

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik II
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

**Untersuchungen zur oxidativen
Lungenbelastung unter
Radio-Chemotherapie bei Patienten mit
fortgeschrittenem Bronchialkarzinom**

Zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Thomas Beinert
geboren am 29.9.1955 in München

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: Prof. Drings, Heidelberg

Datum der Promotion: 2.6.2000

Zusammenfassung:

Reaktive Sauerstoffspezies sind die entscheidenden Faktoren der pulmonalen Toxizität unter Radio-Chemotherapie. Sie induzieren eine akute pulmonale entzündliche Reaktion, unter der es zur Ausschüttung einer sich selbst verstärkenden Zytokinkaskade im Sinne eines multifaktoriellen Zytokinnetzwerkes und in der Folge unter einer persistierenden Zytokinkaskade zur Generierung von sekundären reaktiven Sauerstoffspezies kommt.

Die Aktivierung dieser Zytokinkaskade ist noch Monate nach Chemotherapie oder Strahlentherapie auch bei Patienten, die klinisch keine Symptome der Lungenschädigung zeigen, nachweisbar. Dieser Prozeß kann, ähnlich wie bei der fibrosierenden Alveolitis, mit einer Fibrosierung des Lungengewebes und mit Ablagerung von extrazellulärer Matrix einhergehen.

Die vorliegende Arbeit hat durch die systematische Analyse an 261 Lavagen von 199 Bronchialkarzinom-Patienten vor, unter und nach zytoreduktiver Therapie die Determinanten des oxidativen pulmonalen Stress untersucht.

Als Meßparameter des akuten oxidativen Stress ist die Gesamtzellzahl in der BALF, der Methioninsulfoxidgehalt sowie die Konzentration von Glutathion, IL-1, IL-6 und IL-8, TNF-alpha, weiterhin die VEGF-Konzentration in der ELF geeignet. Erstmals gezeigt werden konnte hierbei, daß VEGF nicht nur im Rahmen der Neoangiogenese, sondern auch durch reaktive Sauerstoffspezies hochreguliert wird und oxidativen Stress sensitiv anzeigt.

Bei manifester Lungenfibrosierung könnte P-III-P ein sensibler Marker der Fibroblasten-aktivierung und der Produktion extrazellulärer Matrix sein. Die Untersuchungen ergaben zwischen den Folgen der Strahlentherapie und Chemotherapie lediglich quantitative, keine qualitativen Unterschiede.

Die vorliegende Arbeit möchte die Grundlage schaffen, dosisintensivierte multimodale Therapien bezüglich der oxidativen pulmonalen Belastungen bei Patienten mit Bronchialkarzinom invasiv zu monitoren. Dies könnte eine individuelle Dosisoptimierung durch die Bestimmung der oxidativen pulmonalen Kapazität, insbesondere der Glutathionkonzentration in der ELF, schaffen.

Schlagworte: Lunge, Krebs, Chemotherapie, Radiotherapie, oxidativer Stress

Abstract:

Induction of reactive oxygen is the main pathway of acute pulmonary injury during radio-chemotherapy. This release of cytokines during inflammation leads to a self-perpetuating cytokine cascade as a cytokine network, resulting in the generation of secondary oxidative stress.

This cytokine activation is detectable during therapy as well as months after therapy, even if the patient is clinically asymptomatic. This activated cytokine network can be accompanied by the deposition of extracellular matrix (similar as in lung fibrosis).

In our study, we analysed 261 bronchoalveolar lavages (BAL) from 199 patients with lung carcinoma under, before and after chemotherapy and / or radiotherapy.

The following BAL parameters indicating oxidative stress were found: total cell count, concentration of methionine sulfoxide, glutathione, IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha and VEGF. It was shown for the first time that VEGF is also upregulated by oxidative stress. If lung fibrosis is manifest, P-III-P could be a marker of activation of fibroblasts and of the production of extracellular matrix. In general, differences found in measured parameters during chemotherapy or radiotherapy were of quantitative, not of qualitative nature.

Our study wants to lay the groundwork in monitoring pulmonary stress invasively in lung cancer patients. This could lead to better individual dose application by defining the antioxidative capacity, especially the glutathione concentration in the BAL.

keywords: lung, cancer, chemotherapy, radiotherapy, oxidative stress

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1 Epidemiologie des Bronchialkarzinoms	10
1.2. Therapie des Bronchialkarzinoms	11
1.3. Pulmonale Nebenwirkungen der zytoreduktiven Therapie	13
1.4. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	14
1.4.1. Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies	15
1.5. Die Lunge als Zielorgan oxidativer Schäden	16
1.6. Bisherige Untersuchungen an der BALF von Patienten mit soliden Tumoren	16
2. Hintergrund	18
2.1. Anatomische Vorbemerkungen	18
2.1.1. Die Lungenperipherie	18
2.1.2. Das Lungeninterstitium	18
2.1.3. Der interstitielle Raum	18
2.1.4. Die Basalmembran	18
2.2. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	19
2.2.1. Zelluläre Bestandteile der BAL	19
2.2.1.1. Monozyten/Alveolarmakrophagen	19
2.2.1.2. Neutrophile Granulozyten	20
2.2.1.3. Eosinophile Granulozyten	20
2.2.1.4. Lymphozyten	21
2.2.2. Nicht zelluläre Bestandteile der BAL	21
2.2.2.1. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha)	21
2.2.2.2. Interleukin 6 (IL-6)	21
2.2.2.3. Wachstumsfaktoren	22
2.2.2.3.1. Transforming Growth Factor (TGF-beta)	22
2.2.2.3.2. Plateled-derived growth factor (PDGF)	22
2.2.2.3.3. Vascular epithel growth factor (VEGF)	22
2.3. Fibroblasten	23

2.3.1.	Fibroblastenaktivierung	24
2.3.2.	Kollagenbildung als Folge der Fibroblastenaktivierung	24
2.4.	Das intrapulmonale System der antioxidativen Abwehr	25
2.4.1.	Antioxidative Enzymsysteme	25
2.4.2.	Nicht-enzymatische Antioxidantien	25
2.4.3.	Das pulmonale Glutathionsystem	26
2.4.4.	Methioninsulfoxid als Indikator intrapulmonaler ROS-Belastung	26
2.5.	Hitzeschockproteine (HSP)	26
2.6.	Reaktive Sauerstoffspezies unter zytoreduktiver Therapie	27
2.6.1.	Chemotherapie	27
2.6.1.1.	Bleomycin	28
2.6.1.2.	Cyclophosphamid und Ifosfamid	29
2.6.1.3.	Anthrazykline	29
2.6.2.	Wirkmechanismen ROS-vermittelter Lungenschädigungen unter Chemotherapie	30
2.6.3.	Strahlentherapie	31
2.6.3.1.	Wirkmechanismus	31
2.6.3.2.	Pulmonale Toxizität	32
2.6.4.	Klinische Bilder pulmonaler Toxizität unter zytoreduktiver Therapie	33
2.6.4.1.	Pneumonitis	33
2.6.4.2.	Lungenfibrose	33
	3. Fragestellung	34
	4. Material und Methoden	37
4.1.	Patientenkollektiv	37
4.1.1.	Einteilung in die Therapiegruppen	37
4.1.2.	Tumorhistologie	40
4.1.3.	Aufteilung der Lavage-Proben auf die Patientengruppen	40
4.1.4.	Remissionskriterien	41
4.2.	Bronchoalveolären Lavage (BAL)	42
4.2.1.	Prinzip der BAL	42

4.2.2.	Durchführung der BAL	42
4.2.3.	Aufbereitung der Proben	43
4.2.4.	Zytologische Untersuchungen	43
4.2.4.1.	Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate	43
4.2.4.1.1.	Zytologische Färbungen	43
4.2.4.2.	Vitalitätsnachweis der Zellen	44
4.2.4.3.	Immunophänotypisierung der BALF-Lymphozyten	44
4.2.4.3.1.	Vorbereitung des Zell-Pallets zur FACS-Analyse	45
4.2.4.3.2.	Aufbereitung von peripherem Blut für die FACS-Analyse	45
4.2.4.4.	FACS-Analyse der intrazellulären Hitzeschockproteine	45
4.2.4.5.	Zytokin-Nachweis mittels ELISA	46
4.2.5.	Biochemische Untersuchungen der BALF	47
4.2.5.1.	Bestimmung des Volumens der ELF	47
4.2.5.1.1.	Prinzip der Harnstoffbestimmung	47
4.2.5.1.2.	Testansatz	48
4.2.5.2.	Gesamteiweiß	49
4.2.5.3.	Albumin	49
4.2.5.4.	Nachweis von Laminin in der BALF	50
4.2.5.5.	N-terminales Prokollagen-III-Peptid (N-P-III-P)	50
4.2.6.	Neoangiogene Faktoren und Wachstumsfaktoren	51
4.2.7.	Methioninsulfoxid	51
4.2.8.	Gesamtglutathion	52
4.2.8.1.	Glutathiondisulfid / reduziertes Glutathion	53
4.2.8.1.1.	HPLC (high performance liquid chromatography)	53
4.3.	Statistik	53
5.	Ergebnisse	55
5.1.	Einteilung der Proben	55
5.2.	Anthropometrische Daten	56
5.2.1.	Altersverteilung	56
5.2.2.	Geschlechtsverteilung und Tumorphistologie in den Patientengruppen	57

5.2.3.	Chronische Bronchitis und Nikotinabusus	58
5.3.	Zytologische Parameter der BALF	60
5.3.1.	Vitalitätsprüfung der Zellen in der BALF	60
5.3.2.	Gesamtzellzahl in der BALF	60
5.3.3.	Durchflußzytometrische Zelldifferenzierung	63
5.3.3.1.	Alveolarmakrophagen	64
5.3.3.2.	Lymphozyten	64
5.3.3.3.	Neutrophile Granulozyten	66
5.3.3.4.	Eosinophile Granulozyten	67
5.3.3.5.	Immunphänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen	67
5.3.3.5.1.	T-Helfer- und T-Suppressor.-Lymphozyten	67
5.3.3.5.2.	Verhältnis von T-Helfer- und T-Supressorlymphozyten	69
5.4.	Ergebnisse der biochemischen BALF-Untersuchungen	69
5.4.1.	Quantifizierung der epithelialen Flüssigkeit (ELF)	69
5.4.2.	Gesamtprotein und Albumin	71
5.4.3.	Nachweis spezifischer Bindegewebsproteine	73
5.4.3.1.	Prokollagen-III-Peptid (P-III-P)	74
5.4.3.2.	Laminin-P1-Konzentrationen	74
5.5.	Wachstumsfaktoren	76
5.5.1.	Plateled derived growth factor (PDGF)	76
5.5.2.	Basic fibroblast growth factor (bFGF)	77
5.5.3.	Epidermal growth factor (EGF)	78
5.5.4.	Transforming growth factor beta (TGF-beta)	79
5.5.5.	Vascular epithel growth factor (VEGF)	80
5.6.	Zytokine	81
5.6.1.	Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF-alpha)	81
5.6.2.	Interleukin 1 (IL-1).	82
5.6.3.	Interleukin 2 (IL-2)	83
5.6.4.	Interleukin 6 (IL-6)	84
5.6.5.	Interleukin 8 (IL-8)	85

5.7.	Parameter des Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewichts	86
5.7.1.	Methioninsulfoxidgehalt alveolärer Proteine als Indikator der pulmonalen oxidativen Belastung	86
5.7.2.	Glutathion	86
5.8.	Hitzeschockproteine (HSP)	88
5.9.	Korrelationen zwischen den einzelnen Untersuchungsparametern	91
6. Diskussion		93
6.1.	Zelluläre Bestandteile der BALF	93
6.2.	Zytokine und Wachstumsfaktoren	94
6.3.	Bindegewebsproteine	100
6.4.	Hitzeschockproteine	100
6.5.	Glutathionsystem und Methioninsulfoxidgehalt der alveolären Proteine	101
6.6.	Patientenkollektiv	105
7. ROS-assoziierte pulmonale Krankheitsbilder		107
8. Therapieansätze zur Modulation des pulmonalen oxidativen Stress bei Lungenerkrankungen		109
9. Zusammenfassung		111
10. Verzeichnis der Abkürzungen		113
11. Literaturverzeichnis		114
12. Danksagung		163
13. Eidesstattliche Erklärung		164

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Bronchialkarzinoms

In Europa erleidet jeder Dritte im Laufe seines Lebens einen malignen Tumor, und fast jeder dritte tumorassoziierte Todesfall wird durch ein Bronchialkarzinom (BC) verursacht (Negri et al., 1994). Das BC ist mit einer Inzidenz von 22 pro 100.000 Einwohner der häufigste maligne Tumor des Mannes (Charloux et al., 1997; Armitage et al., 1997; Mannino et al., 1998; Gadgeel et al., 1999), zwischenzeitlich bereits der vierthäufigste maligne Tumor der Frau (Ernster, 1994; Ernster, 1996; Ouellette et al., 1998). Als einer der wenigen malignen Tumoren nahm seine Inzidenz in den Ländern des westlichen Kulturkreises bis vor kurzem weiter zu (Negri et al., 1994; Devesa et al., 1994; Mannino et al., 1998) und zeigt erst aktuell eine gering fallende Tendenz (Wingo et al., 1999). Diese Zahlen ordnen dem Bronchialkarzinom nicht nur in der Reihe der malignen Erkrankungen, sondern auch in der allgemeinen Todesursachenstatistik einen vorrangigen Platz zu (Statistisches Bundesamt, 1997).

In der Genese des Bronchialkarzinoms ist der Nikotinabusus Risikofaktor Nr. 1 (Becker, 1994; Holford et al., 1998; Reif et al., 1999), wobei nach neueren Studienergebnissen auch das Rauchen von Pfeife oder Zigarren ein dem Zigarettenrauchen ähnliches Risikoprofil zeigt (Boffetta et al., 1999). Das relative Risiko, an einem BC zu erkranken, erhöht sich mit dem kumulativen Nikotin-Index, nach 20 Jahren Nikotin-Abusus hat sich das relative Erkrankungsrisiko bereits mehr als verzehnfacht (Becker, 1994; Boyle et al., 1995; Law et al., 1997). So sind über 90% der Patienten mit Bronchialkarzinom langjährige Raucher (Negri et al., 1994; Holford et al., 1998; Mannino et al., 1998). Ebenso unstrittig ist heute die Schädlichkeit des Passivrauchens, das mit einer signifikant erhöhten Inzidenz von malignen Lungenerkrankungen assoziiert ist (Lee, 1991; Hackshaw et al., 1997; Nyberg et al., 1998; Blot et al., 1998).

Aktives wie passives Rauchen führt zu einer chronischen oxidativen Belastung der Lunge, die durch folgende Faktoren verursacht wird:

- Bei jedem Zigarettenzug werden aktiv 10^{14} reaktive Sauerstoffspezies inhaliert (Jackson et al., 1987; Rahman et al., 1996).
- Es kommt in Folge des inhalierten Zigarettenrauches zu einer Akkumulierung von Entzündungszellen im Alveolarraum durch den Einstrom von neutrophilen Granulozyten sowie Steigerung der Zahl von Alveolarmakrophagen durch Rekrutierung von Blut-Monozyten, die ihrerseits reaktive Sauerstoffspezies (reaktive Moleküle mit der Tendenz, Elektronen aufzunehmen) generieren (Nowak et al., 1990)
- Die Alveolarmakrophagen von Rauchern weisen eine gesteigerte oxidative Aktivität auf (Clark et al., 1988; Kasper et al., 1994)

1.2 Therapie des Bronchialkarzinoms

Bei Erstdiagnose ist das Bronchialkarzinom, bei dem typischerweise keine Frühsymptome auftreten, zumeist bereits fortgeschritten. Hinzu kommt, daß die Symptomatik insgesamt unspezifisch ist, so daß bei einem Altersgipfel um 65 Jahren mögliche tumorassoziierte Beschwerden wie Belastungsdyspnoe oder auch thorakale Schmerzen durch zumeist begleitende, ebenfalls nikotin-assoziierte kardiopulmonale Erkrankungen maskiert werden können (North-Eastern Italian Oncology Group,1990).

Tabelle 1: Symptome bei Erstdiagnose eines Bronchialkarzinoms bei 650 Patienten (Hopwood et Stephens,1995)

Symptom	NSCLC * (% der Patienten)	SCLC *(% der Patienten)
Kurzatmigkeit	85	90
Abgeschlagenheit	82	84
Husten	85	80
Thoraxschmerz	0	55
Appetitlosigkeit	0	78
Schlafstörung	58	77
Gewichtsverlust	7	72
Ruhelosigkeit	55	62
Bluthusten	42	24
Temperaturerhöhung	37	39
Schluckbeschwerden	25	37
*NSCLC, n=507; SCLC, n=143		

Dies bedeutet, daß etwa 70% der Patienten bereits bei Erstdiagnose nicht mehr kurativ durch eine Operation behandelbar sind (Feld et al.,1994; Paesmans et al.,1995). Von den 30% der Patienten, die initial prognostisch (d.h., primär kurativ) wie auch funktionell operabel sind, erleiden über 60% ein Rezidiv (Beinert et al.,1998). Somit münden fast 90% aller Patienten in ein primär oder sekundär palliatives Therapieregime mit auch heute noch sehr eingeschränkter Prognose (Beinert et al.,1999a).

Unter histologischen und klinischen Gesichtspunkten werden Bronchialkarzinome in zwei große Gruppen eingeteilt, in kleinzellige und nicht-kleinzellige Karzinome (small cell lung cancer, **SCLC**, non-small cell lung cancer, **NSCLC**).

Die Gruppe der Patienten mit NSCLC, die 80% aller Bronchialkarzinome ausmacht, schließt histologisch Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, großzellige Karzinome und seltenere Subentitäten wie das Alveolarzellkarzinom oder Bronchialdrüsenkarzinom ein. Diese Gruppe läßt

sich bezüglich Prognose, Therapieoptionen und klinischem Verlauf als eine Einheit fassen, so daß in der internationalen Literatur die Bezeichnung NSCLC zumeist ohne weitere Subdifferenzierung üblich geworden ist (Beinert et al.,1998).

Tabelle 2: Histomorphologische Klassifikation und relative Häufigkeit maligner epithelialer Lungentumore (Beinert et al.,1998)

Histologie	Häufigkeit (%)
Plattenepithelkarzinom	35
Adenokarzinom	29
kleinzelliges Karzinom	19
großzelliges Karzinom	10
adenosquamöses Karzinom	3
Alveolarzellkarzinom	2
Karzinoidtumor	1
Bronchialdrüsenkarzinom	1

Im Gegensatz zum SCLC, das als schnellwachsender und chemosensibler Tumor seit mehreren Jahrzehnten mit hohen initialen Ansprechraten primär chemotherapiert wird (Albain et al.,1991; Findlay et al.,1991; Haraf et al.,1992; Repetto et al.,1998), galt noch bis vor wenigen Jahren die Grundhaltung, bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC sei wegen mangelnden Ansprechens von einer Chemotherapie grundsätzlich abzusehen. Dies ist jedoch spätestens seit 1993, insbesondere nach Erscheinen einer Meta-Analyse von Souquet et al. (1993) obsolet. In dieser Arbeit wurde nicht nur ein klarer Überlebensvorteil, sondern vor allem eine bessere Lebensqualität für die Patienten **unter** Chemotherapie belegt. In letzter Zeit konnte für eine Reihe neuerer Zytostatika wie Vinorelbin, Gemcitabin, CPT-11, Paclitaxel oder Docetaxel) nachgewiesen werden, daß sie als Mono- oder Kombinationstherapie, oft in Verbindung mit platinhaltigen Zytostatika, zu gegenüber früheren Therapieansätzen verbesserten Remissions- und Überlebensraten führen können (Comis, 1993; Cerny et al.,1994; Spencer et al.,1994; Dancey et al.,1997; Millward et al.,1997; Millward et al.,1997, Comella et al., 1999, Pectasides et al, 1999). Damit ist heute die Frage der Indikation zur palliativen Chemotherapie bei fortgeschrittenem NSCLC nicht mehr strittig (Dancey et al.,1997, Bunn Jr. et al., 1998), auch wenn trotz zahlreicher vielversprechender Therapieergebnisse bis heute noch kein einheitlicher Goldstandard für die Chemotherapie des NSCLC definiert werden konnte (Souhami, 1995; Buccheri, 1996; Beinert et al.,1999a, Giaccone et al., 1999, Sauter 1999, Shepherd 1999, Wozniak 1999).

Über die letzten 10 Jahre konnte für Patienten mit metastasiertem NSCLC die mittlere Überlebenszeit unter zytoreduktiver Therapie verdoppelt und zugleich die Lebensqualität verbessert werden (Thatcher et al.,1997; Dancey et al.,1997). In der Therapie lokal fortgeschrittener, prognostisch oder funktionell nicht operabler NSCLC konnte die kombinierte Radio- Chemotherapie ermutigende Ergebnisse hinsichtlich Remissionsraten (Ihde et al.,1988;

Arriagada et al.,1991; Kirkbride et al.,1997, Vokes et al., 1998) und medianen Überlebenszeiten (Hussein et al.,1990; Manegold et al.,1998) erbringen. Neben einer besseren systemischen und lokalen Kontrolle sind diese polychemo- oder multimodalen Therapiekonzepte jedoch auch mit einer höheren Inzidenz unerwünschter Wirkungen behaftet (Turrisi et al.,1988; Gregor et al.,1997), wobei insbesondere die pulmonale Toxizität dosislimitierend ist (McDonald et al.,1995; Segawa et al.,1997). Wochen bis Monate nach Therapie können lebensbedrohliche Pneumonitiden (Roach et al.,1995; Monson et al.,1998; Yamada et al.,1998) und eine fortschreitende Fibrosierung des Lungenparenchyms die Prognose dieser Patienten trotz erfolgreicher zytoreduktiver Therapie limitieren bzw. die Lebensqualität deutlich herabsetzen (Mattson et al.,1987; Arriagada et al.,1989a; Geara et al.,1998).

Die Prognose von Patienten mit SCLC ist trotz hoher Remissionsraten von über 80% bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder bereits metastasierten Stadien (Dearing et al.,1990) auch nach Erreichen einer kompletten Remission (entsprechend den WHO-Kriterien (1979), d.h. bildgebend nicht mehr nachweisbarem Tumor über 4 Wochen) wegen der hohen Rezidivrate schlecht. So liegt die mittlere Überlebenszeit dieser Patienten bei etwas über einem Jahr (Bleehen et al.,1994). Nach 5 Jahren leben bei initial auf die Lunge beschränktem Tumorwachstum noch knapp 5% der Patienten, im bereits metastasierten Stadium sind es nur noch etwa 2% (Lassen et al.,1995). Wird nach Tumoransprechen auf die Chemotherapie eine Strahlentherapie angeschlossen, kann hierdurch die rezidivfreie Zeit wie die Gesamt-Überlebenszeit verlängert werden (Albain et al.,1991), wobei eine zeitlich enge Abfolge mit intensivierter Chemo- Radiotherapie günstig zu sein scheint (Bleehen et al.,1994; Elias et al.,1999, Turrisi et al., 1999). Dosislimitierend im multimodalen Therapiekonzepten ist, neben Ösophagitiden, auch hierbei vorrangig die pulmonale Toxizität (Mornex et al.,1990; Aisner et al.,1992; Johnson et al.,1993, Turrisi 1999).

Somit stellen pulmonale Nebenwirkungen in modernen multimodalen Therapiekonzepten sowohl für Patienten mit SCLC wie mit NSCLC eine entscheidende Limitierung sowohl in der Kurzzeit- als auch Langzeittoxizität dar (Beinert et al., 2000a). Dieses Nebenwirkungsspektrum soll im folgenden ausführlicher dargestellt werden.

1.3 Pulmonale Nebenwirkungen der zytoreduktiven Therapie

Derzeit sind Kenntnisse über die pathophysiologischen Mechanismen von Lungenschädigungen unter zytoreduktiver Therapie noch unbefriedigend (McDonald et al.,1995; Morgan et al.,1995; Segawa et al.,1997, Beinert et al., 1999d). Auch sind bislang keine therapeutischen Konzepte etabliert, die Lungentoxizität unter multimodalen Therapiekonzepten zu modulieren (McDonald et al.,1995, Niedermeier et al., 1996, Kurbacher et Mallmann, 1998).

Zunehmend werden reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS, s.u.) in Zusammenhang mit der Pathogenese interstitieller Lungenerkrankungen wie der idiopathischen Lungenfibrose (Strausz et al.,1989; Maier et al.,1991; Behr et al., 1995, Saleh et al.,1997; Smith et al.,1999) oder anderen interstitiellen Lungenerkrankungen wie der Sarkoidose (Strausz et al.,1989) oder auch der sog.

Farmerlunge (Behr et al., 2000) gebracht. Diese Krankheitsbilder ähneln in ihrer klinischen Erscheinungsform wie ihrem pathomorphologischen Substrat, dem Funktionsverlust des Lungenparenchyms bei Gewebefibrosierung, den Lungenveränderungen nach kombinierter Radiochemotherapie und sind durch Lungenfunktionsparameter, radiologische Bildgebung sowie histomorphologisch von diesen nicht zu diskriminieren (Beinert et al., 1999d).

Es ist die Hypothese der hier vorgelegten Arbeit, daß reaktive Sauerstoffspezies die Hauptursache der pulmonalen Toxizität unter zytoreduktiver Therapie sind, und daß hier ähnliche Pathomechanismen wie bei fortschreitenden interstitiellen Lungenerkrankungen wirksam werden. Diese Hypothese gründet sich auf in vitro- Beobachtungen und Ergebnisse von Tierversuchen, welche die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies als auslösende Faktoren für Lungenveränderungen nach Strahlentherapie (Peters, 1996) wie nach Chemotherapie (Shen et al., 1988; Lehne et al., 1990; Jackson, 1990; Nici et al., 1998) bzw. nach kombinierter Radio-Chemotherapie (Erhola et al., 1997) unterstreichen.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Als reaktive Sauerstoffspezies werden freie Radikale, also Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, sowie Verbindungen mit radikalähnlichen Eigenschaften zusammengefaßt (Halliwell, 1991; Halliwell et al., 1992; Halliwell, 1997; Kamata et al., 1999). Sie sind durch die Tendenz, Elektronen aufzunehmen, gekennzeichnet. Hierdurch werden sie selbst reduziert, ihr Reaktionspartner durch die Abgabe von Elektronen oxidiert. Diese strukturellen Besonderheiten erklären die außerordentlich hohe Reaktivität der ROS und ihr Potential für Kettenreaktionen, in denen nahezu alle Biomoleküle verändert und in ihrer Funktionalität beeinträchtigt werden können (Jenkinson, 1989; Behr et al., 1994; Halliwell, 1997; Kamata et al., 1999). In der Lunge können sie nahezu alle physiologisch vorkommenden Strukturen wie Proteine oder Lipide oxidieren und damit in Struktur und Funktion verändern. Dies führt zu einer komplexen, sich selbstverstärkenden inflammatorischen Kaskade mit sekundärer ROS-Bildung (Rubin et al., 1995). Auch im Bereich der extrazellulären Matrix kommt es durch reaktive Sauerstoffspezies zu Depolimerisation von Hyaluronsäure (Greenwald et al., 1980), oxidative Schädigungen an Kollagenmolekülen und zu Enzymaktivierungen wie etwa der Kollagenase (Weiss et al., 1985). Antiproteasen, z. B von alpha-1-Antitrypsin (Matheson et al., 1981) oder alpha-2-Makroglobulin (Reddy et al., 1989) werden inaktiviert, hierdurch die oxidative Inaktivierung von Antiproteasen und die oxidative Schädigung an Matrixproteinen potenziert. Die Folge sind morphologische Veränderungen des Lungenparenchyms und multifunktionelle Beeinträchtigungen, die letztendlich in einer Aktivierung von Fibroblasten münden können (Meier et al., 1989; Rochester et al., 1993; Poli et al., 1997b; Janssen et al., 1993).

Tabelle 3: Intrapulmonale Mechanismen der Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Unspezifische oxidative Läsionen	-> Lipide, Proteine, DNA	-> Zelltod
Lipidmediatoren	-> Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene	-> endotheliale Dysfunktion
Interaktion mit Proteasen	-> Proteolyse	-> Gewebedestruktion
Transkriptionsfaktoren	-> Zytokinrelease	-> Zytokinkaskade
Fibroblastenaktivierung	-> extrazell. Matrix	-> Lungenfibrose

1.4.1 Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die fortlaufende Produktion kleinerer Mengen von ROS ist ein grundsätzliches Merkmal aeroben Lebens (Halliwell, 1991). In der Lunge werden reaktive Sauerstoffspezies im Rahmen körpereigener Abwehrmechanismen physiologisch generiert (Jenkinson, 1989) bzw. können durch zahlreiche Streßfaktoren induziert werden (Brigham et al., 1986; Maly, 1988; Zeiss et al., 1988; Calhoun, 1991; Kelly et al., 1995; Wilborn et al., 1996; Peterhans, 1997; Nader-Djalal et al., 1998a; Smith et al., 1999).

Zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sind in der Lunge vorrangig Granulozyten und Alveolarmakrophagozyten befähigt (Mustafa, 1990), die molekularen Sauerstoff durch die membranständige NADPH-Oxidase zu Superoxidanionen reduzieren (Sibille et al., 1986). Die hochreaktiven Superoxidanionen dismutieren entweder spontan oder durch die intrazelluläre Superoxid-Dismutase zu dem zytotoxischen Wasserstoffperoxid. Durch die Fenton-Reaktion kann sowohl aus Superoxidanionen wie auch aus Wasserstoffperoxid das Hydroxylradikal entstehen (Stadtman, 1990; Rojanasakul et al., 1993). Unter dem Katalysator Myeloperoxidase wird Wasserstoffperoxid mit Halid-Anionen zur stark toxischen Hypochalidsäure, und hierbei, entsprechend dem hohen Angebot an Chloridanionen, vorrangig zu hypochloriger Säure metabolisiert (Weiss, 1989). Superoxid-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) können durch verschiedene Superoxid-dismutasen in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) überführt werden. H_2O_2 wird weiter umgewandelt in Wasser, eine Reaktion, die durch Katalasen und Glutathionperoxidasen katalysiert wird. Glutathion, ein ubiquitäres intrazelluläres Tripeptid, kann Verbindungen mit einer Reihe von elektrophilen Substanzen entweder enzymatisch oder nichtenzymatisch eingehen. Die hierbei entstehende oxidierte Form, das Glutathiondisulfid (GSSG), wird durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase als eines der wesentlichen Redox-Systeme der Lunge wieder in die ursprüngliche reduzierte Form überführt. Die nachfolgende Tabelle führt die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies auf:

Tabelle 4: Reaktive Sauerstoffspezies:

Ozon	O ₃
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂
Hypophalid-Säure	HOCL
Hydroylradikal	·OH
Superoxidanion	·O ₂ ⁻

1.5 Die Lunge als Zielorgan oxidativer Schäden

Das Lungenparenchym ist in besonderer Weise für radikalbedingte Schäden und deren frühe wie späte Folgezustände suszeptibel (Gutteridge et al., 1996; Saugstad, 1998). Eine der Voraussetzungen hierfür ist die ständige hohe Sauerstoffspannung, der das Lungengewebe ausgesetzt ist. Es konnte gezeigt werden, daß die Ursache für die Toxizität des Sauerstoffs in der Lunge auf einer erhöhten intrazellulären ROS-Produktion beruht (Zweier et al., 1989). Die außerordentlich hohe Dichte an monozytären Zellen in pulmonalen Blutgefäßen, im Interstitium und im Alveolarraum, die als körpereigener Abwehrmechanismus für die größte Oberfläche des Körpers fungieren, stellt eine elementare Quelle für die Generierung und Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren als Reaktion auf zahlreiche exogene Noxen dar (Maly, 1988). Durch die lokale Generierung von chemotaktisch aktive Zytokine, insbesondere IL-8, kommt es zur Akkumulation von Granulozyten in das Lungeninterstitium und den Alveolarraum (Rosiello et al., 1993; Vogelmeier et al., 1993; Krombach et al., 1996). Von diesen werden gemeinsam mit monozytären Zellen und aktivierten Alveolarmakrophagen Oxidantien und Proteasen freigesetzt, die zum Lungenparenchymschaden führen können. Über regenerative Prozesse kommt es schließlich zu einer Aktivierung von Fibroblasten und damit einer Vermehrung von extrazellulärer Matrix in der Lunge mit dem Endzustand des fibrotisch umgebauten Lungenparenchyms.

1.6 Bisherige Untersuchungen an der BALF von Patienten mit soliden Tumoren

Bisherige Untersuchungen an bronchoalveolären Lavagen bei Tumorpatienten beschäftigten sich vorrangig mit den Folgen der Strahlentherapie. So wurden in einer Untersuchung von 1993 an 30 Patienten, die sich bei NSCLC einer primären Radiotherapie unterzogen, Zellzahlen, Zellpopulationen und Gesamtprotein in der BALF analysiert (Maasilta et al., 1993). Ein Jahr zuvor wurde bei 21 Patienten, die adjuvant nach operativer Entfernung eines Mamma-Ca bestrahlt wurden, im Vergleich zu 19 Kontrollpersonen der Effekt der Strahlentherapie auf Eiweißfraktionen der BALF in Abhängigkeit des Rauchverhaltens dargestellt (Bjermer et al., 1992). Dies war eine Folgestudie zu Ergebnissen einer Untersuchung, die ebenfalls an Patientinnen mit Mamma-Ca durchgeführt worden war. Hier konnte die Arbeitsgruppe zeigen, daß die Patientinnen dann eine verminderte entzündliche pulmonale Reaktion auf die Strahlentherapie hin entwickelten, wenn sie rauchten (Bjermer et al., 1990) - Ergebnisse, die bereits auf die intrapulmonale antioxidative Kapazität als Kenngröße hinweisen, auch wenn sie damals noch nicht explizit untersucht wurde. 1991 erschien

eine Studie mit 22 Patienten mit Bronchialkarzinom oder Pleuramesotheliom. Hier konnte in der Lavage unter und nach Radiotherapie weder für Fibronektin noch für Plasminogen ein Zusammenhang mit pulmonalen Strahlenschäden gefunden werden (Maasilta et al., 1991). 1996 wurden in einer Studie aus Japan Zellpopulationen in der BALF bei 13 bestrahlten und 15 nicht bestrahlten Patienten mit Bronchialkarzinom verglichen, wobei sich unter Bestrahlung eine vermehrte Akkumulation von T-Lymphozyten fand (Nakayama et al., 1996). Im Folgejahr erschien eine Untersuchung, die BALF-Befunde bei 19 Bronchialkarzinom-Patienten analysierte, die teils mit Strahlentherapie, teils mit Chemotherapie behandelt worden waren. Unter Strahlentherapie zeigte sich in der BALF ein erniedrigter Quotient von T-Helfer- zu T-Suppressorzellen, während in der Chemotherapiegruppe, die klinisch unauffällig war, eine Schrankenstörung der alveolokapillären Membran gesehen wurde (Capelli et al., 1992). Kürzlich erschien eine Studie an 17 Patienten mit SCLC-Rezidiv, die mit und ohne begleitende Interferon-Gabe strahlentherapiert wurden. In der Lavageflüssigkeit wurden erhöhte Zellzahlen und eine Störung der alveolokapillären Schrankenfunktion als Ausdruck eines strahleninduzierten Lungenparenchymschadens identifiziert (Halme et al., 1999).

Zahlreiche bronchoskopische Untersuchungen bei Patienten mit Bronchialkarzinom heben primär auf Probleme der Tumordiagnostik ab (Rennard, 1990; Calogero et al., 1992; Rennard, 1992; De Gracia et al., 1993; Willsher et al., 1993; Dowlati et al., 1997; Kjellberg et al., 1997; Cremades et al., 1998; Dresler et al., 1999; Ahrendt et al., 1999), während Untersuchungen zu Veränderungen des Lungenparenchyms unter Chemotherapie zurücktreten. Bereits 1987 wurde in einer Studie an 8 Patienten, die bei fortgeschrittenem Bronchialkarzinom chemotherapiert wurden, eine vermehrte Zellzahl und Veränderungen in der Zusammensetzung der Surfactant-Faktoren gesehen. Zwei Jahre später wurden Lavage-Daten von 6 Patienten mit soliden Tumoren veröffentlicht, die unter Methotrexat eine Pneumonitis mit dem Bild einer lymphozytären Alveolitis entwickelt hatten (White et al., 1989). Hiermit in Übereinstimmung ergab die Lavage bei einer kürzlich veröffentlichten Studie an 4 Patienten mit Methotrexat-induzierter Pneumonitis ebenfalls das Bild einer lymphozytären Alveolitis (Schnabel et al., 1997).

Somit liegen systematische Untersuchungen zur therapieassoziierten pulmonalen Toxizität bei Tumorpatienten in geringer Zahl zu den Folgen der Strahlentherapie und nur vereinzelt zu den Folgen der Chemotherapie vor. Dies mag auch damit zusammenhängen, daß der palliative Charakter der Strahlentherapie bei Bronchialkarzinom weniger stark ausgeprägt ist als bei der primären Chemotherapie, und bislang Begleit- oder Folgeschäden der Chemotherapie bei diesen Patienten weniger im Brennpunkt des Interesses standen (Beinert et al., 1999a).

Im folgenden werden die anatomisch-zytologischen Grundlagen für die Untersuchungen dieser Arbeit kurz dargestellt, anschließend auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies unter Radio-Chemotherapie und die klinischen Folgebilder, Pneumonitis und Lungenfibrose, eingegangen. Die intrapulmonalen Mechanismen der antioxidativen Abwehr werden aufgezeigt und begründen die in dieser Arbeit verwendeten Meßparameter der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und des peripheren Blutes bei Patienten unter zytoreduktiver Therapie als Indikatoren des therapieassoziierten pulmonalen oxidativen Stress.

2 Hintergrund

2.1 Anatomische Vorbemerkungen

2.1.1 Die Lungenperipherie

Die Lungenperipherie wird nach neueren morphologischen Schätzungen von einer Gasaustauschfläche mit etwa einhundertsechzig Quadratmetern gebildet (P. Gehr, anatomisches Institut Bern, mündliche Mitteilung). Die kleinsten Untereinheiten der terminalen Luftwege, die Alveoli, sind von Typ-1- und Typ-2-Pneumozyten ausgekleidet. Die Typ-1-Pneumozyten, die einen Anteil von 95% ausmachen, sind ausdifferenzierte Zellen, die gegen Noxen außerordentlich sensibel sind und ein nur geringes regeneratives Potential aufweisen (Harris et al., 1991; Kasper et al., 1998). Deren Stammzellen, Typ-2-Pneumozyten, sind gegenüber Schädigungen vergleichsweise unempfindlich und können reparativ zur Proliferation angeregt werden (Woodcock Mitchell et al., 1986; Castranova et al., 1988; Nici et al., 1996). Sie sind weiterhin maßgeblich an der Surfactant-Produktion beteiligt und besitzen die Fähigkeit zur Produktion extrazellulärer Matrix (Crouch et al., 1987; Rannels et al., 1989).

2.1.2 Das Lungeninterstitium

Das Lungeninterstitium besteht vorwiegend aus extrazellulärer Matrix. Diese ist aus Typ-I und Typ-III Kollagen, Elastin, Proteoglykanen und nicht-kollagenen Glykoproteinen wie z. B dem Fibronectin zusammengesetzt (Davidson, 1990). Spärlich im Interstitium enthalten sind Fibroblasten, die das Gleichgewicht zwischen Abbau und Neusynthese des interstitiellen Bindegewebes halten (Adamson et al., 1990).

2.1.3 Der interstitielle Raum

Der interstitielle Raum wird allseitig von Basalmembranen der Alveolarepithelzellen umschlossen. Durch das Interstitium ziehen Kapillaren, die ebenfalls durch Basalmembranen abgegrenzt sind (Davidson, 1990).

2.1.4 Die Basalmembran

Der Basalmembran bildet die Barriere für die zelluläre Migration in den Alveolarraum (Boyce et al., 1991). Weiterhin figuriert sie als Leitstruktur reparativer Mechanismen und spielt auch bei überschießender Fibrosierung eine vorrangige Rolle (Crouch et al., 1987). Die Basalmembran besteht aus zwei Hauptbestandteilen, dem Kollagen Typ IV, das die Membranstruktur stabilisiert, und dem Laminin, das in komplexer Interaktion zu anderen Matrixproteinen steht (Klein et al., 1988). Laminin wird hauptsächlich von Epithel- und Endothelzellen synthetisiert (Kubota et al., 1988). Erhöhte Laminin-Werte im peripheren Blut werden bei Erkrankungen gefunden, die mit

einem erhöhten Umsatz von Basalmembranen vergesellschaftet sind, wie z. B. der Leberzirrhose (Tsutsumi et al., 1996; Körner et al., 1996; Gabrielli et al., 1996), aber auch bei dem Wachstum maligner Tumoren (Ferrarini et al., 1994). Erhöhte Serumspiegel wurden weiterhin unter Chemotherapie- (Singer et al., 1986) wie Strahlentherapie- (Rosenkrans et al., 1987) induzierten Lungentoxizität gesehen, deren Folge eine Schädigung der Basalmembran mit einem gesteigerten Laminin-Umsatz ist.

2.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Anfänge der BAL liegen heute mehr als 50 Jahre zurück. Initial wurde sie rein therapeutisch angewandt, um zumeist Patienten mit Bronchiektasien von zähen intrabronchialen Sekretansammlungen zu befreien (Crystal et al., 1986). Bis in die 60er Jahre wurde sie als primär therapeutische Anwendung, insbesondere bei Patienten mit cystischer Fibrose (Kylstra et al., 1971) eingesetzt und hat auch heute noch ihren Platz in der Notfallbehandlung von Asthmapatienten mit Mucosexzess oder alveolärer Proteinose (Schweisfurth et al., 1990; Alberti et al., 1996). Erstmals im Jahr 1961 wurde die Lavage als diagnostisches Instrument, zunächst am Tier (Myrvik et al., 1961), drei Jahre später auch am Menschen (Keimowitz, 1964) eingeführt. Zu Beginn der 70er Jahre wurde dann mit Einführung des flexiblen Bronchoskops die Ära der modernen Bronchoskopie eingeläutet (Reynolds et al., 1974). Heute ist die bronchoalveoläre Lavage ein sicheres und nebenwirkungsarmes diagnostisches Verfahren, das auch bei wiederholtem Einsatz keine strukturellen Lungenschäden verursacht.

Durch die bronchoalveoläre Lavage werden Zellen des Alveolarraums durch Verdünnung und Auswaschung des alveolären epithelialen Flüssigkeitsfilms (epithelial lining fluid, ELF) mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen. Die zelluläre Differenzierung zeigt beim Lungengesunden mit 85% zum größten Teil Alveolarmakrophagen, gefolgt von Lymphozyten (15%) und neutrophilen Granulozyten (3%). Daneben finden sich vereinzelt Mastzellen und eosinophile Granulozyten. Ein Teil dieser Zellen tritt aus dem Lungeninterstitium in den Alveolarraum über, so daß die BAL-Flüssigkeit (BALF) Rückschlüsse auf die zellulären Bestandteile des Interstitiums erlaubt bzw. interstitielle Prozesse in der Lavageflüssigkeit gleichsam gespiegelt werden (Hunninghake et al., 1979; Weiland et al., 1989).

2.2.1 Zelluläre Bestandteile der BAL

2.2.1.1 Monozyten/Alveolarmakrophagen

Bei fast allen interstitiellen Lungenerkrankungen ist die absolute Zellzahl und damit der Anteil an Alveolarmakrophagen in der BALF vergrößert (Brieland et al., 1987). Diese rekrutieren sich aus der verstärkten Einwanderung von Monozyten aus dem pulmonalen Kapillarbett, die im Lungengewebe zu Alveolarmakrophagen ausreifen (Wewers et al., 1989; Elias et al., 1985). In der Lavage lassen sich zwei Populationen von Alveolarmakrophagen differenzieren, eine großzellige, reifen Alveolarmakrophagen entsprechend, und eine kleinzellige, mit noch unreifen Zellformen (Krombach et al., 1996). Aktivierte Alveolarmakrophagen bilden (gemeinsam mit neutrophilen Granulozyten) eine wesentliche Quelle von Proteasen, Lipidmediatoren, Chemotaxinen, Leukotrienen und

insbesondere reaktiven Sauerstoffspezies (Brigham et al., 1986; Maly, 1988; Iacobini et al., 1997; Nader-Djalal et al., 1998). Weiterhin können sie zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen (Clark et al., 1988; Clelland et al., 1990). Diese Pluripotenz weist den Alveolarmakrophagen (neben dem bedeutendsten Vertreter der intrapulmonalen zellulären Abwehr, den neutrophilen Granulozyten) eine Schlüsselrolle nicht nur in der Abwehr von bakteriellen und viralen Infektionen, sondern auch in der Regulation von Entzündungs- und Reparaturmechanismen zu (Henke et al., 1993). Durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies kann es im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen zudem zu einer direkten Parenchymschädigung kommen (Calhoun, 1991; Simeonova et al., 1995).

2.2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Interstitielle Lungenerkrankungen sind regelhaft mit einer Vermehrung von neutrophilen Granulozyten im Alveolarraum vergesellschaftet (Hogg, 1987; Schweisfurth et al., 1990). Neutrophile Granulozyten bilden den Hauptbestandteil der zellulären Abwehrmechanismen der Lunge. Sie sind nicht nur in der Lage, zahlreiche Proteasen wie z.B. Elastasen, Kollagenase, Cathepsin g oder Gelatinase freizusetzen (Rodell et al., 1988; Anderson et al., 1990), sondern spielen im Abwehrprozeß vor allem auch durch den Release reaktiver Sauerstoffspezies (Superoxidation, Wasserstoffperoxid, hypochlorige Säure) eine vorrangige Rolle (Ward et al., 1988). Es sind jedoch gerade diese Mechanismen zur Abwehr von Lungenschädigungen, die überschießend zu einem Lungenparenchymschaden und, vor allem durch die Generierung von sekundären reaktiven Sauerstoffspezies, zu Schädigungen der extrazellulären Matrix führen können (Hogg, 1987; Worthen et al., 1987; Rodell et al., 1988; Carre et al., 1991; Maier et al., 1991).

2.2.1.3 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind vor allem bei der fibrosierenden Alveolitis in der BALF massiv vermehrt (Fujimoto et al., 1995). Sie enthalten zahlreiche Proteine, wie z.B. das Eosinophilic Cationic Protein, Major Basic Protein oder die eosinophile Peroxidase. Diese Proteine können alleine oder in Verbindung mit einer oxidativen Lungenbelastung zu Lungenstrukturschäden führen (Agosti et al., 1987; Ballantyne et al., 1989; Rowen et al., 1990).

2.2.1.4 Lymphozyten

Das intrapulmonale Verteilungsmuster der Lymphozyten beinhaltet das bronchusassoziierte lymphatische Gewebe sowie, diffus, das Interstitium von Alveolen und Bronchien. Sie sind Träger der spezifischen zellulären und humoralen Immunabwehr und können durch Zytokinfreisetzung Alveolarmakrophagen und Fibroblasten aktivieren (Reynolds, 1987). Die Aktivierungsprofile der einzelnen Lymphozytensubpopulationen sind hierbei außerordentlich komplex und bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ihr direkter Anteil an einer möglichen Gewebeschädigung ist als eher gering einzuschätzen, auch wenn zytotoxische Lymphozyten oder Natural-Killer-T-Lymphozyten Epithelzellen direkt schädigen können (Doherty et al., 1993).

2.2.2 Nicht zelluläre Bestandteile der BAL

2.2.2.1 Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha)

TNF-alpha, ein multifunktionelles Peptid, ist an der Expression, Synthese, sowie Sekretion von uPA (Urokinase –Type Plasminogen Activator) auf Endothelzellen beteiligt. In vitro fördert TNF-alpha die Wanderung der Endothelzellen zur Gefäßformation und inhibiert die Proliferation dieser Zellen (Matuschak et al., 1998). Weiterhin erhöht TNF die Produktion und Sekretion von bFGF in Endothelzellen, und, - durch Zytokininduktion - die Kollagenaseaktivität (Smith et al., 1998). Bei der Fibrogenese wird die Fibroblastenaktivierung durch Wachstumsfaktoren wie PDGF gefördert, die durch TNF-alpha mit induziert werden (Kelley, 1990).

TNF-alpha wird produziert von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, CD4-positiven Lymphozyten, NK-Zellen, LAK-Zellen sowie Endothelzellen.

2.2.2.2 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6, ein Polypeptid mit einer Größe von 26 kDa, wird von zahlreichen Zellen, vor allem stimulierten Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, in geringerem Maße auch von Makrophagen, B- und T- Lymphozyten, neutrophilen und eosinophile Granulozyten produziert (Kelley, 1990). IL-6 wird von Bronchialepithelien u.a. bei inhalativer Asbestbelastung exprimiert, wobei die IL-6 Induktion durch intrazelluläre Hydroxyl-Scavenger und das Antioxidans N-Acetylcystein aufgehoben werden konnte (Simeonova et al., 1997). In vivo-Untersuchungen an Patienten mit Kollagenosen, bei denen gehäuft interstitielle Lungenerkrankungen auftreten, unterstreichen eine mögliche Schlüsselrolle von IL-6 (neben IL-8 und anderen Interleukinen) in der Genese der Lungenfibrose bei entzündlichen Systemerkrankungen wie der systemischen Sklerose oder Sarkoidose (Bolster et al., 1997; Takizawa et al., 1997). Hier scheint IL-6 die Interaktion zwischen Alveolarmakrophagen und Fibroblasten zu modulieren bzw. zu verstärken (Shahar et al., 1996). Im Tiermodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose konnte kürzlich eine Schlüsselrolle für IL-6 und TNF-alpha als Anteile eines proinflammatorischen Zytokinnetzwerkes in der profibrotischen entzündlichen Lungenparenchymveränderung identifiziert werden (Smith et al., 1998).

2.2.2.3 Wachstumsfaktoren

2.2.2.3.1 Transforming Growth Factor (TGF-beta)

TGF-beta, ein über eine Disulfid -Brücke verbundenes Heterodimer, das in zumindest fünf Isoformen vorliegt, ist ein potenter Inhibitor alveolärer epithelialer Zellproliferation und scheint nach akutem pulmonalen Stress die Reparationsphase der Epithelien zu regulieren (Khalil et al., 1994). Zugleich fördert es die Produktion von Kollagen und extrazellulärer Matrix durch Fibroblastenproliferation (Khalil et al., 1991; Eickelberg et al., 1999). Es wirkt weiterhin auf Fibroblasten, Monozyten und neutrophile Granulozyten chemotaktisch und fördert die Migration der Entzündungszellen durch ICAM-1 Expression von Epithelien (Suzuki et al., 1994). Der Wachstumsfaktor wird im Rahmen der Entzündung von aktivierten Makrophagen, Epithelzellen und auch Blutplättchen sezerniert und ist somit in der BALF präsent.

2.2.2.3.2 Platelet-derived growth factor (PDGF)

Die Aktivierung von Bindegewebszellen wird von einer Vielzahl von Mediatoren wie TNF-alpha oder PDGF gesteuert (Smith et al., 1995), wobei PDGF in niedriger Konzentration als Chemoattraktans, in höherer Konzentration als Wachstumsfaktor für Fibroblasten wirkt (Kovacs et al., 1986; Antoniades et al., 1990; Walsh et al., 1993).

2.2.2.3.3 Vascular epithel growth factor (VEGF)

VEGF, ein multipotentes Protein, wurde zunächst 1983 als ein die mikrovaskuläre Permeabilität massiv steigernder Faktor charakterisiert (Senger et al., 1983), eine Wirkung, die auf der Öffnung endothelialer Fenestreae beruht (Roberts et al., 1995). Über die letzten 10 Jahre rückte VEGF als wichtigster Wachstumsfaktor in der Neoangiogenese und damit als Grundvoraussetzung invasiven wie metastasierten Tumorwachstums in das Zentrum der Forschung zur Cancerogenese (Le Querrec et al., 1993; Senger et al., 1994; Bikfalvi, 1995; Dvorak et al., 1995; Ferrara, 1995; Crew, 1999; Neufeld et al., 1999). Diese Ergebnisse bahnten hierbei den Weg für neue, antineoangiogenetische Therapieformen (Martiny-Baron et al., 1995; Borgström et al., 1996; Bouvet et al., 1998; Konno et al., 1998). Zudem konnte nachgewiesen werden, daß Patientinnen mit Mamma-Ca eine höhere VEGF-Konzentration im peripheren Blut haben als Patientinnen mit einem benignen Brust-Tumor (Salven et al., 1999), und, daß eine hohe VEGF-Konzentration bei soliden Tumoren mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist (Salven et al., 1998; El-Assal et al., 1998; Locopo et al., 1998).

VEGF ist das in vivo am stärksten wirksame angiogenetische Zytokin (Shibuya, 1995; Kolch et al., 1995; Martiny-Baron et al., 1995; Claffey et al., 1996b; Siemeister et al., 1998). Es stimuliert die Proliferation von makrovaskulären Endothelzellen und erhöht die vaskuläre Permeabilität (Senger et al., 1994). In endothelialen Zellen werden durch VEGF die Synthese einer Vielzahl von

Proteinen, darunter der von Willebrand Faktor (Le Querrec et al., 1993), Metalloproteinasen (Iwasaka et al., 1996; Lamoreaux et al., 1998), weiterhin die Produktion von interstitieller Kollagenase induziert, die interstitielles Kollagen Typ I-III degradiert (Lamoreaux et al., 1998). Hierdurch könnte die Interaktion zwischen migrierten Epithelzellen und umgebender extrazellulärer Matrix, wie in dem kürzlich formulierten RIMAC-Modell (radial invasion of matrix by aggregated cells), im Rahmen der Neoangiogenese gesehen werden (Vernon et al., 1999). Hierbei wirkt VEGF als Chemoattraktans auf Epithelzellen, weiterhin auch auf Makrophagen, Monozyten und Mastzellen (Oh et al., 1997).

Die Neoangiogenese wird durch VEGF insbesondere durch folgende Mechanismen induziert: VEGF wird mit hoher Affinität an die beiden Rezeptoren KDR und flk-1 an der Zelloberfläche von Endothelzellen gebunden, wodurch es zur Freisetzung des von Willebrand-Faktors kommt (Le Querrec et al., 1993; Malavaud et al., 1997). Zusätzlich wird die Aktivität des Glutamin-1-Glukose-Transporters (Bikfalvi, 1995) sowie des Plasminogenaktivators und der Kollagenasen erhöht (Iwasaka et al., 1996; Mandriota et al., 1997). Durch elektronenmikroskopische Darstellungen konnte nachgewiesen werden, daß nach Rezeptorbindung von VEGF eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit durch Auseinanderweichen des Endothelzellverbandes an den tight junctions kommt (Senger et al., 1994; Ferrara, 1995; Claffey et al., 1996a). Die VEGF-Synthese wird wesentlich durch das lokale Sauerstoff- und Glukoseangebot beeinflusst (Oku et al., 1998; Sinor et al., 1998, Beinert et al., 1999c).

Neben der zentralen Rolle von VEGF im Rahmen der Neoangiogenese gibt es zunehmend Hinweise darauf, daß VEGF auch in die antioxidative Abwehr insbesondere von Endothelzellen involviert ist. So konnte in vitro nachgewiesen werden, daß die VEGF Gen-Expression und -Sekretion in dem Modell endothelialer Zellen des Rattenherzens durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hochreguliert wurde, eine Reaktion, die durch N-Acetylcystein, einem potenten Antioxidans, blockiert werden konnte (Choung et al., 1998). Die mögliche Funktion von VEGF in vivo bei oxidativem Stress könnte durch kürzlich mitgeteilte Ergebnisse eines in vitro Versuches an Endothelzellen aus Umbilicalvenen weiter geklärt werden. Hier wurde durch VEGF, aber auch durch andere angiogenetische Faktoren wie Fibroblast growth factor (FGF-alpha und FGF-beta), eine 5 bis 10-fach erhöhte Resistenz der Endothelzellen gegen ROS (Wasserstoffperoxid) nachgewiesen (Yang et al., 1997). Kürzlich konnte weiterhin gezeigt werden, daß VEGF in humanen mikrovaskulären Endothelzellen die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 induziert und dadurch zu einer Dosis-abhängigen Verlängerung der Überlebenszeit dieser Zellen führt (Nör et al., 1999).

2.3 Fibroblasten

Eine Fibrosierung des Lungengewebes ist Folge einer überschießenden Aktivierung der Fibroblasten im Lungeninterstitium mit nachfolgender massiver Produktion von extrazellulärer Matrix (Crouch, 1990). Diese extrazelluläre Matrix wird hauptsächlich von Fibroblasten, in geringem Maß aber auch von Endothelzellen und Mesothelzellen synthetisiert (Adamson et al., 1994).

