken. Gleiches gilt für Frau Margret Wechner, der mein Dank für die Hilfe bei der Durchführung des praktischen Teils der Arbeit gebührt.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere bei meiner Mutter, Frau Dr. med. Eva-Maria Hoffmann, für die uneingeschränkte persönliche und finanzielle Unterstützung während der Entstehungszeit dieser Arbeit bedanken. Besonderer Dank gilt Herrn Jörg Siegmund, der mir stets zur Seite stand, mich in technischen Belangen jederzeit unterstützte und dadurch zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen hat.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Hoffmann
Vornamen: Ulrike Renate
Geburtsdatum: 6. August 1975
Geburtsort: Gotha
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. med. Andreas Hoffmann
Dr. med. Eva-Maria Hoffmann

Schulischer Werdegang

1982 - 1990 Besuch der Polytechnischen Oberschule „Theodor Neubauer“,
Erfurt
1990 - 1994 Königin-Luise-Gymnasium, Erfurt
Juni 1994 Reifeprüfung (Notendurchschnitt 1,2)

Studium

Okt. 1994 - März 2000 Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
Sept. 1996 Ärztliche Vorprüfung („Physikum“)
März 1998 1. Teil der Ärztlichen Prüfung
März 2000 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
Apr. 2000 - Nov. 2000 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
München, Praktisches Jahr
Dez. 2000 - März 2001 Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg, Fortsetzung des Praktischen Jahres
Mai 2001 3. Teil der Ärztlichen Prüfung, damit Abschluß des Studiums
(Gesamtnote: 1,66)

Beruflicher Werdegang

seit Nov. 2001 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum im Krankenhaus München Bogenhausen, Akademisches Lehrkrankenhaus der Technischen Universität München, IV. Medizinische Abteilung (Abteilung für Innere Medizin, Schwerpunkt Rheumatologie)

München, 11. Januar 2003

U. Hoffmann