2.3.1 Fibroblastenaktivierung

Untersuchungen zur Fibroblastenaktivierung gehen vornehmlich auf in vitro Experimente zurück. Die Aktivierung dieser Bindegewebszellen wird von einer Vielzahl von Mediatoren wie TNF-alpha, TGF-beta FGF oder PDGF gesteuert (Smith et al., 1995), wobei die Produktion dieser Faktoren teilweise einer Regelung durch den nukleären Transkriptionsfaktor NF-kappa B unterliegt. TGF-beta, der Wachstumsfaktor mit dem größten Potential zur Induktion von extrazellulärer Matrixproduktion, wird im Rahmen des Entzündungsgeschehens von aktivierten Makrophagen, Epithelzellen und Blutplättchen sezerniert und ist somit in der BALF präsent. TGF-beta ist weiterhin als Chemoattraktant für Fibroblasten in die frühe Phase der Lungenfibrosierung maßgeblich involviert (Korfhagen et al., 1994).

Von der Aktivierung der Fibroblasten bis zur manifesten Lungenfibrose werden drei Schritte durchlaufen: Zunächst kommt es zur Chemotaxis der Fibroblasten und damit zur gerichteten Wanderung zum Läsionsort (Behr et al., 1993). Dort proliferieren sie in einem zweiten Schritt, um anschließend extrazelluläre Matrix, insbesondere Typ I und Typ III Kollagen (Crouch, 1990), daneben auch Typ VI Kollagen (Specks et al., 1995) zu produzieren. Weiterhin unterliegt die Fibroblastenaktivierung einer Interaktion mit Abbauprodukten der Matrix (Crouch, 1990). Hierbei ist die Zellzyklusphase, in der sich die Fibroblasten befinden, entscheidend für ihre Empfänglichkeit gegenüber externen Stimuli (Bayreuther et al., 1992).

2.3.2 Kollagenbildung als Folge der Fibroblastenaktivierung

Die frühe proliferative Phase der Lungenfibrosierung ist vorrangig durch die Synthese von Kollagen Typ III gekennzeichnet (Bjerner et al., 1986) und wird von der Produktion von Kollagen VI gefolgt (Specks et al., 1995), während in der Endform der Lungenfibrose Kollagen Typ I überwiegt (Last et al., 1990a). Die Synthese des Kollagen Typ III beginnt mit der intrazellulären Bildung von Prokollagen-Typ-III-Monomeren, die sich im endoplasmatischen Retikulum zu Homotrimeren mit tripelhelikaler Struktur als Prokollagen-Typ-III-Moleküle zusammenfügen und in dieser Form in den Extrazellularraum abgegeben werden. Hier werden durch Peptidasen C- und N-terminale Propeptide abgespalten und anschließend die Quervernetzung, die die hohe Stabilität des Kollagen-Typ-III ausmacht, initiiert (Last et al., 1990b). Das abgespaltene N-terminale primäre Prokollagen-III-Peptid wird im Verhältnis 1:1 zum Kollagen-Typ-III gebildet und ist sowohl im Blut als auch in der BALF von Patienten mit Lungenfibrose als Marker der intrapulmonalen Kollagen-Typ-III-Produktion und damit der Fibrosierungsaktivität bestimmbar (Maasilta et al., 1991).

Im Prozeß der intraalveolären und interstitiellen Fibrosierung nimmt die Aktivierung von Fibroblasten somit eine Schlüsselrolle ein. Die Expression von Kollagenen, Fibronectin und Proteoglykanen kann dabei ursächlich entweder durch Reaktionsprodukte der Lipidmembranschädigung (4-Hydroxynonenal) oder durch Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren hervorgerufen werden.

2.4 Das intrapulmonale System der antioxidativen Abwehr

2.4.1 Antioxidative Enzymsysteme

Enzyme des Glutathion-Redox-Zyklus, Superoxid-Dismutase (SOD) und die Catalase sind primär intrazelluläre Enzymsysteme, die ineinandergreifend zu einer Minimierung von intrazellulären ROS führen. SOD katalysiert die Umformung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid, das durch Catalase zu Wasser neutralisiert wird. Alternativ hierzu kann Wasserstoffperoxid auch durch Glutathion zu Wasser reduziert werden. In diesem Reaktionsschritt entsteht GSSG, das durch die Glutathionreduktase durch beta-Nikotinamid-Adenindinucleotidphosphat (NADPH) in die reduzierte Form von Glutathion überführt wird (GSH).

Neben dem Glutathion-Stoffwechsel kommt auch dem Pentose-Phosphat-Zyklus eine zentrale Bedeutung bei der Elimination von ROS zu. Hier werden Reduktionsäquivalente (NADPH) bereitgestellt, die sowohl für die Reduktion von GSSG zu GSH als auch zur Synthese von Superoxidanionen durch die NADPH-Oxidase erforderlich sind.

2.4.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Den nicht-enzymatischen Antioxidantien, die intra- wie extrazellulär lokalisiert sind, kommt im Gegensatz zu den primär intrazellulär aktiven enzymatischen Antioxidantien eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von extrazellulären ROS zu. Zu diesen antioxidativen Systemen zählen die Serumproteine, vornehmlich Albumin und Lactoferrin, sowie Glutathion, Vitamin E und Vitamin C. Die antioxidative Wirkung beruht teils auf einer kompetitiven Entlastung, da durch die Bindung der hochreagiblen ROS andere Proteine vor Oxidation geschützt werden (Wasil et al., 1987; Haliwell, 1988).

Zweiwertige Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} oder Cu^{2+} potenzieren bereits in geringer Konzentration die Wirkung von ROS durch eine verstärkte Bildung des reaktiven Hydroxylradikals. Transferrin und Coeruloplasmin wirken antioxidativ durch die Ferro-Oxidase-Aktivität von Coeruloplasmin, das Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert, das dann an Transferrin gebunden wird. So ist auch Lactoferrin durch seine Fähigkeit der Eisenbindung ein Teil des intrapulmonalen antioxidativen Systems (Okrent et al., 1990; Davis, 1991).

Vitamin E (alpha-Tocopherol) kann durch seine lipophilen Eigenschaften die Lipidoxidation in Zellmembranen verhindern, wo es selbst mit ROS und Lipid-Peroxiden reagiert (Suntres et al., 1994; Demling et al., 1995). Daneben kann es direkt als ROS-Fänger fungieren (Comstock et al., 1997). In Verbindung mit Ascorbinsäure wirkt es synergistisch bei der Entgiftung von Oxidantien. Alpha-Tocopherol verbindet sich bevorzugt mit Radikalen, die während radikalischer Lipidperoxidationen anfallen. Nach Wanderung zur Oberfläche der Lipidmembranen kann das entstandene Tocopherol-Radikal durch Ascorbinsäure wiederhergestellt werden, die selbst in relativ stabiles Semidehydroaskorbat überführt wird. Ascorbinsäure ist als potente antioxidative Substanz auch zur Entgiftung einer Reihe anderer reaktiver Verbindungen fähig.

Um die Entstehung großer Mengen von Oxidantien zu verhindern, werden Metallionen wie Eisen

und Kupfer konsequent gebunden. Über die Fenton-Reaktion würde in Anwesenheit dieser Metalle vorhandenes H_2O_2 in Hydroxylradikale (OH^*) umgewandelt werden. Daher ist der Gehalt der intra- wie extrazellulären Flüssigkeit an freiem Eisen extrem niedrig. Hierbei fungieren metallbindende Proteine wie Transferrin, Ferritin und Coeruloplasmin als indirekte Antioxidantien.

2.4.3 Das pulmonale Glutathionsystem

Glutathion gehört, wie oben aufgeführt, sowohl zu den enzymatischen wie den nicht enzymatischen antioxidativen Systemen. GSH ist ein effektiver Radikalfänger, der nach Oxidation durch die intrazelluläre Glutathionreduktase oder durch den gamma-Glutamyl-Zyklus wiedergewonnen werden kann.

Die intra- wie extrazelluläre Präsenz des Glutathion räumen ihm eine Sonderstellung in der ROS-Elimination der Lunge ein (Pablos et al., 1997). Die intrazellulär gelegene Glutathionreduktase oder der gamma-Glutamyl-Zyklus bewirken, daß über 90% des Glutathion in der Zelle als GSH vorliegen (Cantin et al., 1991). Der komplexe Glutathionmetabolismus schließt das intra- und extrazelluläre Kompartement ein. Ist Glutathion intrazellulär überschüssig, kann es in den Extrazellulärraum abgegeben werden (Cantin et al., 1987; Cantin et al., 1991; Behr et al., 1995), ein Vorgang, der für die meisten Zellen nicht reversibel ist (Deneke et al., 1995).

Durch das membranständige Enzym gamma-Glutamyl Transpeptidase (gamma-GT) wird extrazelluläres GSH, GSSG und gamma-Glutamylglutathion zu gamma-Glutamyl- und Cysteinyl-Glycinresten gespalten. Diese werden dann in die Zelle aufgenommen und münden hier erneut in die Glutathion-Synthese ein (Drozd et al., 1998). Dieses intra-extra-intrazelluläre Recycling-System ist für die hohe antioxidative Potenz des Glutathions verantwortlich und weist ihm eine vorrangige Stellung in der Reihe der antioxidativen Abwehrmechanismen der Lunge an.

2.4.4 Methioninsulfoxid als Indikator intrapulmonaler ROS-Belastung

Die Aminosäure Methionin macht etwa einen Anteil von 3 Mol % aller humanen Proteine aus. Durch Oxidation der Thioäthergruppe von Methionin entsteht Methioninsulfoxid (Met(O)), dessen Anteil an einem Protein im Vergleich zu dem Gesamtmethioningehalt des Makromoleküls ein Maß für den Oxidationsgrad ist (Behr et al., 1995; Behr et al., 1997; Van Zandwijk, 1995). Der Met(O)-Gehalt der Proteine des Alveolarraumes ist jedoch nicht nur ein direkter Indikator der oxidativen Belastung. Da die Bildung von Met(O) die Erschöpfung antioxidativer Schutzmechanismen sowie das Fehlen anderer Substrate zur Oxidation voraussetzt, spiegelt der Gehalt von Methioninsulfoxid nicht nur die Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies, sondern zugleich den Funktionszustand der intrapulmonalen oxidativen Abwehr wider (Behr et al., 1994; Behr et al., 1997).

2.5 Hitzeschockproteine (HSP)

Als Antwort auf Stress-Stimuli exprimieren Zellen als adaptive Antwort eine Gruppe von Proteinen, die Hitzeschockproteine genannt werden. Einflüsse von Hyperoxie, Hyperthermie, Endotoxine sowie exogener Substanzen, die ebenfalls mit erhöhter Generierung von reaktiven

Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht werden, können durch HSP-Induktion zu einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit gegenüber dem auslösenden Stimulus oder anderen Stress-Stimuli führen (Beinert et al., 2000b).

Die Familie der Hitzeschockproteine besteht aus einer heterogenen Gruppe von Proteinen zwischen 8 und 110 kDa. Am besten charakterisiert sind die HSP70-Familie und die Häm-Oxygenase (HO-1, 32 kDa), die den ersten Schritt des Hämabbaus katalysiert.

Als Wirkungsmechanismen werden Apoptoseunterdrückung, intrazelluläre Proteinstabilisierung und Inhibition von Pro-Stressproteinen diskutiert (Choi et al., 1996). HO-1 induziert die Ferritin-Synthese und wirkt möglicherweise auf diese Weise antioxidativ (Choi et al., 1996). Darüber hinaus vergrößert es die Menge an vorhandenem Bilirubin, einem potenten Antioxidans. Nach HSP70-Transfektion und nachfolgender hyperoxischer Belastung humaner Lungenadenokarzinomzellen konnte eine herabgesetzte Rate an Lipidperoxidation und eine Verminderung des zellulären ATP-Verlustes beobachtet werden (Wong et al., 1997). Der Mechanismus der herabgesetzten zellulären ROS-Genese nach HSP70-Expression könnte auf den antioxidativen Schutz der mitochondrialen Integrität zurückzuführen sein (Polla et al., 1993), da in den Mitochondrien im Rahmen physiologischer Prozesse große Mengen an ROS generiert werden (Mizzen et al., 1989). So konnte nach HSP70 Induktion an einer humanen prämonozytischen Zelllinie gezeigt werden, daß diese Zellen unter H₂O₂-Belastung im Gegensatz zu nicht induzierten Zellen nahezu konstante mitochondriale Membranpotentiale aufwiesen (Preville et al., 1999). Ähnliche Effekte konnten auch für kleinere Mitglieder der HSP-Familie gezeigt werden. So blieb unter HSP 25/27 die strukturelle Mitochondrienintegrität beinahe vollständig erhalten (Preville et al., 1999).

Vergleichsweise wenig ist bislang über die Expression von Streßproteinen in pulmonalen Zellen bekannt. In der menschlichen Lunge konzentriert sich die HSP-Expression ortsständiger Zellverbände wesentlich auf die Bronchialepithelien der proximalen Atemwege, während in weiter distalen Atemwegen und in der Lungenperipherie bei Typ-1- und Typ-2-Pneumozyten keine induzierbaren Streßproteine nachgewiesen werden konnten (Bonay et al., 1994; Vignola et al., 1995; Wong et al., 1997; Wong et al., 1998). In den Zellen der BALF ist eine HSP-Expression vorrangig auf Alveolarmakrophagen nachweisbar (Kindas-Mugge et al., 1996).

2.6 Reaktive Sauerstoffspezies unter zytoreduktiver Therapie

2.6.1 Chemotherapie

Für eine Vielzahl zytoreduktiver Substanzen ist zwischenzeitlich bekannt, daß teils die zytoreduktive Wirkung, vor allem aber das Nebenwirkungsprofil wesentlich auf die Entstehung freier Radikale zurückzuführen sind und somit die Folgezustände den Schäden nach Strahlentherapie nicht nur gleichen, sondern größtenteils auf den selben Mechanismen beruhen.

In diesem Kontext müssen vor allem Bleomycin (Kanofsky, 1986; Hay et al., 1991), Cyclophosphamid (Patel et al., 1985), Ifosfamid (Issels et al., 1993), Adriamycin (Gille et al., 1997), Etoposid (Koh et al., 1996) und Mitomycin, (Castro et al., 1996), weiterhin auch neuere Substanzen wie z. B die Taxane oder Antimetabolite wie Gemcitabin genannt werden, wobei für zahlreiche Zytostatika diese Wirkungsmechanismen anhand der klinischen Erscheinungsformen der

Pneumonitis oder Fibrosierung naheliegen, wenngleich diese noch nicht im Einzelnen nachgewiesen wurden. Für Platin, das langjährig zur Behandlung solider Tumoren eingesetzt wird, wurde eine pulmonale Toxizität bislang nicht hervorgehoben, es kann aber davon ausgegangen werden, daß in der Kombinationstherapie oxidativer Stress durch das Begleitpräparat potentiell verstärkt wird.

Tabelle 5: Pulmonale Toxizität zytoreduktiver Pharmaka (nach Niedermeyer et al., 1996)

Bleomycin	Hypersensitivitätspneumonitis, ARDS-ähnliches Bild, Pneumonitis, Fibrose
Mitomycin	Hypersensitivitätspneumonitis, Pneumonitis, Fibrose
Doxorubicin	ARDS-ähnliches Bild
Actinomycin D	ARDS-ähnliches Bild
Carmustin	Pneumonitis, Fibrose, ARDS-ähnliches Bild
Busulfan	Pneumonitis, Fibrose
Cyclophosphamid	Pneumonitis, Fibrose
Melphalan	Pneumonitis, Fibrose
Methotrexat	ARDS-ähnliches Bild, Pneumonitis, Fibrose
Azathioprin	Pneumonitis, Fibrose
Cytarabin	ARDS-Bild
Vinblastin	Pneumonitis, Fibrose
Vincristin	Pneumonitis, Fibrose
Vindesin	Pneumonitis, Fibrose
Teniposid	ARDS-ähnliches Bild
Procarbazin	Hypersensitivitätspneumonitis
Taxane	Bronchospasmen

In der Folge werden einige Zytostatika (-Gruppen) beispielhaft besprochen.

2.6.1.1 Bleomycin

Die lungenschädigende Potenz von Bleomycin ist seit Jahrzehnten bekannt. Histologisch sind die hier gefundenen Gewebeveränderungen denen der idiopathischen Lungenfibrose sehr ähnlich, was zur Etablierung einer Reihe von Bleomycin-Tiermodellen auf dem Forschungsgebiet der Lungenfibrose geführt hat (Matalon et al., 1986; Giri et al., 1987; Hay et al., 1987a; Idell et al., 1987; Ward et al., 1987; Filderman et al., 1988). Das zur Familie der Antibiotika zählende Zytostatikum enthält zwei strukturelle Hauptkomponenten, eine Bithiazol-Komponente, die in die DNA-Helix eingebaut wird und hier zu Einzel- wie Doppelstrangbrüchen führt, und eine Komponente mit Pyrimidin- und Imidazolstrukturen. Diese bilden O₂-Fe(II)-Bleomycin-Komplexe, die intrazellulär zur Entstehung von reaktionsfreudigen Hydroxylradikalen führen (Hay et al., 1991). So wurde nachgewiesen, daß in Anwesenheit von Bleomycin Fettsäuren in ihrer Struktur verändert werden und Singlet-Sauerstoff, ein potentes Oxidans, freigesetzt wird (Kanofsky, 1986).

Bleomycin wird durch intrazelluläre Bleomycin-Hydrolasen zum inaktiven Desmethylbleomycin abgebaut. Die ausgeprägte pulmonale Toxizität von Bleomycin wird einerseits durch den hohen intrapulmonalen Sauerstoffpartialdruck, der die Bildung von reaktive Sauerstoffspezies begünstigt, verstärkt, andererseits zeigen die Bleomycin-Hydrolasen intrapulmonal eine relativ niedrige Aktivität (Hay et al., 1987b). Zudem konnten in vitro Experimente an Alveolarmakrophagen und Monozyten des peripheren Blutes von Bleomycin-behandelten Tieren zeigen, daß diese Zellen eine erhöhte Bereitschaft zur Freisetzung von Superoxid-Radikalen besitzen (Slosman et al., 1990). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Alveolarmakrophagen und intrapulmonale monozytäre Zellen wahrscheinlich direkt durch Bleomycin zur Generierung von reaktive Sauerstoffspezies angeregt werden können (Slosman et al., 1990).

2.6.1.2 Cyclophosphamid und Ifosfamid

Die Alkylantien Cyclophosphamid und Ifosfamid besitzen strukturelle Ähnlichkeiten. Beide können zum korrespondierenden 4-Hydroxymetaboliten oxidiert werden und reagieren über mehrere Schritte zu Aldo-Phosphamid und der eigentlich wirksamen Substanz, einem Phosphoramid des Mechlorethamin (Colvin, 1982). Die Lungentoxizität von Ifosfamid, das vermehrt zu Dechloroethyl-Ifosfamide und Chloroacetaldehyd abgebaut wird, ist geringer als bei Cyclophosphamid. Trotz der Wahrscheinlichkeit, daß die Lungentoxizität vorrangig auf die Metabolite der Substanzen zurückgeht, bleibt unklar, ob die beiden Alkylantien oder ihre Metaboliten direkt reaktive Sauerstoffspezies generieren können (Issels et al., 1993; Malik et al., 1996), oder ob ihr pro-oxidativer Effekt indirekt durch Erniedrigung der Glutathion-Pools zustande kommt (Einhorn et al., 1976; Gurtoo et al., 1981; Patel et al., 1985).

2.6.1.3 Anthrazykline

Anthrazykline sind allein in den seltensten Fällen lungentoxisch. Sie sind jedoch in der Lage, die pulmonale Toxizität einer Strahlentherapie zu verstärken. Freie Radikale entstehen, wenn Fe^{3+} oder Cu^{2+} bei Bindung durch Adriamycin reduziert werden. In Anwesenheit der reduzierten Metallionen und Sauerstoff können dann Hydroxylradikale generiert werden (Gianni et al., 1988). Experimentell konnte die enge Assoziation zwischen der Fähigkeit zur Fe^{3+} -Reduktion und der Radikalentstehung gezeigt werden (Gianni et al., 1988; Erhola et al., 1996). Während der Aktivierung kann Adriamycin ein Elektron erhalten und so zum Semicuionon-Radikal werden (Gianni et al., 1988; Gille et al., 1997). Dieses kann in Anwesenheit von Sauerstoff zur Bildung von Superoxid-Radikalen führen (Erhola et al., 1996).

Wie Adriamycin kann auch Mitomycin durch Ein- und Zwei-Elektronen-Reduktion aktiviert werden. Dabei entsteht ein Semiquinon-Radikal oder das korrespondierende Hydroquinon (Krishna et al., 1991), wobei unter hypoxischen Bedingungen der Metabolismus zum Semiquinone dominiert. Die Semiquinone können als potente Alkylantien fungieren. Je nach Anwesenheit von Sauerstoff können diese rasch oxidieren, wobei Superoxid-Radikale und Wasserstoffperoxid generiert werden. Ist der Sauerstoffpartialdruck gering, fällt das Semiquinon vermehrt an und reagiert mit H_2O_2 , wobei Hydroxylradikale entstehen, eine Reaktion, die unabhängig von der Anwesenheit katalytischer Metallionen ist (Belinsky et al., 1993).

2.6.2 Wirkmechanismen ROS-vermittelter Lungenschädigungen unter Chemotherapie

Die Einwirkung von reaktive Sauerstoffspezies auf das Lungenparenchym führt zu strukturellen und funktionellen Veränderungen von Membranlipiden, Proteinen und DNA (Halliwell et al., 1992). Die überwiegende Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche kann durch intrazelluläre Reparatursysteme suffizient repariert werden, während verbleibende DNA-Schäden zu sofortigem oder prolongiertem apoptotischen Interphasenzelltod oder postmitotischen Zelltod führen können (Fuks et al., 1994). Der zelluläre ATP-Gehalt ist bei oxidativem Streß deutlich erniedrigt (Cochrane, 1991). Hierdurch überwiegt die nekrotische Degeneration der geschädigten Zellen mit nachfolgender entzündlicher Abräumreaktion (Lelli et al., 1998). Membrantransportproteine können durch freie Radikale in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Das führt unter anderem zu gesteigerten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen mit Aktivierung von Phospholipasen, Endonukleasen und Proteasen mit nachfolgenden Veränderungen am Zytoskelett (Cochrane, 1991).

Die frühe Phase nach ROS-induzierter Schädigung wird durch Interaktionen ortsständiger Zellenpopulationen wie Alveolarmakrophagen, Fibroblasten, Endothelien und Epithelien gekennzeichnet. Alveolarmakrophagen sind in der Lage, eine breite Palette von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu sezernieren, u.a. TNF-alpha, IL-6, IL-8 und IL-1 (Gossart et al., 1996).

IL-1 besitzt erhebliche Bedeutung für die T-Zellaktivierung und Induktion weiterer Elemente der Zytokinkaskade und scheint ein wichtiger Faktor der initialen Entzündungsphase zu sein. Die relativ geringe Fähigkeit der Alveolarmakrophagen, ihre IL-1-beta-Sekretion zu steigern (Elias et al., 1985; Wewers et al., 1989; Sagone et al., 1989), setzt möglicherweise einen Influx von peripheren Blutmonozyten voraus, um bestimmte IL-1beta-Spiegel zu erreichen (Rochester et al., 1993). Nach *in vitro* Bestrahlung von Alveolarmakrophagen konnte das limitierte Vermögen zur IL-1-Sekretion beobachtet werden (O'Brien-Ladner et al., 1993). In Tiermodellen zur Lungenfibrose wurde deutlich, daß erst nach einer Latenzphase von etwa zwei Wochen die Sekretion dieses Zytokins erheblich anstieg (Rubin et al., 1995).

Der Influx von polymorphkernigen Neutrophilen wird wesentlich von IL-8, IL-1, TNF, aktiviertem Komplement und als Folge der Lipidperoxidation entstandenem 4-Hydroxynonenal (4-HNE) gesteuert. Dies ist auch teilweise Folge der IL-1- und TNF-getriggerten Expression von

Adhäsionsmolekülen (intracellular cell adhesion molecule-1, endothelial leukocyte adhesion molecule-1) (Yonemaru et al., 1989). So steigern sie die Adhärenz der Leukozyten an endotheliale Zellen und unterstützen die Diapedese (Gozin et al., 1998). IL-2, das unter oxidativem Stress von T-Lymphozyten sezerniert wird, führt bei Fibroblasten zur vermehrten Expression von Monozyten-Chemoattraktant-Protein 1 (Tatla et al., 1999). Weiterhin scheint es unter akuter Lungenschädigung zu einer IL-2 vermittelten T-Zell Aktivierung zu kommen, die in eine gegen pulmonale Fibroblasten gerichtete Zytotoxizität mündet (Zambello et al., 1996).

PMN-Zellen sind in der Lage, aggressive ROS-Verbindungen, die für die Abwehr von Mikroorganismen unerlässlich sind, an ihre Umgebung abzugeben (Maly, 1988; Yonemaru et al., 1989).

Die Seitenketten von Membranphospholipiden sind besonders anfällig für radikalbedingte Veränderungen. In typischen Kettenreaktionen kann ein OH^* hier zur Entstehung hunderter von Peroxiden sowie Aldehydverbindungen wie Malonaldehyd (MDA) und HNE führen (Pryor et al., 1996). In in-vitro-Versuchen erwies sich HNE als Verstärker der Kollagen-I-Synthese (Parola et al., 1993; Poli et al., 1997a). Dies erklärt sich möglicherweise durch die Fähigkeit dieser Verbindung, humane mononukleäre Zellen zur Sekretion von TGF-beta anzuregen. TGF-beta kann selbst, über die Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors, zur Steigerung der Kollagenexpression führen (Poli et al., 1997). Außerdem sind HNE und einige seiner homologen Aldehyde in der Lage, chemotaktisch auf PMN-Zellen zu wirken (Curzio et al., 1985; Curzio, 1988; Adkins et al., 1990; Iacobini et al., 1997).

Somit führt die primäre wie sekundäre Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies unter Chemotherapie zu einer Vielzahl von funktionellen und dann auch strukturellen Veränderungen des Lungenparenchyms. Über eine proinflammatorische Zytokinkaskade, die in der Fibroblastenaktivierung münden kann, entstehen dann klinische Bilder der Pneumonitis oder Lungenfibrose, wie sie auch unter Strahlentherapie gesehen werden (s.u.).

2.6.3 Strahlentherapie

2.6.3.1 Wirkmechanismus

Die zytoreduktive Wirkung der Strahlentherapie im Gewebe beruht größtenteils auf der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Ionisierende Strahlung führt zur homolytischen Spaltung der kovalenten Bindungen zwischen Sauerstoff und Wasserstoff. Dabei entstehen je ein Wasserstoffradikal (H^*) und ein hochreaktives Hydroxylradikal (OH^*), die Grundlage für die zytotoxische Wirkung der Strahlentherapie wie ihrer unspezifischen Gewebetoxizität sind (Halliwell, 1991). Die Wirkung ist in Kombination mit zahlreichen Chemotherapeutika, die selbst zur Generierung von reaktive Sauerstoffspezies führen, verstärkt bzw., wie etwa unter gleichzeitiger Gabe von Bleomycin, potenziert (Einhorn et al., 1976).

2.6.3.2 Pulmonale Toxizität

Nach Einwirkung von ionisierender Strahlung auf die Lunge können zwei verschiedene Nebenwirkungsmechanismen unterschieden werden, die beide durch den massiven Untergang von Epithel- und Endothelzellen sowie durch direkte oxidantienvermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren induziert werden. Die sogenannte klassische Strahlenpneumonitis (Morgan et al., 1995; Segawa et al., 1997; Yamada et al., 1998; Monson et al., 1998) zeigt eine charakteristische sigmoide Dosis-Inzidenz-Beziehung. Dabei beschränkt sich die entzündliche Reaktion auf das bestrahlte Lungenvolumen und wird von einer mehr oder weniger starken Fibrosierung des Lungenparenchyms gefolgt (Mattson et al., 1987; Vergara et al., 1987; Arriagada et al., 1989; Geara et al., 1998). Die sogenannte sporadische oder hypersensitive Pneumonitis (Gibson et al., 1988) entspricht keiner eindeutigen Dosis-Inzidenz-Beziehung (Denis et al., 1991) und kann auch nach Gabe von Chemotherapeutika auftreten (Schnabel et al., 1997). Ursache dieser Reaktion ist möglicherweise eine endogene Antigenbelastung, die im Rahmen der massiven unspezifischen Gewebsschädigung auftritt. Hier wird eine generalisierte, lymphozytäre Entzündung mit eher geringer Tendenz zur Fibrosierung beobachtet (Vergara et al., 1987; Zwick et al., 1991; De et al., 1995; Monson et al., 1998).

Morphologische Studien zeigen bereits innerhalb der ersten Woche nach Bestrahlungsbeginn eine vermehrte Leukozytendichte in den interstitiellen Kapillaren der Lunge. Wenig später treten große Teile dieser Population in das Interstitium über, so daß die Leukozytendichte hier ebenfalls ansteigt (Ward et al., 1993). Typ-1- und Typ-2-Pneumozyten zeigen frühzeitig degenerative Veränderungen, wobei insbesondere Typ-1-Pneumozyten nach Bestrahlung (Vergara et al., 1987) (wie auch nach Bleomycin- (Jones et al., 1978) oder Ifosfamidgabe (Barnett, 1982)) zahlenmäßig stark vermindert sind. Die freiliegenden Basalmembranen erscheinen geschwollen und verdickt. Einige Monate nach Bestrahlung erfolgt als Zeichen der protrahierten Gewebeschädigung eine weitere Verminderung der Typ-1-Pneumozyten (Vergara et al., 1987, während Typ-2-Pneumozyten fokale Hyperplasien (Guerry-Force et al., 1988) und stark vergrößerte Zellvolumina zeigen (Vergara et al., 1987). Im Epithelgefüge tauchen kubische Zellen auf, die noch nicht vollständig zu Typ-1-Pneumozyten ausdifferenzierte Abkömmlinge von Typ-2-Zellen sind (Guerry-Force et al., 1988). In der Folge kann es klinisch zu dem Bild der Pneumonitis oder der Lungenfibrose kommen (Mattson et al., 1987; Gibson et al., 1988; Lingos et al., 1991; Rosiello et al., 1993).

Frühere Studien postulierten eine Latenzzeit zwischen zytoreduktiver Therapie und der klinischen Manifestation von therapieassoziierten pulmonalen Folgeschäden (Rubin et al., 1992). Neuere Untersuchungen zeigen hingegen, daß bereits unter Therapie erhöhte Zytokinspiegel in der BALF nachweisbar sind, die lange vor Auftreten der ersten klinischen Symptome kaskadenartig in Spätschäden der Lunge einmünden. Dieser Prozeß setzt initial eine Strukturstörung oder Unterbrechung der Kontinuität der Basalmembran der Alveolarwandung voraus und unterliegt einer komplexen Zytokinregulation sowie Steuerung durch Adhäsionsmoleküle (Rosiello et al., 1993; Rubin et al., 1995)

2.6.4 Klinische Bilder pulmonaler Toxizität unter zytoreduktiver Therapie

2.6.4.1 Pneumonitis

In Folge der antineoplastischen Therapie kann es nach einigen Wochen bis Monaten zu Dyspnoe, Reizhusten, Fieber und Abgeschlagenheit kommen. Diese unspezifische, relativ spät einsetzende, aber oft im weiteren Verlauf vital gefährdende klinische Manifestation therapieassoziiierter Lungenschäden entzieht sich vor ihrer klinischen Manifestation der konventionellen Diagnostik (Lungenfunktion, Bildgebung), ist häufig irreversibel und nicht selten letal. Bei fulminanten Verläufen findet sich nach Auftreten der ersten Symptome eine rasch progrediente Diffusionsbeeinträchtigung (Marks et al., 1997) und ein Ventilations-Perfusions-Mismatch (Rawlinson et al., 1988; Botterman et al., 1990). Daneben führt eine zunehmende Ansammlung von extrazellulärer Matrix (ECM) in den Alveoli und im Interstitium zu obstruierten und funktionslosen terminalen Ventilationsräumen. Diese Zunahmen des ventilatorischen Totraums und des intrapulmonalen Shunt-Volumens verstärken die resultierende Hypoxämie weiter und führen zur respiratorischen Partial- und dann Globalinsuffizienz (Rosiello et al., 1990; Porembka et al., 1993).

Die nach längeren Latenzzeiten beschriebene sogenannte Late-Onset Pneumonitis tritt zumeist nach Chemotherapiegabe auf und scheint vorrangig durch ein Ungleichgewicht zwischen pulmonalen Oxidantien und Antioxidantien bedingt zu sein (Rosiello et al., 1990). Eine wirksame Therapie ist bislang nicht bekannt. So kommt es trotz systemischen Einsatzes von Kortikosteroiden häufig zu einer kontinuierlichen dramatischen Verschlechterung der respiratorischen Situation dieser Patienten mit im Verlauf progredienter und irreversibler Fibrosierung (Tucker et al., 1977; Mark et al., 1978; Malik et al., 1996).

2.6.4.2 Lungenfibrose

Patienten mit beginnender Lungenfibrosierung infolge zytoreduktiver Therapie fallen typischerweise nach 6-12 Wochen durch Reizhusten und zunehmende Dyspnoe auf (Koh et al., 1996), Symptome, die über Monate zur respiratorischen Insuffizienz und schließlich zum Cor pulmonale mit akutem Rechtsherzversagen führen können (Malik et al., 1996).

Thorax-Röntgen und Thorax-CT zeigen je nach Schwere ein inhomogene milchglasartige Trübung des bestrahlten Parenchyms bis hin zu dichten retikulären und nodulären, fibrotischen Infiltraten mit Pleuraverdickungen (Gross, 1977; Mattson et al., 1987). Diese radiologischen Befunde können jedoch erst zu einem relativ späten Zeitpunkt erhoben werden, wenn der entzündliche Prozeß bereits ein florides, irreversibles Stadium erreicht hat (Rubin et al., 1995).

Infolge der Strahlentherapie-induzierten Gewebeschädigung werden neben einer massiven Erhöhung der Totraumventilation und damit Ansteigen des Shuntvolumens ausgedehnte Epithelläsionen mit intraalveolären Fibrinansammlungen beobachtet, die zu einer schweren Diffusionsstörung führen.

3 Fragestellung

Bei Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom ist die Chemotherapie oder Radio-Chemotherapie die Methode der Wahl. Diese Therapie folgt einer Dosis-Wirkungs-Beziehung und ist vorrangig durch eine pulmonale Toxizität begrenzt, deren klinische Erscheinungsform durch das Bild einer interstitiellen Lungenerkrankung als Pneumonitis und Lungenfibrose gekennzeichnet ist. Bislang wurde dieses Toxizitätsprofil angesichts der begrenzten Lebenserwartung der Patienten als nicht im Vordergrund stehend hingenommen. Zwischenzeitlich erfolgte jedoch für diese Patienten eine Neubewertung der Therapieziele, wodurch die Untersuchung von Akut- wie Spätfolgen der Therapie vermehrt in den Vordergrund gerückt wurde. Diese Neubewertung der Therapieziele gründet sich auf zwei Entwicklungen:

1. Neue multimodale Therapieansätze des Bronchialkarzinoms mit verbesserter Tumorkontrolle und verlängerten Überlebenszeiten beziehen auch im palliativen Therapieansatz qualitative Endpunkte mit ein, die neben der akuten Beherrschung tumorassoziierter Symptomatik auch auf die **nach** einer (Radio-) Chemotherapie erreichbaren Lebensqualität zielen.
2. Dosisintensivierten Therapiekonzepte, die insbesondere für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Bronchialkarzinom neue prognostische Optionen eröffnen, wurden in bisherigen Dosisfindungsstudien vorzugsweise an allgemein-klinischen Toxizitätskriterien evaluiert. Neuere Konzepte mit sequentieller oder auch simultanen Anwendung von Strahlen- und Chemotherapie führen jedoch vermehrt zu einer pulmonalen Toxizität, die in eine grundsätzlich lebensbedrohliche interstitielle Lungenerkrankung (Pneumonitis, Fibrose) münden kann.

Spezifische Untersuchungen zur Genese der Lungentoxizität und ihrer individuellen Ausprägung unter zytoreduktiver Therapie fehlen bislang weitgehend. Ein Verständnis der intrapulmonalen Pathomechanismen könnten einerseits die (individuelle) Adjustierung der therapeutischen Dosierung unterstützen und andererseits neue Optionen zur Modulation und Begrenzung der toxischen Therapiefolgen eröffnen.

Das in der vorliegenden Arbeit angestrebte Verständnis der therapieassoziierten Lungentoxizität geht von einer möglichen grundsätzlich gemeinsamen Pathogenese der interstitiellen Lungenerkrankungen aus. Neuere zellbiologische und biochemischen Daten zur idiopathischen Lungenfibrose weisen als wesentliches Charakteristikum auf eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und ein hierdurch induziertes Ungleichgewicht des intrapulmonalen Oxidantien-Antioxidantien-Gleichgewichtes hin. Diese Hypothesen stimmen mit über die letzten Jahre in den Vordergrund gerückten Vorstellungen überein, daß die Toxizität einer Radio-Chemotherapie

ebenfalls durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies vermittelt ist. Diese Ergebnisse sind jedoch bislang fast ausnahmslos am Tier sowie *in vitro* gewonnen worden und noch nicht ausreichend, um auf den individuellen Patienten und seine Suszeptibilität gegenüber therapieassoziierten Schäden übertragen zu werden.

Folgt man der oben genannten Analogiebildung zwischen den interstitiellen Lungenerkrankungen, so können die in der Forschung zur Lungenfibrose erkannten zellulären und biochemischen Prozesse als Leitfaden zum Verständnis der therapieassoziierten pulmonalen Schäden bei Tumorpatienten dienen.

Die vorliegende Arbeit formuliert hieraus die These, daß für die Lungenschäden unter Radio-Chemotherapie vorrangig reaktive Sauerstoffspezies verantwortlich sind, die unmittelbar nach Induktion des Lungentraumas zu einer Zytokinkaskade führen, die sich perpetuiert und schließlich zur reversiblen oder auch irreversiblen pulmonalen Parenchymveränderung führt.

Zur Überprüfung dieser These wurden 228 Lavagen von 170 konsekutiven Patienten mit Bronchialkarzinom unter oder nach zytoreduktiver Therapie und vergleichend 33 Lavagen von 29 Patienten ohne Therapie untersucht. Anhand der Analyse bronchoalveolärer Lavageproben, die zu verschiedenen Zeitpunkten unter sowie nach zytoreduktiver Therapie gewonnen wurden, wurde eine Kinetik der durch reaktive Sauerstoffspezies induzierten pulmonalen Toxizität beschrieben.

Hierbei wurde Glutathion, das als antioxidativer Schutzmechanismus der Lunge eine Sonderrolle spielt, und unter physiologischen Bedingungen in relativ hohe Konzentration in reduzierter Form im epithelialen Flüssigkeitsfilm der Alveolen vorliegt, in seiner oxidierten und reduzierten Form gemessen. Dieses Verhältnis gibt Aufschluß über den Funktionszustand des Glutathionmetabolismus und damit über die antioxidative Wirksamkeit des pulmonalen Glutathionsystems.

Wird die antioxidative Kapazität der Lunge überschritten, kommt es u.a. zur Oxidation und Inaktivierung von Proteinen. Diese Überschreitung der antioxidativen Kapazität wurde durch die Messung des Anteiles von oxidierten Methioninresten als direkte Folge der oxidativen Belastung gemessen. Methionin, ein ubiquitäres Protein, sitzt u.a. im aktiven Zentrum von alpha-1-Antitrypsin, dessen Antiproteasenfunktion bei Oxidation des Methioninrestes inaktiviert wird.

Zudem wurden die zellulären Bestandteile der Lavageflüssigkeit, Parameter der Zytokinkaskade (wie TNF-alpha, IL-1, IL-6, u.s.w.) und Aspekte der Bindegewebsaktivierung (Laminin, Prokollagen-III-Peptid, Wachstumsfaktoren, u.s.w.) als Verlaufparameter der durch die zytoreduktive Therapie induzierten zytologischen und biochemischen pulmonalen Veränderungen charakterisiert.

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, die Grundlagen für eine individuelle Modulation der oxidativen pulmonalen Toxizität unter intensivierten multimodalen Therapien mit gleichzeitiger Radio-Chemotherapie (durch frühzeitige Dosislimitierung und/oder Verbesserung der antioxidativen Lungenkapazität) zu bieten. Sie definiert mögliche Meßgrößen der akuten oxidativen pulmonalen Belastung und ihre Bedeutung im weiteren Krankheitsverlauf. Dies soll zukünftig, entsprechend einer großen interindividuellen Schwankungsbreite antioxidativer pulmonaler Kompensationsmechanismen, ein optimiertes Verhältnis von zytoreduktiver Effektivität und erreichbarer Lebensqualität bei Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom sichern.

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

4.1.1 Einteilung in die Therapiegruppen

Untersucht wurden 261 Proben von 199 Patienten mit überwiegend lokal fortgeschrittenem, funktionell oder prospektiv nicht operablem Bronchialkarzinom. Die Bronchoskopie erfolgte in Gruppe 1 zur Diagnostik im Rahmen des Tumorstagings, in allen übrigen Gruppen zur Remissionskontrolle unter oder nach zytoreduktiver Therapie. Die Patienten wurden in folgende Gruppen unterteilt:

- Gruppe 1 Patienten mit Bronchialkarzinom, vor Therapie
- Gruppe 2 Patienten unter laufender Chemotherapie
- Gruppe 3 Patienten bis 2,5 Monate nach Chemotherapie
- Gruppe 4 Patienten 2,5 - 15 Monate nach Chemotherapie
- Gruppe 5 Patienten mehr als 15 Monate nach Chemotherapie
- Gruppe 6 Patienten unter laufender Radiotherapie
- Gruppe 7 Patienten bis 2,5 Monate nach Radiotherapie
- Gruppe 8 Patienten 2,5 - 15 Monate nach Radiotherapie
- Gruppe 9 Patienten mehr als 15 Monate nach Radiotherapie
- Gruppe 10 Patienten unter erneuter Chemotherapie, nach Radiotherapie
- Gruppe 11 Patienten in kompletter Remission, nach mindestens 2 Jahre zurückliegender Operation mit nachfolgender Radiotherapie.

Gruppe 1

Patienten, die mit dem Verdacht einer Raumforderung im Bereich der Lunge vorgestellt wurden, erhielten im Rahmen der stationären Abklärung eine Bronchoskopie, wobei auch eine Lavage gewonnen wurde. Zur weiteren Analyse gelangten nur Proben, bei denen histologisch anhand einer Tumorbiopsie (exophytisch wachsend oder durch transbronchiale Biopsie unter Bildwandler) oder zytologisch (Feinnadelbiopsie oder Bürstenabstrich) ein kleinzelliges oder nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom nachgewiesen wurde.

Gruppe 2

Diese Gruppe enthält Patienten, die unter einer laufenden Chemotherapie bei überwiegend metastasiertem Tumorwachstum zur Remissionskontrolle untersucht wurden. Hierbei waren mindestens 2 Zytostatika-Gaben des ersten Therapiezyklus bereits verabreicht worden (im Mittel 2,6 Zyklen entsprechend).

Hierbei wurden zur Therapie des Bronchialkarzinoms (NSCLC und SCLC) die folgenden üblichen Zytostatikakombinationen eingesetzt:

Tabelle 6: Verwendete Chemotherapiekombinationen zur Behandlung des Bronchialkarzinoms

Platinbasierte Kombinations-Chemotherapien:

Gemcitabin / Cisplatin
Mitomycin C / Ifosfamid / Cisplatin
Etoposid / Vinorelbin / Carboplatin
Paclitaxel / Carboplatin
Adriamycin / Vinblastin / Carboplatin
Ifosfamid / Etoposid / Carboplatin
Ifosfamid / Carboplatin

Nicht platinbasierte Kombinations-Chemotherapien

Vindesin / Mitomycin
Gemcitabin / Vindesin
Ifosfamid / Etoposid
Cyclophosphamid / Etoposid

Mono-Chemotherapien

Paclitaxel
Trofosfamid
Etoposid oral

Eine Chemotherapie gilt nach dem letzten verabreichten Zyklus für den Zeitraum, der bis zu Beginn eines neuen Zyklus vergangen wäre, noch als fortdauernd, auch wenn dieser Zeit keine weitere Therapie verabreicht wird (zumeist 4 Wochen).

Gruppe 3, 4 und 5

Patienten, die nach einer Chemotherapie lavagiert wurden, teilen sich entsprechend dem Zeitpunkt in drei Gruppen auf: Patienten der Gruppe 3 wurden frühestens nach einer Zykluslänge (zumeist 4 Wochen) nach der letzten Therapiegabe und spätestens 2,5 Monate nach Beendigung der Chemotherapie untersucht. Gruppe 4 wurde in der Zeitspanne zwischen 2,5 und 15 Monaten untersucht. Gruppe 5 umfaßt Patienten, die später als 15 Monate nach Ende der Chemotherapie im Rahmen einer Kontrolluntersuchung lavagiert wurden.

Gruppe 6, 7, 8 und 9

In diese Gruppen wurden Patienten eingeschlossen, die entweder konsolidierend nach erfolgreicher vorangegangener Chemotherapie (partielle (PR) oder komplette Remission (CR), oder bei unter Chemotherapie progredientem lokalem Tumorwachstum (PD) strahlentherapiert wurden, weiterhin . Somit ging allen Bestrahlungen eine Chemotherapie voraus.

Die Strahlentherapie erfolgte bei allen Patienten konventionell fraktioniert in Einzeldosen von 2-3 Gy pro die in 5 Gaben pro Woche mit einer thorakalen Gesamtdosis von 56 bis 62 Gy.

Die Gruppenzuordnung folgt dem Zeitschema wie bei den Gruppen 2 bis 5 (nach Chemotherapie):

Gruppe 6:

Die Untersuchung erfolgte unter einer konventionell fraktionierten Radiotherapie der Thoraxorgane, wobei der Beginn der Therapie länger als eine Woche zurücklag. Die Lavage wurde jeweils im bestrahlten Lungengebiet durchgeführt.

Gruppe 7:

Die Untersuchung lag mindestens 4 Wochen nach Strahlentherapie bis maximal 2,5 Monate zurück.

Gruppe 8:

Diese Patienten wurden im Zeitraum zwischen 2,5 Monaten und 15 Monaten untersucht.

Gruppe 9:

Die Strahlentherapie lag mindestens 15 Monate zurück.

Gruppe 10:

Diese Patientengruppe wurde bei Stadium III primär einer Radiotherapie unterzogen und bei Tumorprogression oder Tumorrezidiv mit einer Chemotherapie behandelt. Die Indikation zur Chemotherapie ergab sich in 4 Patienten bei Lokalrezidiv, bei 5 Patienten bei metastasiertem Tumorwachstum.

Gruppe 11:

Patienten, die im Rahmen einer Kontrolluntersuchung nach operativer Entfernung eines Bronchialkarzinoms zu einer Kontrolluntersuchung kamen, wurden in die Untersuchung eingeschlossen, sofern die Operation und die (in allen Fällen adjuvant durchgeführte) Strahlentherapie vor mindestens 2 Jahren abgeschlossen wurde, und sofern die aktuelle Untersuchung keinen Verdacht auf erneutes Tumorwachstum erbrachte (Langzeitremission), weiterhin weder klinisch noch lungenfunktionsanalytisch der Verdacht auf das Bestehen einer Lungenfibrosierung bestand.

4.1.2 Tumorhistologie

193 Proben, entsprechend 74%, stammten von Patienten mit nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom, 68 Proben, entsprechend 26%, von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Die Gruppe der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome umfaßte folgende histomorphologische Diagnosen: Plattenepithelkarzinom: 84 Fälle, entsprechend 32%, Adenokarzinom: 81 Fälle, entsprechend 31%, großzellige Karzinome, 29 Fälle, entsprechend 11% der Proben.

4.1.3 Aufteilung der Lavage-Proben auf die Patientengruppen

Bei 261 Proben von insgesamt 199 Patienten entspricht dies einem Mehrfachuntersuchungsfaktor von 1,3. Dieser verteilt sich auf die Patienten-Gruppen ähnlich (Kruskal-Wallis-Test).

Tabelle 7: Charakteristika der Patienten bezogen auf die Gruppen der analysierten Proben

Gruppe	Patienten	Proben	m/w /Proben	SCLC/NSCLC /Proben
1	9	9	7/2	0/9
2	41	45	31/14	13/32
3	10	10	7/3	2/8
4	13	19	12/7	4/15
5	12	19	14/5	4/15
6	4	4	4/0	1/3
7	14	15	12/3	10/5
8	42	54	41/13	13/41
9	35	44	32/12	12/32
10	9	9	6/3	3/7
11	29	33	25/8	11/22

Die Auswertung der Proben wurde bezogen auf die Anzahl der Proben.

Dieses Verfahren wurde aus zwei Gründen gewählt:

1. Bezogen auf das Setting konsekutiver Patienten bei Mehrfachmessungen steht innerhalb einer Gruppe (z. B. wiederholte Kontroll-Bronchoskopie bei kompletter Remission) kein geeignetes Auswahlverfahren zur Verfügung, welche BALF pro Patient zur Analyse kommt,
2. wurde vorausgesetzt, daß die gemessenen Parameter stärker von der Gruppenzugehörigkeit (z.B. Status vor oder unter Chemotherapie) als intrasubjektiv beeinflusst sind.

4.1.4 Remissionskriterien

Die Beurteilung der Tumorremission unter zytoreduktiver Therapie erfolgt gemäß den gültigen WHO-Kriterien (1979):

Der Tumor wird in zwei Dimensionen über den größten Durchmesser sowie im rechten Winkel hierzu ausgemessen.

Komplette Remission (CR): Verschwinden des vorhandenen Tumors, Bestätigung anhand einer Kontrolluntersuchung im Abstand von mindestens 4 Wochen.

Partielle Remission (PR): Mindestens 50%ige Verkleinerung der geometrischen Gesamttumorgröße des Tumors für mindestens 4 Wochen. Weiterhin dürfen keine neuen Gewebeveränderungen entstanden und keine Anzeichen für eine Progression bereits bestehender Gewebeveränderungen vorhanden sein.

Stable Disease (SD): Es ist weder eine 50%ige Verkleinerung der geometrischen Gesamttumorgröße noch eine 25%ige Größenzunahme einer oder mehrerer meßbarer Gewebeläsionen nachweisbar, und es besteht kein Anzeichen für das Auftreten einer neuen Läsion.

Progression (PD): Zunahme der Größe mindestens einer meßbaren Gewebeläsion um mindestens 25% oder Entstehung neuer Gewebeläsionen.

Die Dauer der partiellen Remission ist definiert als der Zeitraum ab der ersten Gabe der Chemotherapie bis zum Zeitpunkt des dokumentierten Beginns der Progression. Die Dauer der kompletten Remission ist definiert als Zeitraum ab dokumentiertem Beginn der kompletten

Remission bis zum Zeitpunkt, an dem die Krankheitsprogression erstmalig beobachtet wird.

4.2 Bronchoalveolären Lavage (BAL)

4.2.1 Prinzip der BAL

Die bronchoalveoläre Lavage wird durch Einspülen und anschließendes Absaugen von Flüssigkeit über das flexible Fiberglas-Bronchoskop gewonnen. Die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF), ist ein Gemisch aus dem dünnen Flüssigkeitsfilm, der den die peripheren Bronchien und Alveolen auskleidenden Epithelien aufliegt (epithelial lining fluid, ELF), und dem zurückgewonnenen Anteil des eingespülten Mediums. Die ELF ist anatomisch dem Interstitium unmittelbar benachbart. Das in der ELF enthaltene Zellbild und die in ihr gelösten Mediatoren spiegeln somit nicht nur das Milieu interne des Alveolarraumes, sondern auch das des Interstitiums mit seinen zellulären Komponenten wider.

Da der durch die Lavage angespülte Alveolarbereich eine etwa 100mal größere Oberfläche als die durch die Lavage ausgewaschenen Anteile des Bronchialbaums aufweist, entsprechen die durch die BAL gewonnenen zellulären und humoralen Anteile der Peripherie des lavagierten Lungensegments, wobei die Bronchialanteile zu vernachlässigen sind (Crystal et al., 1986).

4.2.2 Durchführung der BAL

Voraussetzung für die klinische Sicherheit der Durchführbarkeit der bronchoalveolären Lavage ist ein ausführlicher internistisch-pneumologischer Status des Patienten. Dieser wird anamnestisch, durch die körperliche Untersuchung und durch Erhebung lungenfunktionsanalytischer Parameter wie Vitalkapazität und Atemwegwiderstand sowie einer Blutgasanalyse in Ruhe erhoben. Die Bronchoskopie erfolgt unter Sauerstoffgabe über eine Nasensonde.

Der Patient ist während der Bronchoskopie wach und befindet sich in einer halb sitzenden Position. Angeschlossen ist ein EKG-Monitor. Die Einführung des Bronchoskops erfolgt nach einer ausführlichen Lokalanästhesie, die durch Verneblung sowie einer Applikation unter Sicht durch das Bronchoskop von insgesamt 10 ml einer 1%igen Lösung von Oxybuprocain-Hydrochlorid erfolgt. Prämedizierend wird zur Vagolyse 0,5 mg Atropinsulfat intravenös sowie 7,5 mg Hydrocodon subkutan appliziert. Zur Bronchoskopie werden Geräte der Fa Olympus (D-Hamburg) eingesetzt. Das Bronchoskop wird unter Sicht in das Bronchialsystem eingeführt. Zunächst erfolgt eine komplette Inspektion unter besonderer Berücksichtigung der Tumorkalisation. Anschließend wird im Bereich des Mittellappens oder der Oberlappen der jeweils nicht tumorbefallenen Lunge das Bronchialsystem mit dem Gerät auf Niveau des Subbronchus atraumatisch verschlossen. In dieser Verschlussposition wird die bronchoalveoläre Lavage mit 100 ml isotoner pyrogenfreier Kochsalzlösung in einer Konzentration von 0,9% in 5 aufeinander folgenden Portionen zu je 20 ml durchgeführt. Die Instillation des Spülmediums erfolgt unter Raumtemperatur, wobei zur Rückgewinnung der eingespülten Flüssigkeit ein Zeitraum von 20 Sekunden nicht überschritten wird.

Alle bronchoalveolären Lavagen wurden in der Lungenklinik Treuenbrietzen, Akademisches

Lehrkrankenhaus der Charité, Abteilung für Onkologie und Bronchologie, Chefärztin Frau Dr. med. C. Oehm, durchgeführt.

4.2.3 Aufbereitung der Proben

Alle Proben wurden innerhalb von längstens 4 Stunden in das Labor verbracht und aufgearbeitet, wobei in dieser Zeit die Proben bei Raumtemperatur belassen werden.

Die Lavage wurde zunächst durch sterile Gaze gegeben, um Schleimbeimengungen abzufiltrieren. BALF-Proben mit makroskopischen Blutbeimengungen wurden verworfen. Anschließend wurde die Flüssigkeitsmenge in einem sterilen Zylinder gemessen und damit der Anteil der bei der BAL zurückgewonnenen Spülflüssigkeit (Recovery) bestimmt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation bei 800 g über 10 min. Der Überstand wurde dekantiert und in Aliquots zu 2 ml aufgeteilt. Diese wurden bei - 80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Das nach der Dekantierung zurückgebliebene Zell-Pallet wurde mit 1 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurde mit einem Coulter Counter (Fa Coulter Immunotech, D-Krefeld) in einer 5 µl-Probe die Zellzahl bestimmt.

4.2.4 Zytologische Untersuchungen

4.2.4.1 Anfertigung der Zytozentrifugenpräparate

Je 100 µl der BALF-Zellsuspension wurden in Zentrifugenkammern (Shandon GmbH, D-Frankfurt) gegeben. Diese wurden mit Filterpapier und Objektträgern in eine Zytozentrifuge eingespannt (Shandon GmbH, D-Frankfurt). Nach 5 min Zentrifugieren bei 600 g wurden die Präparate über 24 Stunden an der Luft getrocknet.

4.2.4.1.1 Zytologische Färbungen

Die Zelldifferenzierung am Präparat erfolgte anhand der Pappenheim-Färbung, die als panoptische Färbemethode die Differenzierung von Zellelementen wie Kernstrukturen, Zytoplasma und Granula erlaubt. Die Färbung wurde an den luftgetrockneten Präparaten durchgeführt. Sie wurden über 4 min mit May-Grünwald-Lösung (Merck, D-Darmstadt) in einer Färbeküvette inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 2 min mit Aqua dest. gewaschen und für 15 min in der 1:20 mit Aqua dest. verdünnten Giemsa-Lösung (Merck, D-Darmstadt) gefärbt. Die Einbettung der Präparate erfolgte mit Glycergel als Einschlußmedium (Dako Diagnostika GmbH, D-Hamburg).

Lichtmikroskopische Auswertung:

Es wurden 300 Zellen lichtmikroskopisch differenziert (Alveolarmakrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten).

4.2.4.2 Vitalitätsnachweis der Zellen

Der Nachweis der Zellvitalität beruht auf der Trypan-Blau-Methode. 2 %ige wässrige Trypan-Blaulösung (Fluka AG, D-Neu-Ulm). Nach Mischung mit 1,8% NaCl Lösung zu einer isotonen Lösung wurde ein Tropfen der BALF-Zellsuspension mit einem Tropfen der Lösung durchmischt. Lichtmikroskopisch stellen sich die avitalen Zellen blau angefärbt dar, deren relativer Anteil in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt wurde.

4.2.4.3 Immunophänotypisierung der BALF-Lymphozyten

Die Lymphozytensubpopulationen wurden durchflußzytometrisch an einem FACS-Sorter (Becton Dickinson, D-Heidelberg) mit Argon Laser und Fluorescein-Isothiozyanat/Phycoerythrin (FITC/PE) Filtersatz analysiert, einer Wellenlänge von 488 nm (Grünfluoreszenz) und 595 ± 30 nm (Rotfluoreszenz) entsprechend. Pro Markierung wird die Messung aller Parameter an 1×10^6 Zellen mit einer Flußrate von 150 Ereignissen/Sekunde durchgeführt. Alle Rohdatensätze wurden auf Datenträger gespeichert.

Die Differenzierung der durchflußzytometrisch erfaßten Zellen erfolgte über die unterschiedlichen Eigenschaften der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und der Zellgranularität (Seitwärtsstreulicht). Aufgrund dieser beiden Parameter ist es möglich, Leukozytenpopulationen wie Lymphozyten, Monozyten und die neutrophilen Granulozyten zu identifizieren und voneinander abzugrenzen.

Das von den optischen Filtern getrennte Licht wird zur Analyse auf die Detektoren geleitet. Diese wandeln das Licht in elektrische Impulse um, wobei die Höhe des erzeugten Impulses mit der Stärke des Lichtsignals korreliert. Gleichzeitig verstärken die Detektoren das optische Primärsignal über eine Photonenkaskade. Die elektrischen Impulse der Detektoren werden elektronisch nachverstärkt, digitalisiert und über eine Spezial-Software graphisch als Histogramm dargestellt.

Im Histogramm kann eine beliebige Zellpopulation graphisch ausgewählt werden, indem sie achsenparallel durch eine horizontale und vertikale Linie oder über eine mit der Maus frei definierte Fläche von den übrigen Scatter-Punkten abgetrennt wird. Dieser Vorgang, das sogenannte Gaten, erlaubt die Selektion definierter Subpopulationen zur weiteren Analyse mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper.

Das Fluoreszenzverhalten der Zellen wird anschließend über die Software zur graphischen Darstellung angewählt, wobei auf der x-Achse die Intensität des FITC-Farbstoffes, auf der y-Achse die Intensität des PE-Farbstoffes angezeigt wird.

Die dargestellten Meßdaten müssen durch Setzen von Statistikregionen oder auch Quadranten unterteilt werden. Für jede dieser Statistikregionen oder Quadranten wird der prozentuale Anteil der darin enthaltenen Zellen am Gesamt-Histogramm errechnet (Padovan et al., 1992).

4.2.4.3.1 Vorbereitung des Zell-Pallets zur FACS-Analyse

Die BALF-Zellsuspension wurde durch Zugabe von PBS auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml verdünnt. Bei hohem Erythrozytenanteil in der BAL erfolgte die Lysierung der Erythrozyten mittels eines speziellen Lysierungsreagenz (FACS-Lysing Solution, Becton Dickinson, D-Heidelberg) .

Bei 4°C wurden je 100 µl dieser Zellsuspension anschließend unter Lichtabschluß für 30 min mit je 10 µl des mit FITC oder PE markierten monoklonalen Antikörpers inkubiert. Im Folgeschritt wurden durch Zugabe von 1 ml speziellem Lysereagenz (FACS lysing solution, Becton Dickinson, D-Heidelberg) die Zellen fixiert, zugleich die Erythrozyten lysiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, gewaschen und in gekühltem PBS (4°C) resuspendiert.

Es wurden folgende mit FITC- oder PE- Fluoreszenzfarbstoff direkt markierte Antikörper (Dako Diagnostika GmbH, D- Hamburg) eingesetzt:

IgG1 /IgG2a	(Isotyp Kontrolle) DAKO
CD 14/45	(Leukozyten, Differenzierung in Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) DAKO
CD 3/4	(Pan T-Zell-Marker, T-Helfer-Zell-Marker) DAKO
CD 3/8	(Pan T-Zell-Marker, T-Supressor-Zell-Marker) DAKO
CD 4/8	(T-Helfer-Zell-Marker, T-Supressor-Zell-Marker) DAKO

4.2.4.3.2 Aufbereitung von peripherem Blut für die FACS-Analyse

10FI des monoklonalen direktkonjugierten Antikörpers wurden in ein Röhrchen pipettiert, mit 100 FI Vollblut (mit EDTA oder Citrat versetzt) vermischt und 15-30 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert.

Zur Erythrozytenlyse wurde 1 ml Lysierungsreagenz (FACS-Lysing Solution, Becton Dickinson, D-Heidelberg) auf die mit dem Antikörper vorinkubierten Zellen gegeben. Die Inkubationszeit betrug 10 min und wurde wiederum bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß durchgeführt.

Anschließend wurde der Ansatz bei 1400 U/min über 5 min zentrifugiert, dekantiert und zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen, dazwischen mit 1400 U/min über 5 min rezentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 FI PBS resuspendiert und dann durchflußzytometrisch analysiert. Hierfür wurden die oben aufgeführten, zur Differenzierung der BALF-Zellen eingesetzten Antikörper verwendet.

4.2.4.4 FACS-Analyse der intrazellulären Hitzeschockproteine

Da Hitzeschockproteine intrazellulär exprimiert werden, müssen die Zellen zur FACS-Analyse permeabilisiert werden. Hierfür wurden 100 µl BAL-Zellen vor Zugabe der spezifischen Antikörper 1 Stunde mit -20EC gekühltem 80% Methanol bei -20EC inkubiert. Hierbei werden sie in einem

Arbeitsschritt fixiert und zugleich permeabilisiert.

Die monoklonalen Antikörper gegen das HSP-Antigen liegen in unkonjugierter Form vor. Somit erfolgte der Ansatz indirekt über zwei Stufen. Zunächst wurde das Zell-Pellet mit 10µ l des unkonjugierten Antikörper über 30 min bei 4°C inkubiert und mit 4EC gekühlten PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit je 5µ l des Sekundärantikörpers (FITC oder PE konjugiert) über 15 min inkubiert. Ein wiederholter Waschvorgang mit PBS folgte.

Die Negativkontrolle erfolgte mit dem jeweiligen Isotyp des Primärantikörpers (IgG 1, IgG 2a) in analogen Arbeitsschritten.

Verwendet wurden folgende Isotyp-Kontroll-Antikörper und HSP-Antikörper:

IgG 1, IgG 2a	(DAKO Diagnostika GmbH, D Hamburg)
HSP 70	(DAKO Diagnostika GmbH, D Hamburg)
HSP 90	(Sigma, D Deisenhofen)

4.2.4.5 Zytokin-Nachweis mittels ELISA

Quantitativer Sandwich Enzym Immunoassay (ELISA), Kit-Systeme:

IL-1, IL-2, IL-6, IL8, TNF-alpha, (Antikörper: R&D Systems, D-Wiesbaden)

Auf einer Mikrotiterplatte sind für das jeweilige Zytokin spezifische monoklonale Antikörper gebunden. Standards und Patientenproben wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und hier von den immobilisierten Antikörpern gebunden. Nach einer Inkubationszeit von 16-24 Stunden wurden die ungebundenen Substanzen mit einem Waschpuffer (R&D Systems, D-Wiesbaden) ausgewaschen, anschließend der jeweils spezifische enzymgebundene polyklonale Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Durch einen wiederholten Waschvorgang mit Waschpuffer (R&D Systems, D-Wiesbaden) wurde das ungebundene Antikörper-Enzym-Reagenz herausgewaschen, anschließend eine Substratlösung (stabilisierte Hydrogen-Peroxidase und stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidine), R&D Systems, D-Wiesbaden) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert.

Nach wiederholter Inkubation wurde eine Amplifier-Lösung (R&D Systems, D-Wiesbaden) hinzugegeben, die den Farbkomplex auslöst.

Die Reaktion der Farbentwicklung wurde nach 30 min durch die Zugabe von Stopplösung (2N Sulfuric Azid, R&D Systems, D-Wiesbaden) beendet, die Farbintensität anschließend mittels ELISA-Readers (Mikroplatten Absorptionsphotometer, Anthos labtec instruments, A-Salzburg) bei 450-495 nm abgelesen. Gemessen wurde die Absorption entsprechend der optischen Dichte des Farbkomplexes.

Zur Qualitätskontrolle der Messungen erfolgte stets eine Doppelbestimmung der Parameter. Lag

die Abweichung zwischen erster und zweiter Messung über 5%, wurden die Werte verworfen und die Messungen wiederholt.

4.2.5 Biochemische Untersuchungen der BALF

4.2.5.1 Bestimmung des Volumens der ELF

Die bronchoalveoläre Lavage führt zu einer starken Verdünnung des epithelialen Flüssigkeitsfilms. Dieser Verdünnungsfaktor, der in den durch Absaugung gewonnen Proben schwankt, kann indirekt durch die Harnstoffverdünnungsmethode bestimmt werden. Diese Methode vergleicht den Harnstoffgehalt in der BALF und im peripheren Blut. Da Harnstoff weitgehend frei diffusibel in den Alveolarraum ist, finden sich in der ELF und im peripheren Blut die gleiche Konzentration. Der Verdünnungsfaktor ergibt sich als Quotient aus Harnstoffkonzentration im Serum und Harnstoffkonzentration in der BALF. Das Volumen der ELF ergibt sich nun aus dem Verdünnungsfaktor multipliziert mit dem BALF-Volumen.

4.2.5.1.1 Prinzip der Harnstoffbestimmung

Die Harnstoffkonzentration wurde im Serum wie in der BALF mit der Test-Combination Harnstoff S (Spaltung mit Urease, Berthelot-Reaktion) durchgeführt (Boehringer Mannheim GmbH, D-Mannheim). Zunächst wurde bei diesem enzymatischen Test Harnstoff unter Zugabe von $2\text{H}_2\text{O}$ durch Urease in Ammoniak umgewandelt. Die Ammonium-Ionen reagierten sodann mit Salicylat und Hypochlorit unter Bildung eines grünen Farbstoffes.

Der Test-Kit enthält folgende Lösungen:

Lösung 1: Puffer / Urease / Salicylat

Phosphat-Puffer	120 mmol/l, pH 7,0
Urease	> 5 U/ml
Natriumsalicylat	62,5 mmol/l
Nitroprussid-Na	5,00 mmol/l
EDTA	1,48 mmol/l

Lösung 2: Hypochlorit

Natriumhypochlorit	6 mmol/l
Natriumhydroxid	150 mmol/l

Lösung 3: Standardlösung

Harnstoff	30 mg/dl bzw. 5 mmol/l
-----------	------------------------

Da die Harnstoffwerte in der BALF unter dem Bereich des Standards lagen, wurde dieser nochmals 1:5 (1mmol/l) verdünnt. Als Kontrolle wurde das Reagenz "cfas-cal" 15,2 mmol/l (Boehringer GmbH D-Mannheim) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

4.2.5.1.2 Testansatz

500 FI der BALF-Probe wurden mit 1 ml der Lösung 1 in ein Röhrchen aufgenommen und über 15-30 min inkubiert. Anschließend wurde der Testansatz mit 1 ml der Lösung 2 über 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann in eine Meßküvette überführt. Standards und Proben wurden bei 578 nm an einem Eppendorf-Photometer PCP 6123 (Eppendorf GmbH, D-Hamburg) gemessen.

Zur Qualitätskontrolle der Messungen erfolgte stets eine Doppelbestimmung der Parameter. Toleriert wurde eine Abweichung zwischen erster und zweiter Messung bis 3%.

Wesentliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Harnstoffverdünnungsmethode ist die standardisierte Durchführung der BAL. Wie oben aufgeführt, ist hier insbesondere die Einhaltung der Zeitgrenze während der Rückgewinnung der Spülflüssigkeit wesentlich. Wir verwendeten daher ausschließlich Proben, bei denen eine Instillationszeit von 20 sec bis zum Absaugen der eingeschwemmten Flüssigkeit nicht überschritten worden war.

4.2.5.2 Gesamteiweiß

Die Gesamteiweißkonzentration wurde in der BAL mit dem Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD Laboratories GmbH, München), Methode nach Lowry, durchgeführt.

Der Textilfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250(CBB-G250), Absorptionsmaximum bei 465 nm, liegt in leicht saurer Lösung vor. Mit Proteinen reagiert CBB-G250 rasch unter Ausbildung eines Protein-Farbstoff-Komplexes und Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm.

In dem Meß-Kit sind folgende Reagenzien enthalten:

Lösung 1	450 ml konzentriertes Dye-Reagenz (Phosphor Azid und Methanol) Wird 1:5 mit Aqua dest verdünnt
----------	--

Standard 1	cfas-cal 1:100 verdünnt
------------	-------------------------

Testansatz:

100 µl der BALF-Probe wurden in 2 ml Protein Assay Lösung (Lösung 1) aufgenommen.

Die Messung gegen einen Leerwert erfolgte am Eppendorf Photometer PCP 6123 (Eppendorf GmbH, D-Hamburg) bei 578 nm.

4.2.5.3 Albumin

Das Testprinzip von Albumin in der BALF basiert auf einem immunologischen Trübungstest. Die Albumin-Antikörper reagieren mit dem Antigen aus der Probe unter Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der nach Agglutination turbidimetrisch gemessen wird.

Der gebrauchsfertige Kit enthält folgende Lösungen:

Reagenz 1	Puffer (Tris-Puffer 50 mmol/l, pH 8,0, PEG 4,2%, EDTA 3,7 g/l, Konservierungsmittel)
-----------	--

Reagenz 2	Albumin-Antikörper (polyklonaler Anti-Human-Albumin-Antikörper vom Schaf)
-----------	---

Reagenz 3	Kalibratoren (humanes Albumin, Phoshat-Puffer 50 mmol/l, pH 8,0, Konservierungsmittel)
-----------	--

Die Messungen erfolgten an einem Photometer Hitachi 911(Eppendorf, D-Hamburg).

Das Gerät überführt die Verdünnungen der Reagenzien und die 10 µl BALF-Probe vollautomatisch in die Meßküvetten. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt.

Zu allen Werten wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Toleriert werden Abweichungen zwischen erster und zweiter Messung bis 5% wurden toleriert.

4.2.5.4 Nachweis von Laminin in der BALF

Die Messung von Laminin wurde mit einem ELISA (Fa. Takara, Japan) durchgeführt. Ein gegen das Antigen gerichteter primärer Antikörper ist an eine Platte mit 96 Vertiefungen gebunden. Im ersten Inkubationsschritt bindet die gesamte Antigenmenge an diesen im Überschuß vorliegenden Antikörper. Nach Auswaschen von Serumbestandteilen mit einem vorgegebenen Puffer wurde in einem weiteren Inkubationsschritt ein Enzym-markierter Sekundär-Antikörper hinzugegeben. Er bindet an ein weiteres Epitop des an den Primärantikörper gebundenen Antigens unter Ausbildung eines Sandwichkomplexes, der das Antigen von beiden Seiten umschließt. Die gebundene enzymatische Aktivität im Probenansatz ist proportional der Konzentration des Antigens. Die Reaktion der Farbentwicklung wurde nach 30 min durch die Zugabe von Stopplösung (Fa Takara, Japan) beendet, die Farbintensität anschließend mittels ELISA-Readers (Mikroplatten Absorptionsphotometer, Anthos labtec instruments, A-Salzburg) bei 492 nm abgelesen. Gemessen wurde die Absorption entsprechend der optischen Dichte des Farbkomplexes.

Vorbereitende BALF-Konzentrierung

Die Bestimmung von Laminin in der ELF wurde unternommen, um spezifische Aktivierungsprozesse des Bindegewebes zu erfassen. Da dieses Protein in Lavagen von interstitiellen Lungenerkrankungen lediglich in 20% nachweisbar ist, wurde zu deren besseren Quantifizierbarkeit die BALF einer Konzentrierung durch Zentrifugenfiltration unterzogen. Diese wurde durch eine fraktionierte Zentrifugation, die das Ausgangsvolumen kontrolliert vermindert, erreicht. Die Volumenreduktionsschritte erfolgen hierbei von 2,5 auf 0,5 ml. Der Konzentrierungsfaktor wurde durch Vergleich des Proteingehaltes in den Proben ermittelt.

4.2.5.5 N-terminales Prokollagen-III-Peptid (N-P-III-P)

Die Bestimmung der N-P-III-P-Konzentration wurde mittels Radioimmunoassay durchgeführt (RIA-agnost P III P - coated tube, Behringwerke, D-Marburg). Eingesetzt wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes N-P-III-P, der hochspezifisch für das intakte N-P-III-P ist und eine Kreuzreagibilität gegenüber N-P-III-P-Spaltprodukten von lediglich 10% aufweist.

Der Radioimmunoassay arbeitet in 2-Schritt-Sandwich-Technik. Zunächst wurde aus wandgebundenem Anti-N-P-III-P-Antikörper (monoklonal, Maus) und ¹²⁵J markiertem Anti-N-P-III-P-

Antikörper (monoklonal, Maus) ein Komplex gebildet. Anschließend erfolgte die Auswaschung freier Traceranteile. Der spezifisch an die Wandung des Teströhrchens gebundene Tracer-Anteil wurde nun mit einem Gamma-Counter gemessen. Die Ergebnisse wurden durch Vergleich mit einer 7-Punkt Standardkurve mit Hilfe eines computergestützten Auswerteprogramms ermittelt. Die untere Nachweisgrenze betrug für N-P-III-P 0,1 E/ml.

Für Doppelmessungen wurde eine Toleranzgrenze von 10% vorgegeben.

4.2.6 Neoangiogene Faktoren und Wachstumsfaktoren

Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), Transforming growth factor (TGF), Epidermal growth factor (EGF), Platelet derived growth factor (PDGF) und Fibroblast growth factor (FGF-alpha und FGF-beta)

Der Test basiert auf einem quantitativen Sandwich Enzym Immunassay. Ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen VEGF ist auf einer Mikrotiterplatte fixiert. Standards und Proben wurden in die vorgegebene Vertiefungen pipettiert und dort von dem Antikörper gebunden. Bei einem Waschvorgang wurden alle nichtbindenden Substanzen entfernt und anschließend ein Sekundärantikörper (polyklonaler Antikörper mit Enzym) hinzugegeben, der spezifisch an den gebildeten VEGF-Antikörper-Komplex bindet.

Anschließend wurde durch ein Substrat farblich die Bindung mit dem jeweiligen nachzuweisenden Faktor detektiert und mittels ELISA-Reader abgelesen.

Alle Meßparameter wurden doppelt bestimmt, eine Abweichung bis 5% zwischen erstem und zweitem Meßwert toleriert.

4.2.7 Methioninsulfoxid

Methioninsulfoxid (Met(O)) entsteht durch Oxidation der Thioäthergruppe von Methionin. Der Oxidationsgrad eines Proteins läßt sich an dem Anteil der oxidierten Methioninreste im Vergleich zu dem Gesamtmethioningehalt des Makromoleküls ablesen.

Die bei -80°C aufbewahrten Aliquots wurden aufgetaut. Die Methode erfordert eine Mindestmenge von 100 µg Protein, entsprechend etwa 1,5 ml BALF. Zunächst wurde bei einer Temperatur von 4°C eine dreistündige Dialyse gegen entionisiertes Wasser durchgeführt, dann lyophilisiert und in 840 µl 75%iger stickstoffgesättigter Ameisensäure gelöst. Methionin wurde nun durch Zugabe von Bromcyan (CNBr, Rockford, USA) bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur in einer 100% Stickstoffatmosphäre inkubiert. Hierdurch erfolgte die Umwandlung von Methionin in Homoserin und Homoserin-Lakton (Shechter 1975, Beck-Speier 1988). Die mit CNBr behandelten Proteine wurden lyophilisiert und über 48 Stunden mit 6 M HCL (Merck, D-Darmstadt) unter 5mM Dithioerythritol (Merck, D-Darmstadt) unter Vakuum bei 110°C hydrolysiert, wobei (Met(O)) quantitativ zu Met reduziert wurde. Anschließend wurde eine reversed-phase High-Performance Liquid-Chromatography (RP HPLC, Fa Kontron, D-München. Zum Prinzip s.u.)

durchgeführt, in der die initial oxidierten Methioninreste als Methionin und die nicht oxidierten Methioninreste als Homoserin nachgewiesen wurden.

4.2.8 Gesamtglutathion

Das Glutathiondisulfid (GSSG) wird im Meßansatz durch die Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH zu zwei Molekülen GSH reduziert. Hieraus ergibt sich die Gesamtglutathion (GSht) - Konzentration aus der Summe von reduziertem GSH und der zweifachen Menge des gemessenen GSSG.

100 µl BALF wurden mit 1.1 ml 0,1 M Natrium Phosphat Puffer, pH 7,0, bestehend aus 1mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 0,2 mM Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 63,5 µM 5,5-dithiobis (2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) und 4 U/ml Glutathion Reduktase versetzt (alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, D-Deisenhofen).

Die Reduktionsrate von DTNB wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen. Die GSht Konzentration von der BALF wurde mit einer internen Standardlösung von 0,84µM GSH berechnet.

Oxidiertes Glutathion (GSSG) wurde nach der Methode Adams wie folgt bestimmt. Nach Zentrifugation (300 x g , 5 min) BALF wurde mit einem Volumen von 10 mM N-ethylmaleimide in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,5, und 17,5 mM EDTA versetzt.

Mit 250 µl dieses Ansatzes wurde eine SEP-PAK c 18 Säule (Waters Associatea, Milford, UK-Manchester), gefolgt von 3 ml Methanol und 3 ml Aqua bidest, beschickt. GSSG wurde mit 1 ml 0,1 µ Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5 mit 5 mM EDTA, 800 mM DTNB, 2 U/ml Glutathion- Reduktase und 1 mM NADPH verdünnt.

Die Reduktionsrate von DTNB wurde wiederholt am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen. Die Standards von GSSG (Boehringer Mannheim, D- Mannheim) mit einer bekannten Konzentration von 0,25 - 4 µM wurden entsprechend den BALF-Proben gemessen und ergaben die Standardkurven.

Die Konzentration von GSht wurde wie folgt berechnet:

$$\text{GSht} = \text{GSH} + 2 \times \text{GSSG}.$$

Alle Messungen wurden wegen des hohen relativen Fehlers der Einzelmessung dreifach durchgeführt, die vorgegebene Toleranzgrenze der Abweichung der Einzelmessungen voneinander betrug 10%.

4.2.8.1 Glutathiondisulfid / reduziertes Glutathion

Die Messung des Gesamtglutathions umfaßte sowohl die reduzierte als auch die oxidierte Form und gab damit Aufschluß über das Verhältnis dieser Redox-Formen zueinander.

4.2.8.1.1 HPLC (*high performance liquid chromatography*)

Die Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie ist eine leistungsfähige chemische Trennmethode, die zur quantitativen Analyse von geringen Stoffmengen angewendet wird.

Das Prinzip der Chromatographie beruht auf der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Bestandteile eines Gemisches zu zwei verschiedenen Phasen, die nicht oder nur in begrenztem Umfang untereinander mischbar sind. Eine der Phasen, die sogenannte stationäre Phase, befindet sich durch die Bindung an einen festen Träger in Ruhe. Die andere, die mobile Phase, wird einer ständigen gerichteten Bewegung durch Überdruck unterzogen.

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilungsgleichgewichte der einzelnen Komponenten des Analysengemisches zwischen stationärer und mobiler Phase kommt es zu einer differentiellen Retention der Einzelkomponenten an der stationären Phase und damit zu unterschiedlichen Retentionszeiten, d.h. unterschiedlichen Zeiten, welche die Einzelkomponenten bis zum Verlassen der Säule benötigen. Hierdurch kommt es zur Auftrennung der Stoffgemische.

Das in die entsprechenden Einzelsubstanzen aufgetrennte Eluat wird während des Verfahrens kontinuierlich fokussiert und durch den Meßstrahl eines Ultraviolett-detektors gelenkt. Das Signal wird aufgezeichnet und gegen eine Zeitachse aufgetragen. Das Ergebnis ist ein charakteristisches Chromatogramm, welches die aufgetragenen Substanzen qualitativ und quantitativ beschreibt.

Der Chromatograph besteht aus einer Pumpe, einem Probeninjektor, einer Trennsäule, dem mobilen Phasensystem und einem Ultraviolett-detektionssystem. Der Überdruck gewährleistet einen konstanten Fluß der mobilen Phase gegen den Widerstand der stabilen Phase in der Trennsäule.

4.3 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS Version 8, auf einem IBM-kompatiblen Personalcomputer. Alle angegebenen Mittelwerte entsprechen, sofern nicht anders ausgewiesen, dem arithmetischen Mittelwert, die Abweichungen wurden als Standardabweichungen angegeben. Unter der Voraussetzung, daß die Zahlenwerte innerhalb der Gruppen nicht normalverteilt sind, wurde zum Vergleich von unverbundenen Stichproben ausschließlich der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Für verbundene Stichproben wurde der Wilcoxon-U-Test eingesetzt. Zur graphischen Darstellung der Werteverteilung über die Gruppen wurden Box-Plots gewählt, da die von ihnen ausgegebenen graphischen Charakteristika den Gruppenmedian, den Interquartilbereich und die Extremwerte (Range) beinhalten und damit nicht normalverteilte Daten adäquat beschreiben.

Zum Vergleich nominalskalierten Daten wurde eine Kontingenztafelanalyse durchgeführt. Bei

numerischem Datenformat erfolgte der Vergleich der Testvariablen über die Gruppenvariable unter der Hypothese nicht normalverteilter Daten parameterfrei mit dem Kruskal-Wallis-Test. Bei hier ausgegebenen Signifikanzen wurde mit dem U-Test unter Bonferroni-Korrektur paarweise nachgetestet.

Die Abhängigkeit zwischen zwei Variablen wurde parameterfrei mit dem Korrelationskoeffizient nach Spearman getestet. Zur Beschreibung numerischer Variablen mit nicht normalverteilten Werten wurden folgende Parameter tabellarisch angegeben: Median, Minimum, Maximum, 25. Perzentil, 75. Perzentil.

Für alle angewendeten Testverfahren wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit ein alpha-Fehler von 0,05 angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Einteilung der Proben

Insgesamt wurden 261 Lavageproben von 199 Patienten vor, unter oder nach Therapie eines Bronchialkarzinoms untersucht. Die Proben wurden in die folgenden Gruppen aufgeteilt, die im folgenden erläutert werden:

Gruppe 1	
Vor Therapie	9 Proben von 9 Patienten
Gruppe 2	
Unter laufender Chemotherapie	45 Proben von 41 Patienten
Gruppe 3	
Bis 2,5 Monate nach Chemotherapie	10 Proben von 10 Patienten
Gruppe 4	
2,5 - 15 Monate nach Chemotherapie	19 Proben von 13 Patienten
Gruppe 5	
Mehr als 15 Monate nach Chemotherapie	19 Proben von 12 Patienten
Gruppe 6	
Unter Radiotherapie	4 Proben von 4 Patienten
Gruppe 7	
Bis 2,5 Monate nach Radiotherapie	15 Proben von 14 Patienten
In dieser Gruppe hatten 3 Patienten klinisch und radiologisch eine Pneumonitis entwickelt	3 Proben von 3 Patienten
Gruppe 8	
2,5 - 15 Monate nach Radiotherapie	54 Proben von 42 Patienten
In dieser Gruppe boten 2 Patienten klinisch, radiologisch und lungenfunktionsanalytisch das Bild einer geringen bis mäßiggradigen Lungenfibrose	(2 Proben von 2 Patienten)
Gruppe 9	
Mehr als 15 Monate nach Radiotherapie	44 Proben von 35 Patienten

Gruppe 10	
Unter Chemotherapie, nach Radiotherapie	9 Proben von 9 Patienten
Gruppe 11	
Mindestens 2 Jahre zurückliegende Operation mit nachfolgender Bestrahlung (komplette Remission)	33 Proben von 29 Patienten

5.2 Anthropometrische Daten

5.2.1 Altersverteilung

Tabelle 8: Die Altersverteilung in den einzelnen Gruppen, bezogen auf die Anzahl der Proben

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	25. Perzentil	75. Perzentil
1	64,00	46,00	88,00	54,50	76,00
2	64,00	47,00	79,00	58,75	70,00
3	64,50	45,00	77,00	52,00	72,00
4	63,00	44,00	81,00	59,00	68,00
5	63,00	33,00	72,00	56,00	63,00
6	66,00	59,00	71,00	60,25	70,25
7	61,00	39,00	79,00	58,00	68,00
8	64,00	38,00	79,00	59,00	69,00
9	64,00	48,00	81,00	59,00	67,50
10	63,00	52,00	71,00	57,50	65,50
11	68,00	35,00	86,00	59,75	70,25

Zur Überprüfung, ob die oben gezeigte Verteilung in den Subgruppen signifikant different ist, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Gemäß diesem Testverfahren fanden sich in den Subgruppen für das Alter folgende Ränge:

Tabelle 9: Ränge der Altersverteilung innerhalb der Patientengruppen

Gruppe	N	Mittlerer Rang
1	9	143,39
2	45	137,92
3	10	131,15
4	19	128,79
5	19	107,89
6	4	152,88
7	15	119,63
8	54	128,89
9	44	129,44
1	9	115,17
11	33	145,08
Gesamt	261	

Hieraus ergab sich im Kruskal-Wallis-Test eine asymptotische Signifikanz von $p=0,9$, d.h., die Altersverteilung bezogen auf die Proben in den Subgruppen war nicht signifikant different.

5.2.2 Geschlechtsverteilung und Tumorhistologie in den Patientengruppen

Die folgende Tabelle gibt die Geschlechtsverteilung und die Tumorhistologie in den Therapiegruppen, bezogen auf die Anzahl der Proben, an:

Tabelle 10: Geschlechtsverteilung und die Tumorhistologie in den Therapiegruppen

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
m	7	38	7	15	14	3	11	41	38	7	20
w	2	7	3	4	5	1	4	13	6	2	13
NSCLC	8	36	8	15	15	1	10	42	32	7	22
SCLC	1	9	2	4	4	3	5	12	12	2	11

In der Kontingenztafelanalyse fand sich im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ein Signifikanzniveau von 0,51. Somit wies die Geschlechtsverteilung in den Subgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen auf.

Insgesamt wurden 193 Proben von Patienten mit NSCLC und 68 Patienten mit SCLC gewonnen, einem Anteil an kleinzelliger Bronchialkarzinome von gut 35% entsprechend. Da sich die Anzahl der Proben prozentual entsprechend auf die Anzahl der Patienten verteilte (nicht gezeigt), entspricht dies einem gegenüber der Häufigkeitsverteilung der Erkrankung überproportionalen Anteil am Gesamtkollektiv.

5.2.3 Chronische Bronchitis und Nikotinabusus

Insgesamt wurden 79 Proben von Patienten mit chronischen Bronchitis gewonnen. Diese teilen sich auf die Therapie-Subgruppen auf wie folgt:

Tabelle 11: chronische Bronchitis in den Therapie-Subgruppen

Gruppe	chronische Bronchitis	ja	/	nein
1		2		7
2		15		30
3		3		7
4		3		15
5		0		18
6		2		2
7		4		11
8		15		39
9		19		25
10		3		5
11		13		20
		79		182

Die Häufigkeit des Auftretens von chronischer Bronchitis bezogen auf die Probenanzahl in den Subgruppen wurde mit einer Kontingenztafelanalyse auf signifikante Unterschiede überprüft. Der Chi-Quadrat-Test ergab in der Analyse aller Datensätze ein Signifikanzniveau von 0,13. In der Kontingenztafelanalyse lag jedoch in der Gruppe 5 die beobachtete Häufigkeit des Auftretens einer chronischen Bronchitis hinter der erwarteten Häufigkeit:

Gruppe 5: erwartete Häufigkeit: 5 Fälle. Beobachtete Häufigkeit: 0 Fälle.

Von den 261 Proben entfielen 237 auf Raucher. Der kumulative Nikotinabusus verteilte sich auf die Therapie-Subgruppen wie folgt:

Tabelle 12: Verteilung des kumulative Nikotinabusus auf die Therapie-Subgruppen

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	25. Perzentil	75. Perzentil
1	20,00	0,00	30,00	15,00	20,00
2	30,00	0,00	80,00	20,00	40,00
3	22,50	0,00	40,00	20,00	30,00
4	10,00	0,00	45,00	5,00	25,00
5	10,00	0,00	40,00	5,00	30,00
6	30,00	20,00	40,00	22,50	37,50
7	25,00	0,00	40,00	15,00	35,00
8	20,00	0,00	80,00	10,00	40,00
9	20,00	0,00	50,00	20,00	30,00
10	30,00	00,00	80,00	17,50	30,00
11	30,00	10,00	40,00	20,00	30,00

Der Anteil der 24 Proben der Nichtraucher verteilte sich weitgehend homogen über die Gruppen, wobei der mittlere Anteil an der gesamten Probenzahl bei 91% lag. In der Gruppe ohne Tumorloading und ohne Therapie (Gruppe 11) sowie in der kleinen Gruppe unter Strahlentherapie befanden sich ausschließlich Raucher.

Der kumulative Nikotinabusus war in dem überwiegend aus Rauchern bestehenden Kollektiv bei den Patienten mit bzw. ohne chronischer Bronchitis (bezogen auf die Anzahl der Proben) im Mann-Whitney-U-Test in der Gruppe der Bronchitiker signifikant gegenüber denjenigen ohne Bronchitis erhöht ($p=0,019$).

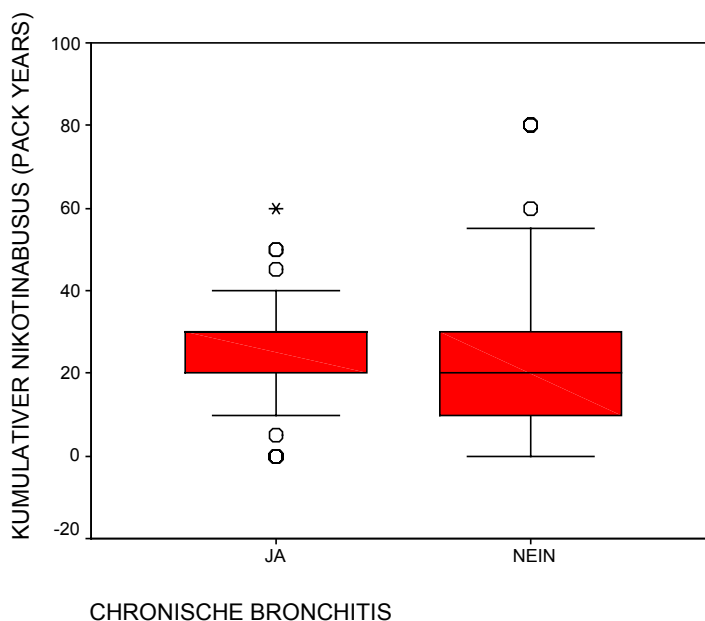


Abb. 1: kumulativer Nikotinabusus / chronische Bronchitis

5.3 Zytologische Parameter der BALF

5.3.1 Vitalitätsprüfung der Zellen in der BALF

Die Vitalitätsprüfung der durch bronchoalveolären Lavage gewonnenen Zellen erfolgte mit der Trypan-Blau-Methode. Im Mittel lag der Anteil der hiermit gefärbten avitalen Zellen in der BALF zwischen 25% und 35% mit einer Spannweite von 3% bis maximal 50%. Das Verteilungsmuster innerhalb der Subgruppen der Proben (nicht dargestellt) erbrachte im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede.

5.3.2 Gesamtzellzahl in der BALF

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Gesamtzellzahl in $\text{Zellzahl} \times 10^6$ pro 100 ml BALF ausgedrückt. Hierfür wurde die aus dem Pellet gewonnene Zellzahl durch die Recovery geteilt und mit 100 multipliziert.

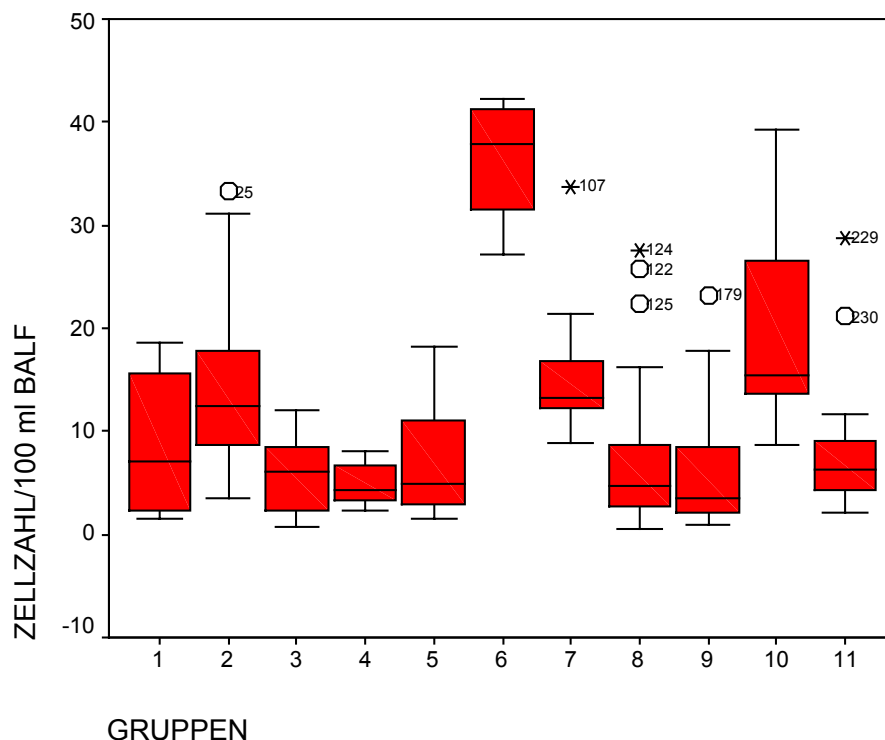


Abb. 2: Zellzahl (/100ml BALF) / Gruppen

Die höchsten Zellzahlen fanden sich in den BALF-Proben der Patienten unter Strahlentherapie, wobei sich in dieser Gruppe allerdings lediglich 4 Proben von 4 Patienten befanden. Adaptiert an die geringe Fallzahl wurde Fisher's exakter Test angewendet, der im Vergleich zu der Gruppe 11, also Proben von Patienten, die vor mehr als 2 Jahren operiert und strahlentherapiert wurden, ein Signifikanzniveau von $> 0,001$ ergab.

Im Vergleich der Mediane (siehe Box-Plots) fand sich der zweithöchste Wert für die Gruppe, die

nach einer erfolgten Strahlentherapie erneut chemotherapiert wird. Im Mann-Whitney-U-Test war die Zellzahl hier gegenüber der Gruppe 11 ebenfalls signifikant erhöht ($p > 0,001$).

Die nächsthöhere Zellzahl (Median) fand sich in der Gruppe der Patienten unter laufender Chemotherapie. Auch in dieser Gruppe war die Zellzahl signifikant gegenüber der Gruppe 11 erhöht ($p > 0,001$, Mann-Whitney-U-Test).

Auffällig war, daß die Zellzahlen nach zytoreduktiver Therapie rasch abfielen und bereits 2,5 Monate nach Chemotherapie nicht mehr signifikant gegenüber den als Kontrollgruppe dienenden Proben der Gruppe 11 erhöht waren. Bei Z.n. Radiotherapie fand sich in der Gruppe bis 2,5 Monate nach Therapieende noch eine deutliche Erhöhung der Zellzahlen, nach 2,5 Monaten war jedoch auch dieser therapieassoziierte Anstieg der Zellzahlen in den BALF nicht mehr nachweisbar.

In den Proben der Gruppe 7 lag der Median der Zellzahl bei 13,24 /100 ml BALF, 25. und 75. Perzentil bei 11,98 und 16,77. Die Patienten mit Pneumonitis wiesen hierzu mit Zellzahlen von 19, 26 und 29 Zellen /100 ml BALF deutlich höhere Werte auf. In der Gruppe 8 lagen die beiden Patienten mit manifester Lungenfibrosierung mit 23 und 26 Zellen/100 ml BALF ebenfalls über dem Gruppenmedian (3,34, 25. Perzentil 2,0, 75. Perzentil 9,43 Zellen/100 ml BALF).

Eingesetzt wurden sowohl für das NSCLC wie das SCLC vorrangig Polychemotherapien, die beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom in der first-line Therapie zumeist platinbasiert waren.

Während in der Probengruppe von Patienten mit primärer Chemotherapie ausschließlich Polychemotherapien verabreicht wurden, kamen bei 3 Patienten nach Radiotherapie auch Monotherapien zum Einsatz. In der Polychemotherapiegruppe wurde für die weitere Analyse zwischen platinbasierten und nicht platinbasierten Therapien unterschieden. Hier fand sich unter primärer Chemotherapie kein Unterschied zwischen den Therapiegruppen, während nach vorangegangener Strahlentherapie die platinbasierte Chemotherapie zu einer signifikant erhöhten Zellzahl in der BALF führte (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Die weitere Zelldifferenzierung zeigte gleichsinnige Ergebnisse (nicht dargestellt).

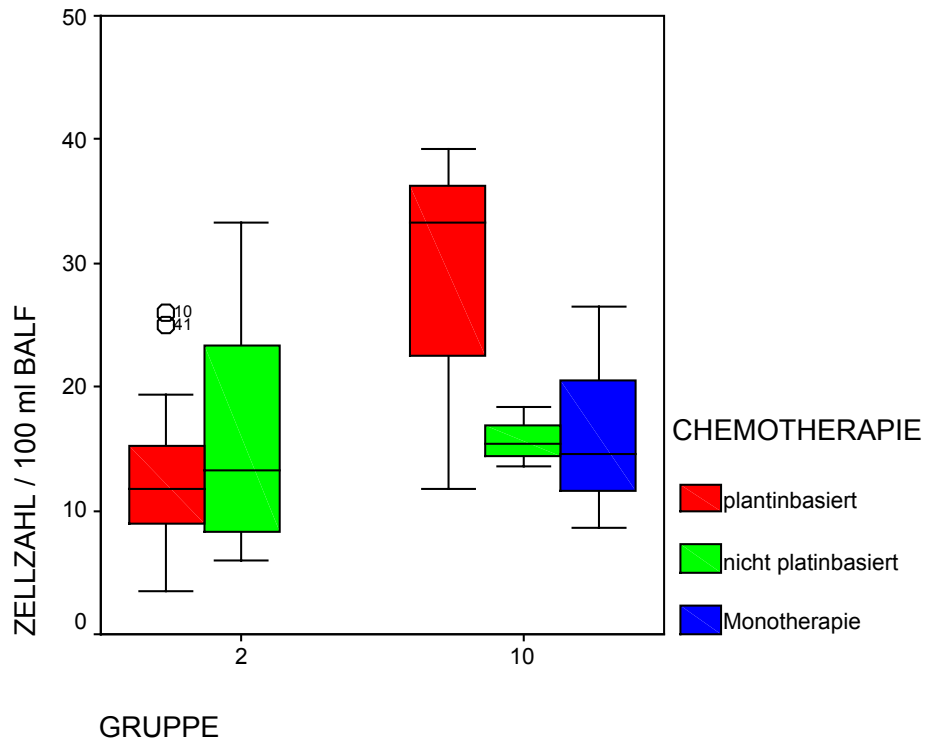


Abb. 3: Zellzahl (/ 100ml BALF) / Gruppe

Um den möglichen Einfluß des Tumorgeschehens auf die Zellzahl in den BALF-Proben zu ermitteln, wurde getestet, ob die Gruppe, bei der ein Lungentumor frisch diagnostiziert wurde, gegenüber der Gruppe mit Patienten in kompletter Remission (Gruppe 11) eine erhöhte Zellzahl aufwies. Die Zellzahlen in beiden Gruppen waren jedoch ähnlich (Signifikanzniveau von $p=0,45$, Mann-Whitney-U-Test) .

45 Lavage-Proben stammten von Nichtrauchern, 216 von Rauchern. Der Anteil von Passivrauchern unter den Nichtrauchern, der anlässlich der Rauchgewohnheiten in den Haushalten sowie dem gegenüber nicht exponierten Nichtrauchern vermehrten Erkrankungsrisiko für ein Bronchialkarzinom zu vermuten ist, ließ sich nicht exakt erheben. In den Proben von Rauchern fand sich gegenüber den Proben von Nichtrauchern eine signifikant erhöhte Zellzahl (Mann-Whitney-U-Test, $p>0,001$).

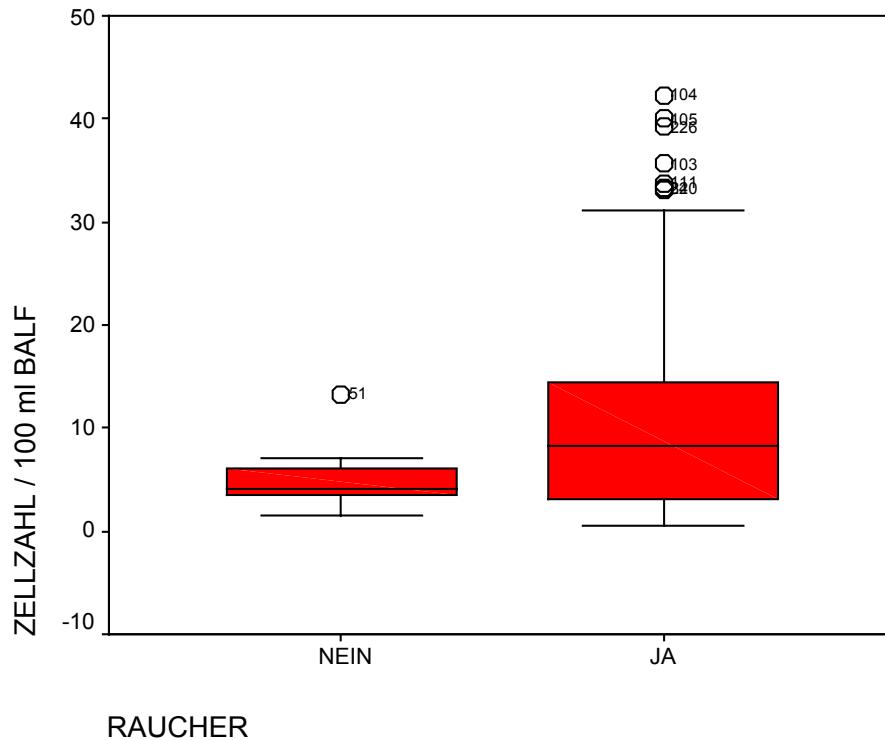


Abb. 4: Zellzahl (/ 100 ml BALF) / Raucher

5.3.3 Durchflußzytometrische Zelldifferenzierung

Diese Untersuchungen standen nicht von allen Proben zur Verfügung. In den Gruppen wurden die folgende Anzahl von Proben systematisch durchflußzytometrisch aufgearbeitet:

Gruppe 1	5 Proben von 5 Patienten
Gruppe 2	7 Proben von 6 Patienten
Gruppe 3	4 Proben von 4 Patienten
Gruppe 4	6 Proben von 6 Patienten
Gruppe 5	8 Proben von 7 Patienten
Gruppe 6	3 Proben von 3 Patienten
Gruppe 7	5 Proben von 4 Patienten
Gruppe 8	8 Proben von 8 Patienten
Gruppe 9	9 Proben von 9 Patienten
Gruppe 10	6 Proben von 5 Patienten
Gruppe 11	10 Proben von 9 Patienten

Die durchflußzytometrisch erhaltenen Werte wurden lichtmikroskopisch am sogenannten Zytospin-Präparat mikroskopisch bestätigt, wobei sich im Mittel eine Divergenz von unter 5% ergab. Da zur weiteren Auswertung die durchflußzytometrischen Parameter (Helfer/Supressorzellen) herangezogen wurden, bildeten diese Daten auch die Grundlage der morphologischen Differenzierung.

5.3.3.1 Alveolarmakrophagen

Bei allen Patientengruppen überragte der Anteil an Alveolarmakrophagen bei den zellulären Bestandteilen. Auffällig war, daß der Anteil an Alveolarmakrophagen sowohl nach Chemo- als auch nach Strahlentherapie signifikant erniedrigt war (jeweils $p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test), wobei dieser Effekt bei den Patienten nach Strahlentherapie etwas später, nämlich erst in der Gruppe nach 2,5 Monaten nach Therapieende einsetzte. Weiterhin fiel auf,

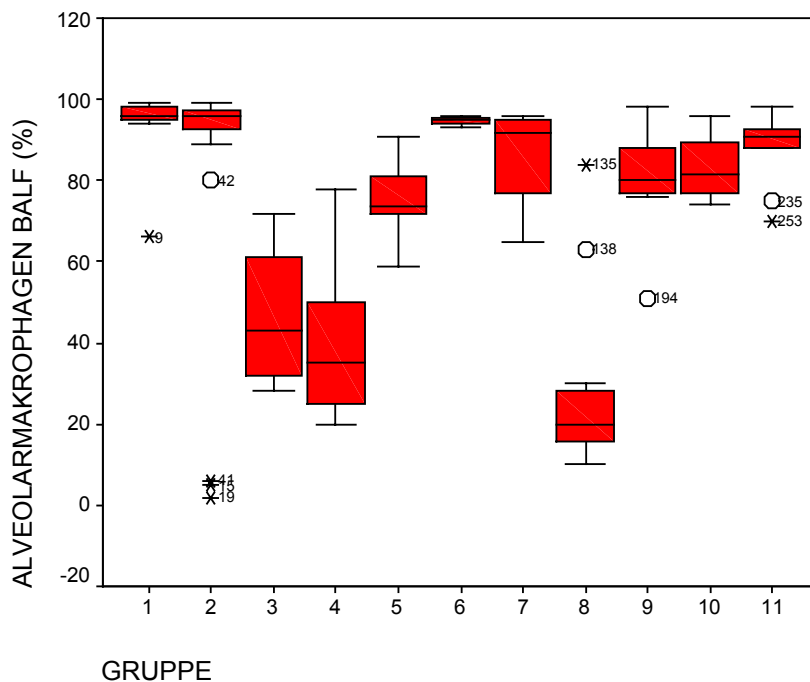


Abb. 5: Alveolarmakrophagen BALF (%) / Gruppe

daß unter Chemo- wie Radiotherapie der Makrophagenanteil gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert war, während nach vorangegangener Radiotherapie und erneuter Chemotherapie (Gruppe 10) der Makrophagenanteil geringgradig, jedoch signifikant ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) erniedrigt war.

5.3.3.2 Lymphozyten

Der lymphozytäre Anteil der BALF-Zellen stellte sich in den Gruppen wie folgt dar:

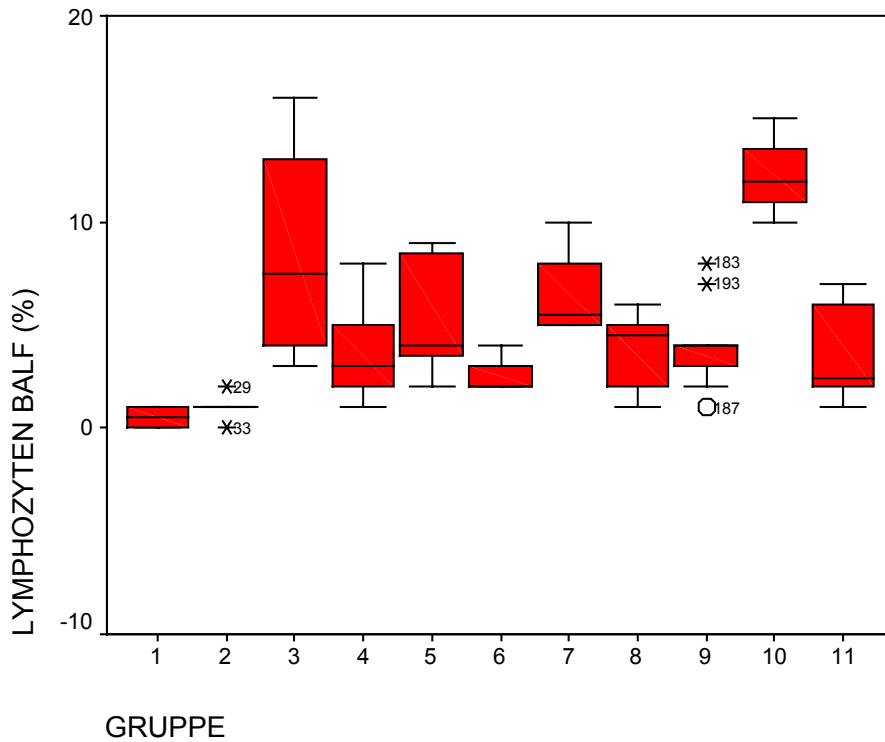


Abb. 6: Lymphozyten BALF (%) / Gruppe

In der Varianzanalyse ergaben sich entsprechend des differenten Verteilungsmusters in den Subgruppen signifikante Gruppenunterschiede. Wurden diese nichtparametrisch im Kruskal-Wallis-Test nachgeprüft, fanden sich sowohl nach Chemo- als auch nach Radiotherapie signifikant erhöhte Lymphozytenanteile gegenüber der Gruppe vor Therapie ($p < 0,05$). Unter Chemotherapie waren die Lymphozytenzahlen signifikant erhöht, wenn eine Strahlentherapie vorausging. Ein Unterschied zwischen platinbasierter und nicht platinbasierter Chemotherapie war nicht auszumachen.

Mit einem Lymphozytenanteil von 8% und 10% zeigten die beiden Patienten mit Pneumonitis gegenüber dem Gruppenmittel (Gruppe 7, Median 5,5%, 25. Perzentile 5%, 75 Perzentile 9%) erhöhte Werte.

5.3.3.3 Neutrophile Granulozyten

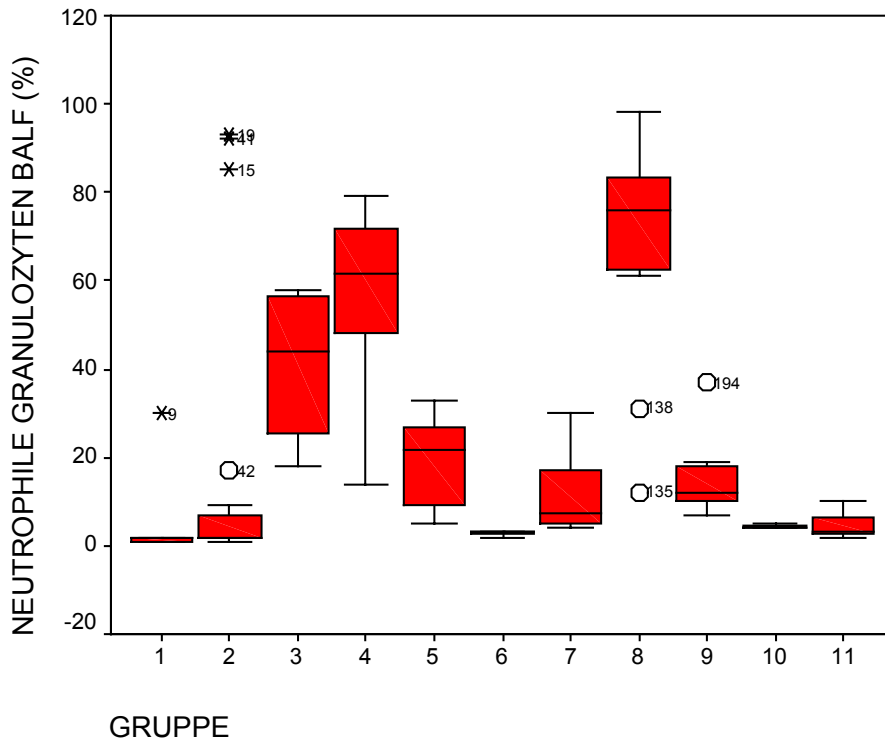


Abb. 7: Neutrophile Granulozyten BALF (%) / Gruppe

Die in der BALF gewonnenen neutrophilen Granulozyten entsprachen lichtmikroskopisch der Morphologie neutrophiler Granulozyten aus dem peripheren Blut. In den Patientengruppen fand sich folgender Verteilungsmodus: Während alle Patientengruppen unter Therapie nur sehr geringe Anteile an neutrophilen Granulozyten aufwiesen, war sowohl nach Chemo- als auch nach Radiotherapie der Anteil an Neutrophilen sowohl gegenüber den Therapiegruppen als auch der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Test, $0 < 0,05$).

Die Patienten mit einer Lungenfibrosierung wiesen in ihrer Gruppe mit 85 und 88% deutlich erhöhte Werte auf: Median 76%, 25. Perzentil 61,75%, 75. Perzentil 84,25%

5.3.3.4 Eosinophile Granulozyten

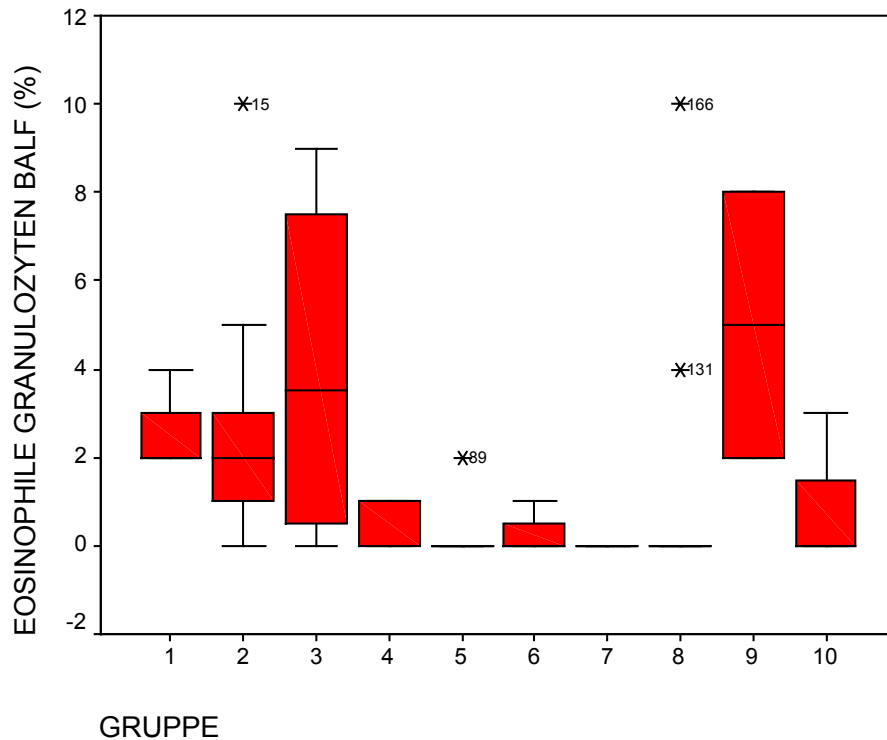


Abb. 8: Eosinophile Granulozyten BALF (%) / Gruppe

Der Anteil eosinophiler Granulozyten wurde lichtmikroskopisch am Zytospin-Präparat der BALF ausgezählt. In allen Probengruppen war ihr Anteil gering. Vermehrte Werte fanden sich in den Proben, die nach Chemo- oder Radiotherapie gewonnen wurden, wobei nach Chemotherapie ein relativer Anstieg von Eosinophilen unmittelbar anschließend, nach Radiotherapie im Intervall von 15 Monaten gesehen wurde. In der Kontrollgruppe war der Anteil an eosinophilen Granulozyten 0% (nicht dargestellt).

In der Patientengruppe mit Pneumonitis und Lungenfibrosierung war der Anteil an eosinophilen Granulozyten nicht erhöht.

5.3.3.5 Immunphänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen

5.3.3.5.1 T-Helfer- und T-Suppressor.-Lymphozyten

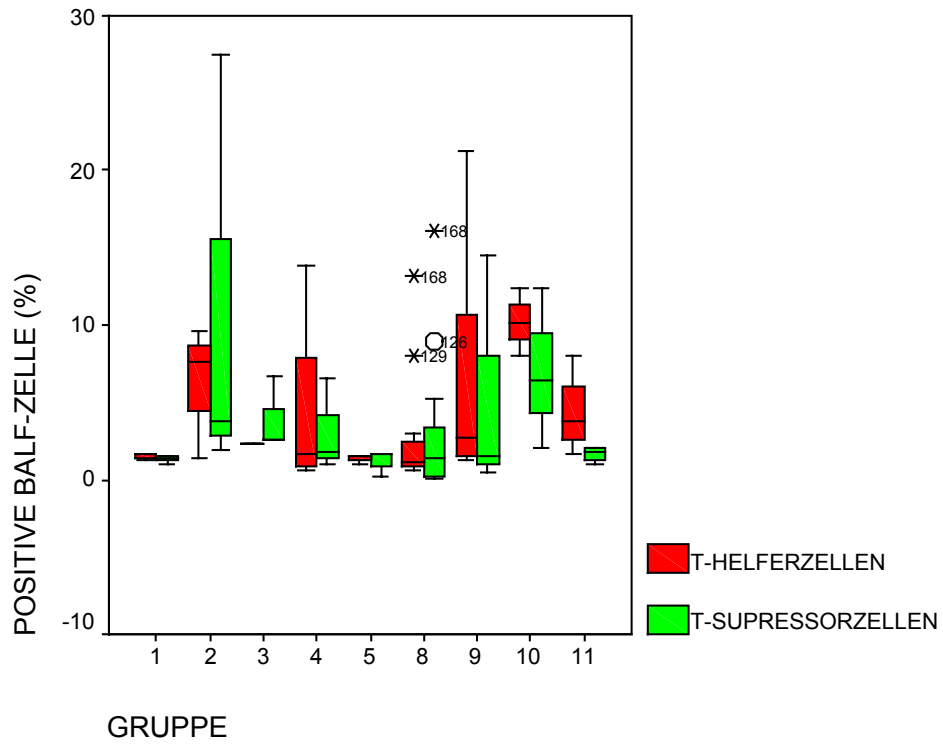


Abb. 9: Positive BALF-Zelle (%) / Gruppe

Die Untersuchungen zeigen eine Überschneidung der Ergebnisse in den Subgruppen, die keine Differenzierung zwischen den Zeitpunkten unter und nach Therapie erlauben. Für die Gruppe 6 (unter Radiotherapie) lagen keine Meßergebnisse vor.

5.3.3.5.2 Verhältnis von T-Helfer- und T-Supressorlymphozyten

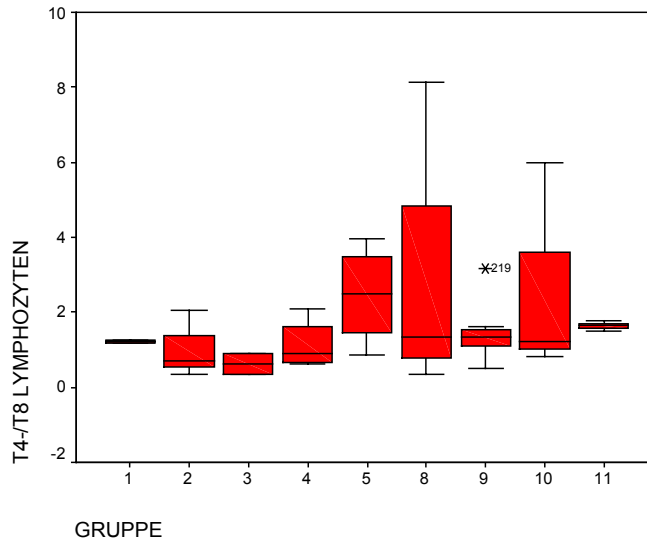


Abb. 10: T4/T8 Lymphozyten / Gruppe

Bei relativ geringer Fallzahl und hoher Streuung der Parameter schien lediglich die Gruppe nach Chemotherapie einen geringgradig verminderten T4/T8-Quotienten aufzuweisen. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,1$).

In der kleinen Gruppe der Patienten mit Pneumonitis bzw. Lungenfibrosierung ergaben sich durch die Analyse der Lymphozytensubpopulationen im Vergleich zu den Ergebnissen der Proben in den jeweiligen Gruppen tendenziell erniedrigte Werte.

5.4 Ergebnisse der biochemischen BALF-Untersuchungen

5.4.1 Quantifizierung der epithelialen Flüssigkeit (ELF)

In den bronchoalveolären Lavagen wurden auch bei standardisierter Gewinnungstechnik unterschiedliche Anteile des als Spülflüssigkeit instillierten Volumens (Recovery) zurückgewonnen. Die folgende Tabelle zeigt die zurückgewonnenen Volumina in den Patientengruppen (bezogen auf die gewonnenen Proben).

Tabelle 13: Recovery in ml in den Patientengruppen

Gruppe	Median	Minimum	Maximum	25. Perzentil	75. Perzentil
1	34,00	20,00	37,00	24,75	34,00
2	34,00	18,00	60,00	34,00	38,00
3	33,50	15,00	40,00	21,00	34,00
4	34,00	14,00	42,00	34,00	35,00
5	34,00	12,00	53,00	27,00	34,00
6	38,50	34,00	40,00	35,00	39,75
7	34,00	23,00	45,00	27,00	40,00
8	34,00	16,00	55,00	30,00	42,00
9	34,00	18,00	51,00	30,50	39,75
10	41,00	30,00	50,00	37,25	45,00
11	34,00	12,00	52,00	26,75	34,00

Die Recovery zeigte in allen Patientengruppen ein relativ ausgewogenes Verteilungsmuster, lediglich bei den Patienten, bei denen unter einer Chemotherapie nach vorangegangener Radiotherapie lavagiert wurde, war der Anteil der zurückgewonnenen BAL-Flüssigkeit mit 41 ml geringgradig erhöht (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,05$).

Die Recovery zeigte keinen Zusammenhang mit dem Vorliegen einer chronischen Bronchitis (Mann-Whitney-U-Test, $p = 0,6$).

Da alle in der Lavage analysierten Substanzen ursprünglich in dem epithelialen Flüssigkeitsfilm gelöst waren, ist eine Rekonstruktion der ursprünglichen Konzentration für den interindividuellen Vergleich der biochemischen Meßparameter wesentlich. Diese Umrechnung erfolgte mittels der Harnstoffverdünnungsmethode. Mögliche Einflüsse der unterschiedlichen Recovery auf die Berechnung der ELF wurden durch Bestimmung des ELF-Volumens pro 100 ml zurückgewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit ausgeschlossen.

Die aus BALF, Recovery und Harnstoffkonzentration errechneten ELF-Volumina wiesen in den einzelnen Gruppen nur geringe Schwankungen auf, die bei den relativ hohen Standardabweichungen in den Einzelgruppen nicht signifikant voneinander zu diskriminieren waren.

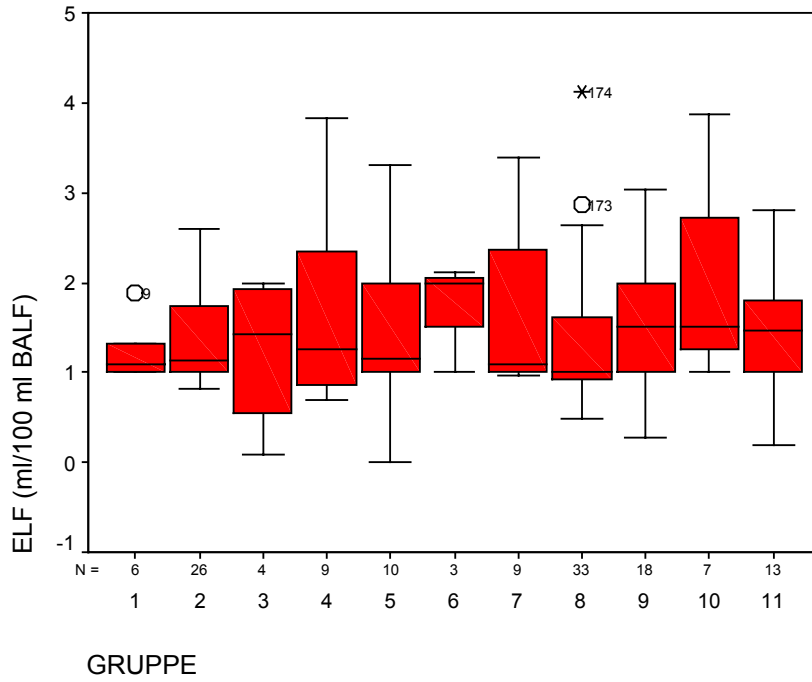


Abb. 11: ELF(ml/100ml BALF) / Gruppe

5.4.2 Gesamtprotein und Albumin

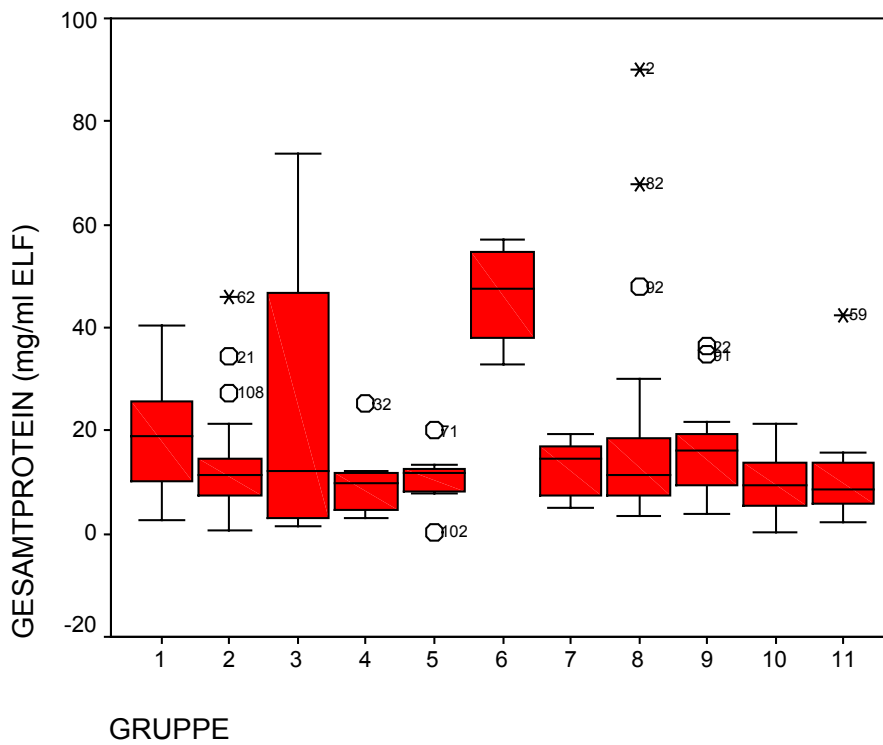


Abb. 12: Gesamtprotein (mg/ml ELF) / Gruppe

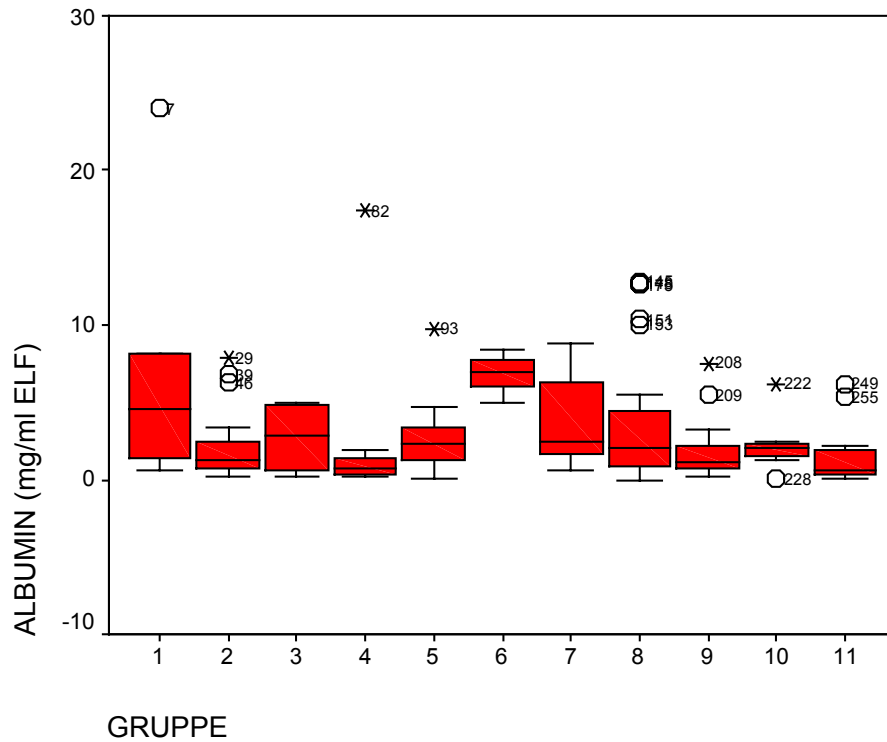


Abb. 13: Albumin (mg/ml ELF) / Gruppe

Die Konzentration von Gesamtprotein und Albumin in der BALF wurde auf das Volumen der Epithelial Lining Fluid umgerechnet und als mg/ml ELF dargestellt.

Signifikant erhöhte Werte für Gesamtprotein fanden sich in den Proben unter Strahlentherapie sowie unter Chemotherapie, sofern eine Strahlentherapie vorausgegangen war (Gruppe 10).

Als möglicher Marker einer Permeabilitätsstörung der alveolokapillären Membran wurde zusätzlich das Verhältnis von Albumin zum Gesamtprotein bestimmt.

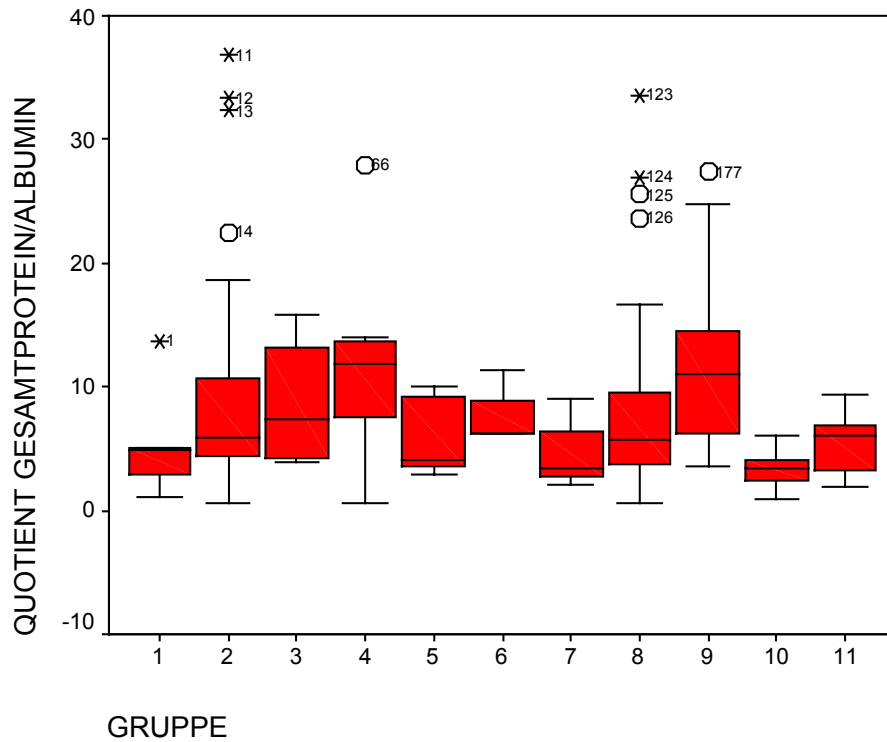


Abb. 14: Quotient Gesamtprotein/Albumin / Gruppe

Die Verteilung des Quotienten von Gesamtprotein zu Albumin zeigte ein relativ homogenes Muster. Auffällig ist der signifikante Abfall dieses Quotienten in der Gruppe der Patienten, die nach einer erfolgten Radiotherapie erneut chemotherapiert wurden (Gruppe 10, Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Weder die Protein- noch die Albuminkonzentration in der ELF zeigten eine Abhängigkeit von dem Vorliegen einer chronischen Bronchitis.

5.4.3 Nachweis spezifischer Bindegewebsproteine

Die folgenden Bindegewebsproteine wurden als Marker von Regenerierungs- bzw. Reparationsprozessen untersucht

5.4.3.1 Prokollagen-III-Peptid (P-III-P)

P-III-P wurde bestimmt, um die Kollagensynthese in der Lunge zu quantifizieren.

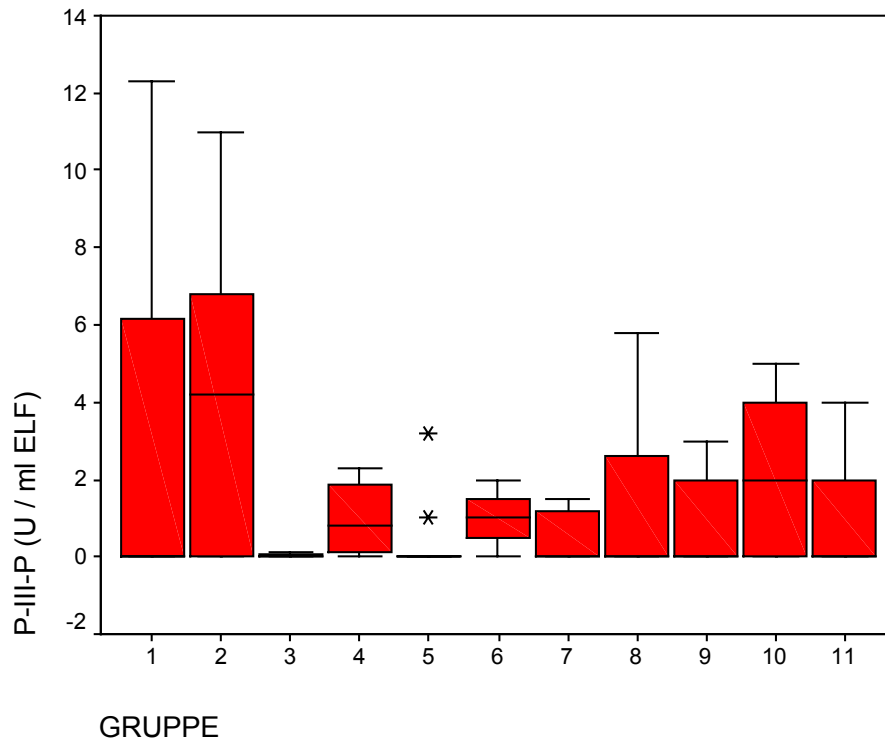


Abb. 15: P-III-P (U / ml ELF) / Gruppe

Die P-III-P Werte zeigten in den einzelnen Gruppen eine vergleichsweise große Streuung und erschienen ungerichtet. So waren die Werte nach wie unter Therapie teils erhöht, teils lagen sie im unteren Meßbereich. Bei den Patienten mit Pneumonitis lagen die Ergebnisse mit einem P-III-P-Spiegel in der ELF von 1,2 und zweimal 1,3 U/ml ELF über dem Gruppen- 75. Perzentil (Gruppe 7). In Gruppe 8 wurden in den Proben der beiden Patienten mit manifester Lungenfibrose mit 3,5 und 5,78 U/ml ELF die höchsten Werte gemessen.

5.4.3.2 Laminin-P1-Konzentrationen

In einer Vorserie fanden sich überwiegend Werte im Bereich der Nachweisgrenze des Tests, so daß wir für diese Messung eine Konzentrierung der Lavageflüssigkeit über eine fraktionierte Zentrifugation durchführten. Hierbei erfolgte eine Reduktion des Ausgangsvolumens von 2000 µl auf etwa 500 µl. Der Konzentrierungsfaktor betrug im Mittel $4,1 \pm 0,3$.

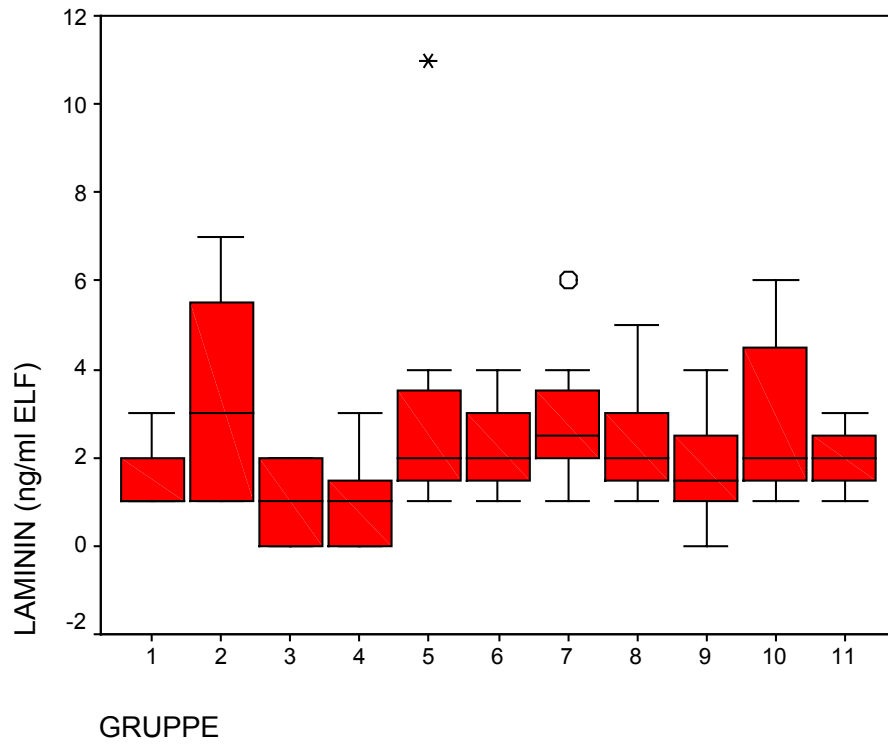


Abb. 16: Laminin (ng/ml ELF) / Gruppe

Auch diese Meßergebnisse zeigten eine relativ große Streuung der Einzelwerte, ohne daß sich gerichtete signifikante Gruppenunterschiede diskriminieren ließen.

5.5 Wachstumsfaktoren

5.5.1 Plateled derived growth factor (PDGF)

In den Patientengruppen fand sich folgende PDGF-Verteilung in der ELF:

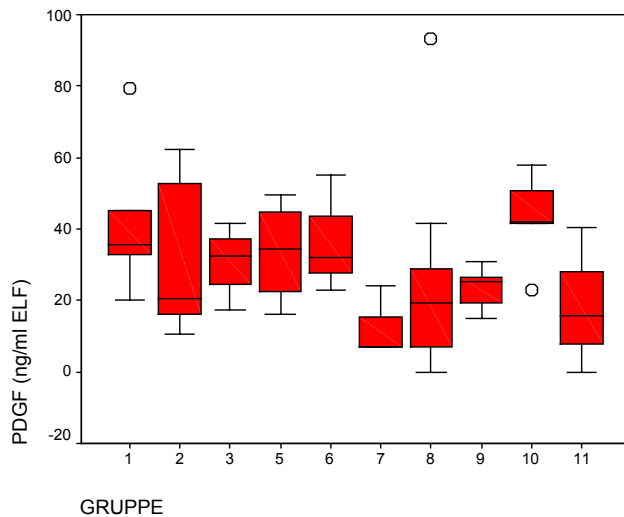


Abb. 17: PDGF (ng / ml ELF) / Gruppe

Die PDGF-Spiegel in den Gruppen zeigten bis auf die Gruppe unter Radio-Chemotherapie (Gruppe 10, Erhöhung) und die Gruppe bis 2,5 Monate bzw bis 15 Monate nach Radiotherapie (Gruppe 6 und 7) keine signifikanten Abweichungen voneinander und sind von einer deutlichen Streuung der Einzelwerte gekennzeichnet. Auch das Patienten-Subset mit klinischer pulmonaler Manifestation nach Therapie zeigte keine im Gruppenvergleich erkennbar gerichteten Ergebnisse.

5.5.2 Basic fibroblast growth factor (bFGF)

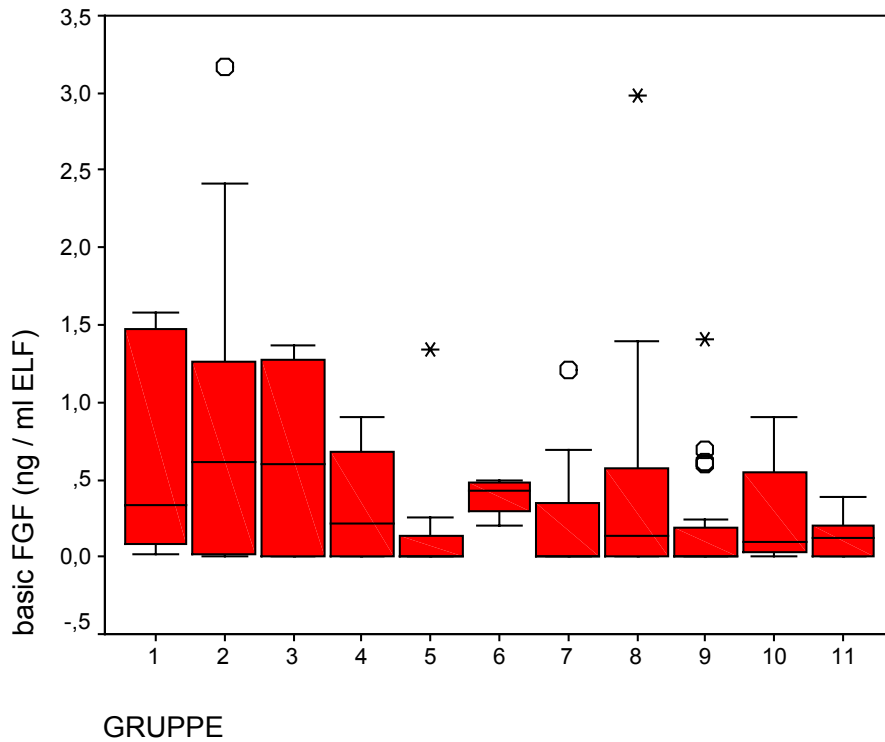


Abb. 18: basic FGF (ng / ml ELF) / Gruppe

Auffällig waren die im Vergleich zur Kontrollgruppe gering erhöhten Konzentrationen von bFGF in der Gruppe vor Therapie sowie unter wie nach Chemotherapie (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$), während nach Radatio ähnliche Werte wie in der Gruppe 11 gemessen wurden. Insgesamt zeigten die Werte jedoch eine starke Streuung innerhalb der Gruppen. Auch die Werte der 5 Patienten, die nach Therapie eine Pneumonitis oder Lungenfibrosierung entwickelt hatten, zeigten keine vom Gruppenmittel gerichtet abweichenden Ergebnisse der bFGF Spiegel in der ELF.

5.5.3 Epidermal growth factor (EGF)

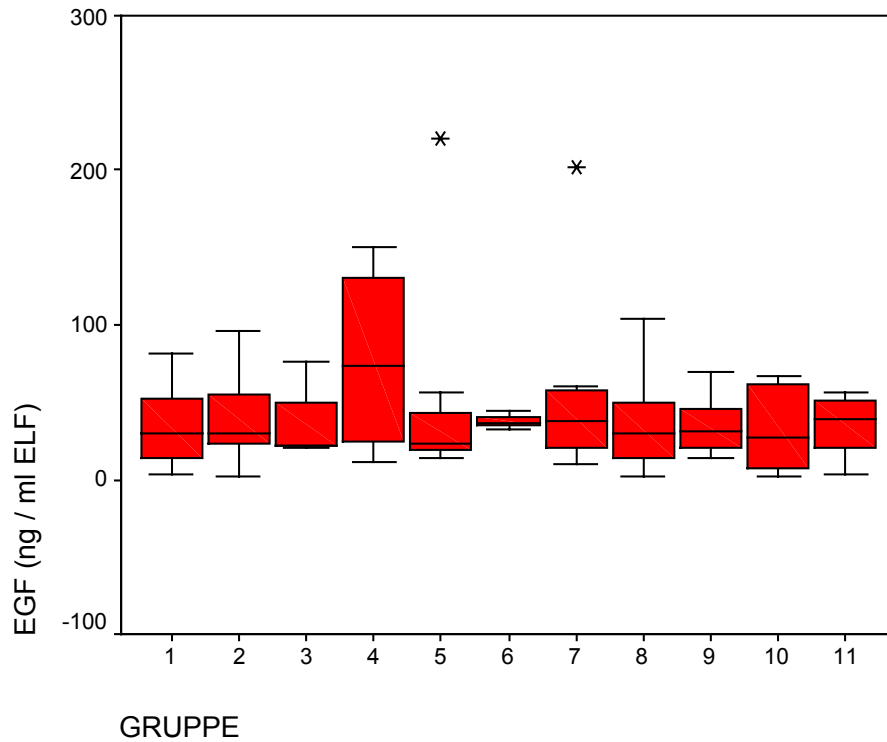


Abb. 19: EGF (ng / ml ELF) / Gruppe

Die Meßergebnisse zeigten ähnliche EGF-Spiegel in allen Subgruppen, signifikante Gruppenunterschiede bestanden nicht. Diese Ergebnisse belegen, daß EGF kein sensibler Marker für therapieassoziierte Lungenveränderungen bei Patienten mit Bronchialkarzinom ist. Lediglich ein EGF-Spiegel in den Proben der Patienten mit Pneumonitis zeigte einen erhöhten Wert, während in den Proben der Patienten mit Lungenfibrose keine erhöhten Spiegel auftraten.

5.5.4 Transforming growth factor beta (TGF-beta)

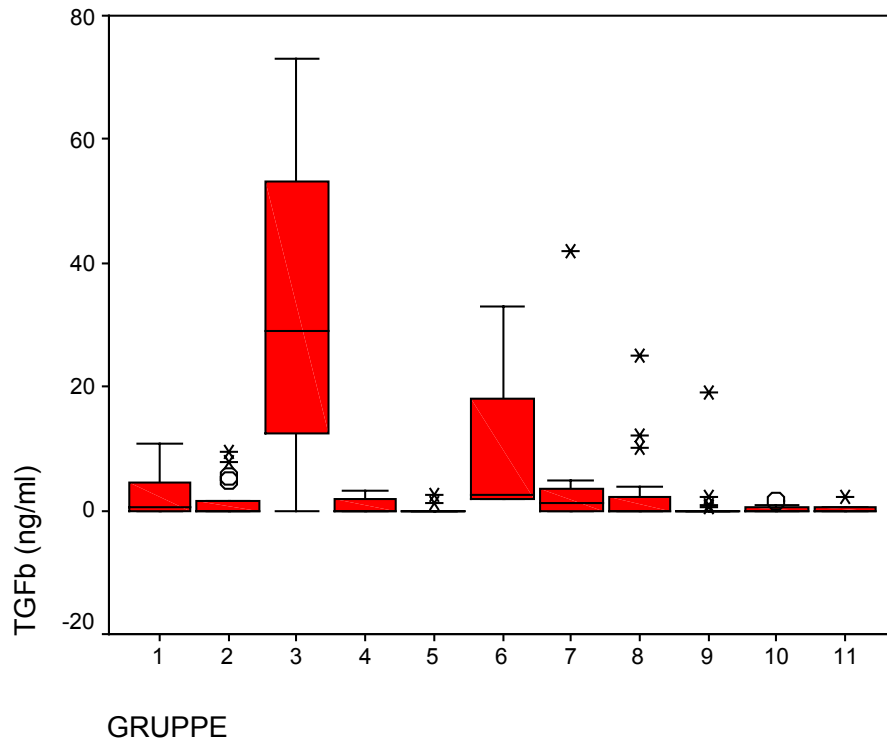


Abb. 20: TGFv (ng / ml) / Gruppe

In den Gruppen fand sich ein signifikanter Anstieg der TGF-beta-Spiegel nach Chemotherapie (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$), jedoch kein Anstieg nach Radiotherapie. Hier fielen jedoch einzelne erhöhte Werte in den Proben auf, die 2,5 bis 15 Monate nach Radiotherapie gewonnen wurden und den Proben von Patienten entsprechen, die eine Lungenfibrose entwickelt haben (Gruppe 8). Auch in Gruppe 7 ist einer der deutlich gegenüber dem Gruppenmedian erhöhten Werte (siehe Graph) einer Probe eines Patienten mit Pneumonitis zuzuordnen.

5.5.5 Vascular epithel growth factor (VEGF)

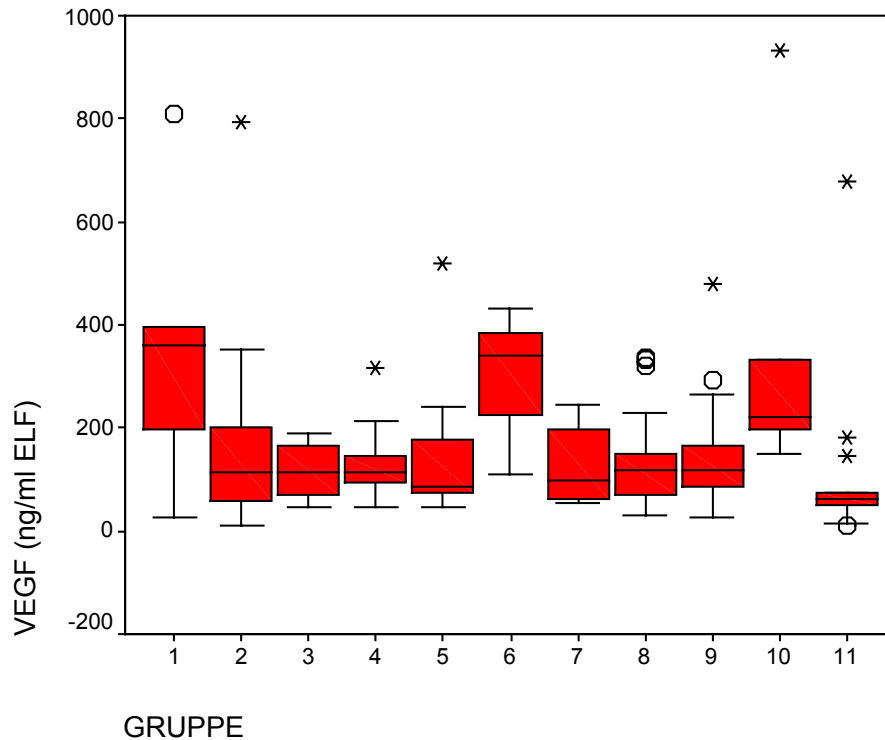


Abb. 21: VEGF (ng / ml ELF) / Gruppe

Die Gruppen 1, 2, 6 und 10 zeigten gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte VEGF-Werte (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$), wobei die Werte vor Therapie, also in der Gruppe mit der größten Tumorlast, und unter Radiotherapie am höchsten lagen. Auffällig war weiterhin, daß die VEGF-Spiegel in der Chemotherapiegruppe signifikant höher lagen, wenn eine Radiotherapie vorausgegangen war (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). In den Proben der Patienten, die eine Pneumonitis entwickelt hatten, fanden sich gegenüber der Werteverteilung der Gruppe (Median 99,5 ng/ml ELF, 25. Perzentil 62,5 ng/ml ELF, 75. Perzentil 221,8 ng/ml ELF) mit 212, 219 und 233 ng/ml ELF deutlich erhöhte Werte. Auch bei den beiden Patienten, bei denen eine pulmonale Fibrosierung bestand, fanden sich überproportional hohe VEGF-Spiegel: Median 117,8 ng/ml ELF, 25. Perzentil 67,7 ng/ml ELF, 75. Perzentil 151,3 ng/ml ELF, Probe 1: 310 ng/ml ELF, Probe 2 320 ng/ml ELF.

In einem Subset von 16 Patienten wurden zusätzlich die VEGF-Spiegel im peripheren Blut gemessen. Hier ergab sich ein nicht sehr ausgeprägter, jedoch signifikanter direkter Zusammenhang ($r = 0,38$, $p < 0,01$, Spearman Korrelationskoeffizient).

5.6 Zytokine

5.6.1 Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF-alpha)

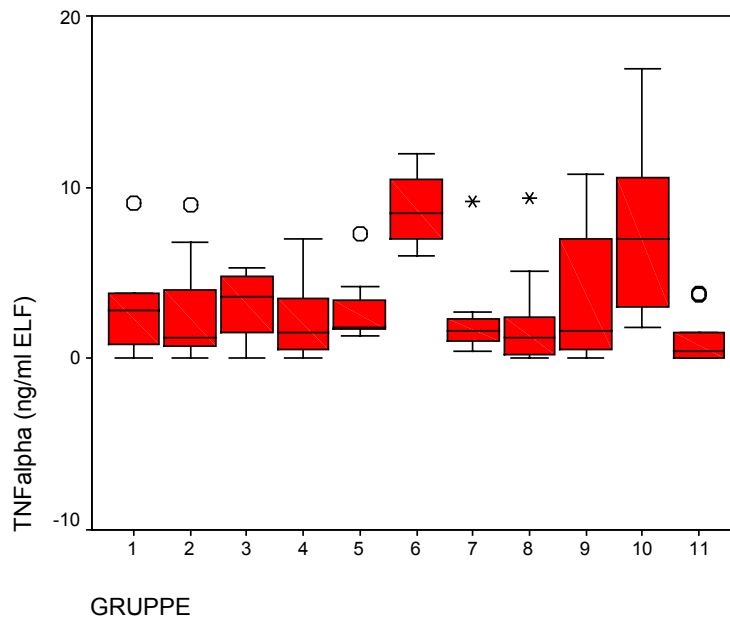


Abb. 22: TNFalpha (ng / ml ELF) / Gruppe

Das Ergebnis zeigte gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöhte TNF-alpha-Spiegel in der Patientengruppe, die bestrahlt wurde, und in der Chemotherapiegruppe, wenn eine Radiatio vorausgegangen war (Mann-Whitney-U-Test, jeweils $p < 0,01$). Auch die Patienten mit manifester pulmonaler Therapiefolge zeigten erhöhte TNF-alpha Werte: Gruppe 7 (Werte in Klammern von Gruppe 8): Median 0,54 (0,66) ng/ml ELF, 25. Perzentil 0,24 (0,12) ng/ml ELF, 75. Perzentil 1,75 (0,98) ng/ml ELF, Proben 1-3 (1 und 2): 1,6, 1,8 und 2,1 (1,2, 1,4) ng/ml ELF.

5.6.2 Interleukin 1 (IL-1).

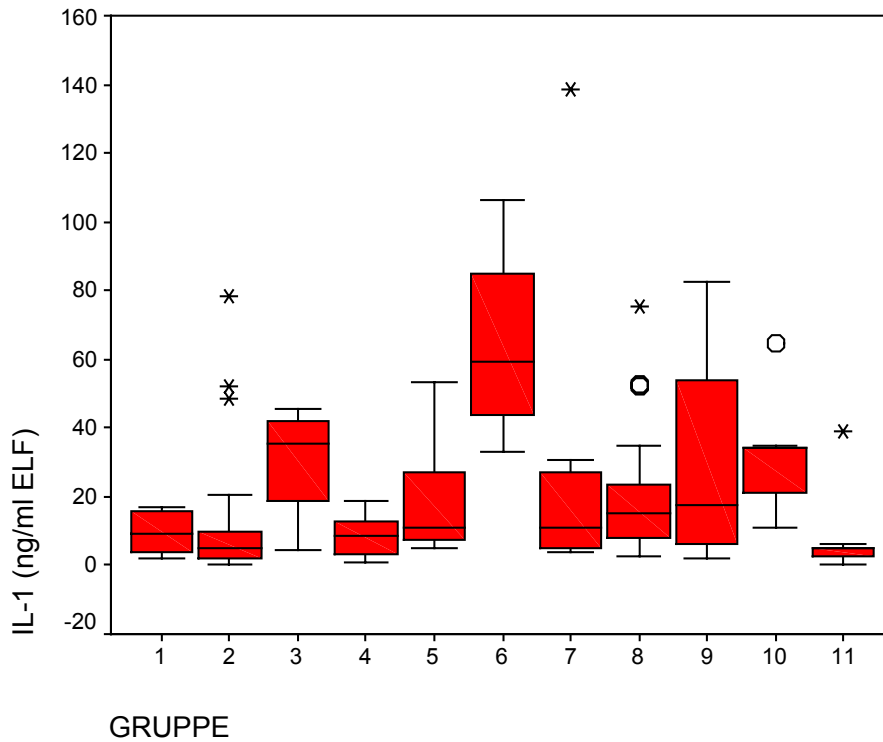


Abb. 23: IL-1 (ng / ml ELF) / Gruppe

Die höchsten Werte für IL-1 in der ELF fanden sich in der Gruppe unter Radiotherapie, während die Ergebnisse vor und unter Chemotherapie ähnlich und von denen der Kontrollgruppe nicht different waren. Signifikant erhöhte Werte fanden sich in den Proben der Patienten, die sich nach Radiotherapie einer erneuten Chemotherapie unterzogen. Auch die Werte der Patienten mit Pneumonitis (Gruppe 7) oder Lungenfibrosierung (Gruppe 8) zeigten mit Werten, die in den Gruppen über der 75. Perzentil (Gruppe 7: 28,9, Gruppe 8: 23,9 ng/ml ELF) lagen, erhöhte IL-1 Spiegel.

5.6.3 Interleukin 2 (IL-2)

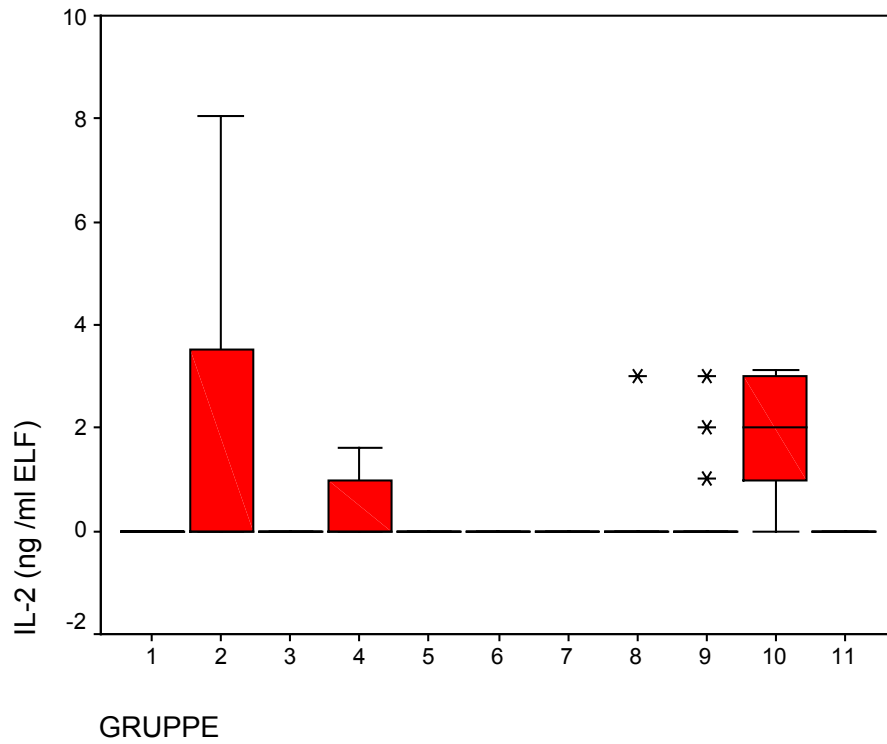


Abb. 24: IL-2 (ng / ml ELF) / Gruppe

In den meisten Gruppen lagen die IL-2-Spiegel unter der Nachweisgrenze. Erhöhte Werte fanden sich in den beiden Chemotherapiegruppen, nicht jedoch in den Proben der Patienten, die radiotherapiert wurden. Auch bei den Patienten mit Pneumonitis oder Lungenfibrose war IL-2 nicht nachweisbar.

5.6.4 Interleukin 6 (IL-6)

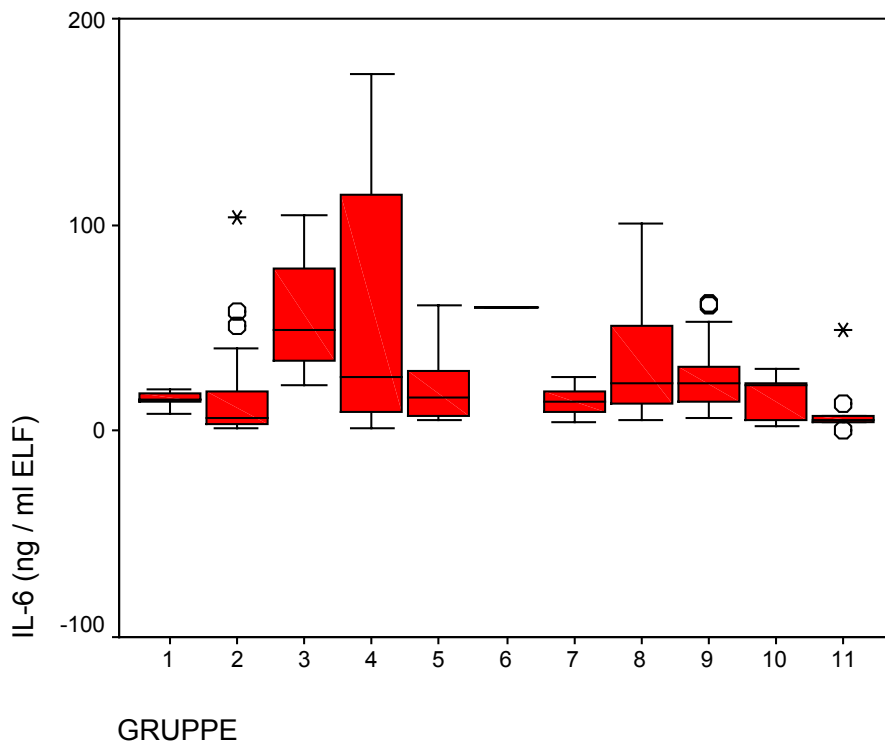


Abb. 25: IL-6 (ng / ml ELF) / Gruppe

In den Gruppen fanden sich unter Therapie gegenüber der Kontrollgruppe keine erhöhten IL-6-Werte, während nach der Chemotherapie (Gruppe 3 und 4) IL-6 vermehrt in den ELF-Proben nachweisbar war. Hierbei ist der IL-6 Wert bis 2,5 Monate nach Chemotherapie signifikant höher als 2,5 Monate nach Strahlentherapie. Unter Radiatio stand nur ein Meßwert zur Verfügung.

Die Patienten mit Pneumonitis und Fibrose zeigten mit Werten überhalb der 75. Perzentile innerhalb ihrer Gruppen (Gruppe 7 und 8) erhöhte IL-6 Spiegel (Gruppe 7: Median 14,5 ng/ml ELF, 25. Perzentil 8,9 ng/ml ELF, 75. Perzentil 20,2 ng/ml ELF, Proben 1-3: 21, 23 und 30 ng/ml ELF, Gruppe 8: Median 23,1 ng/ml ELF, 25. Perzentil 12,0 ng/ml ELF, 75. Perzentil 51,7 ng/ml ELF, Proben 1 und 2: 55 und 63 ng/ml ELF).

5.6.5 Interleukin 8 (IL-8)

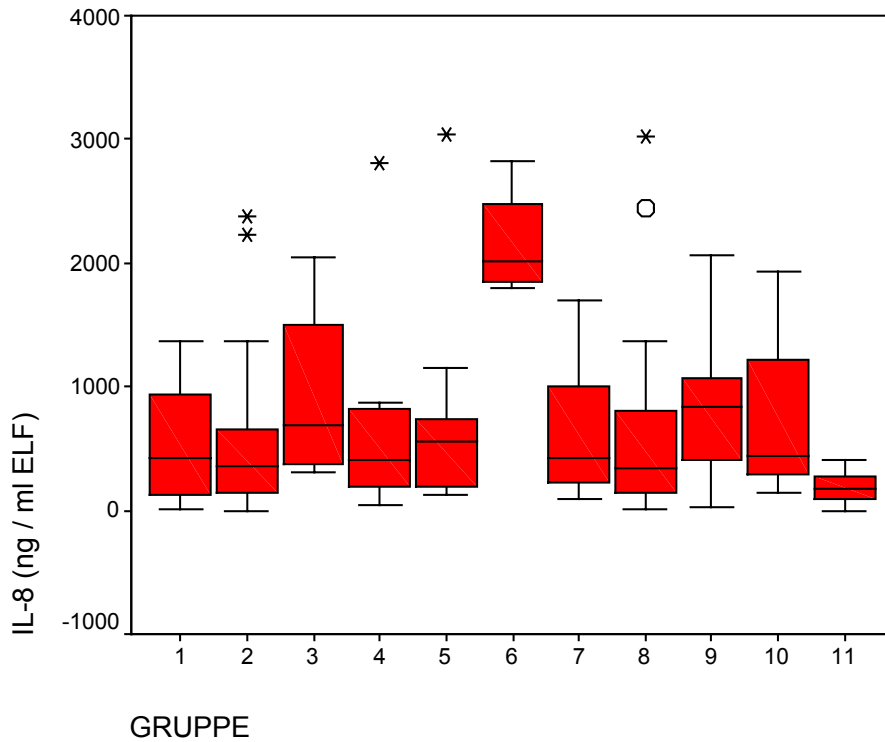


Abb. 26: IL-8 (ng / ml ELF) / Gruppe

In allen Therapiegruppen fanden sich gegenüber den Werten in Gruppe 11 erhöhte IL-8- Spiegel in der ELF, wobei die höchsten Werte in der Gruppe unter Radiotherapie gemessen wurden. In den Proben vor Chemotherapie war gegenüber der Kontrollgruppe der IL-8 Spiegel nicht erhöht. Auffällig war, daß noch lange Zeit nach Chemo- bzw. Strahlentherapie die IL-8 Spiegel gegenüber der Kontrollgruppe erhöht blieben. Die IL-8-Spiegel der Gruppe 9 waren gegenüber der Gruppe 8 nicht signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,06$). Die höchsten Werte in den Gruppen 7 und 8 wurden von Proben der Patienten mit pulmonaler Krankheitsaktivität gebildet.

5.7 Parameter des Oxidantien/Antioxidantien-Gleichgewichts

5.7.1 Methioninsulfoxidgehalt alveolärer Proteine als Indikator der pulmonalen oxidativen Belastung

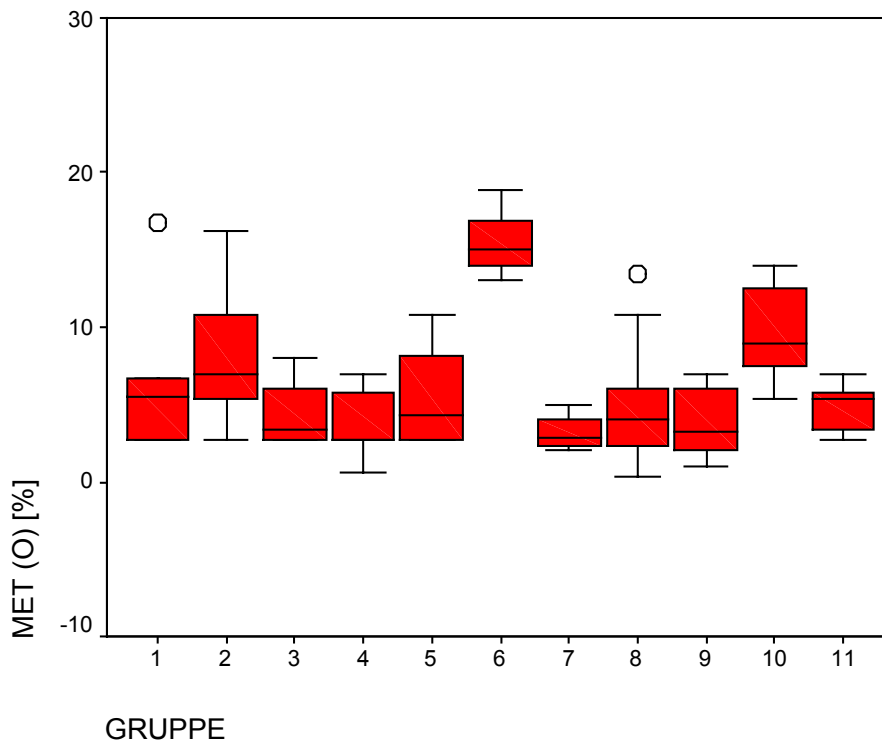


Abb. 27: MET (O) [%] / Gruppe

Der Anteil oxidierter zu nicht oxidierten Methioninresten war in den Therapiegruppen (Gruppe 2, 6 und 10) sowohl gegenüber der Gruppe vor Therapie als auch der Referenzgruppe signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Die höchsten relativen Werte oxidierten Methionins fanden sich in der Gruppe unter Strahlentherapie. In den Proben nach Radio- wie Chemotherapie lag der oxidierte Methioninanteil in einem untereinander wie zur Kontrollgruppe ähnlichem Niveau. Ebenfalls nicht signifikant different war der Methioninsulfoxidgehalt zwischen Rauchern und Nichtrauchern in den Einzelgruppen (Kruskal-Wallis-Test, asymptotische Signifikanz: $p = 0,09$). Der Anstieg des Methioninsulfoxidgehaltes der ELF-Proteine war an einen Glutathion-Konzentrations-Schwellenwert gekoppelt, der bei etwa 400 μM lag (nicht dargestellt).

In den Gruppen 7 und 8 lagen die Werte der Patienten mit Pneumonitis oder Lungenfibrose deutlich über der jeweiligen 75. Perzentile: Gruppe 7 (in Klammern Werte für Gruppe 8): Median 2,9% (4,1%), 25. Perzentil 2,2% (2,1%), 75. Perzentil 4,5% (5,9%), Patientenproben 1-3: 5,2%, 5,4%, 6,1% (7,3%, 8,4%).

5.7.2 Glutathion

Die mittlere Gesamt-Glutathionkonzentration in der ELF lag bei den Proben, die von Rauchern gewonnen worden waren, über alle Gruppen gemittelt um den Faktor 2,5 höher (nicht dargestellt).

Die höchsten Glutathion-Werte wurden in der Gruppe vor Therapie gemessen, die jedoch zu den Proben in der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht waren (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,2$), was durch den Umstand erklärt werden könnte, daß sich in der Kontrollgruppe ausschließlich Raucher befanden.

Deutlich erniedrigte Glutathion-Werte fanden sich in den Gruppen unter Chemotherapie, wobei hier zudem der Anteil des reduzierten Glutathions am Gesamt-Glutathion vermindert war.

Glutathionkonzentration in der ELF

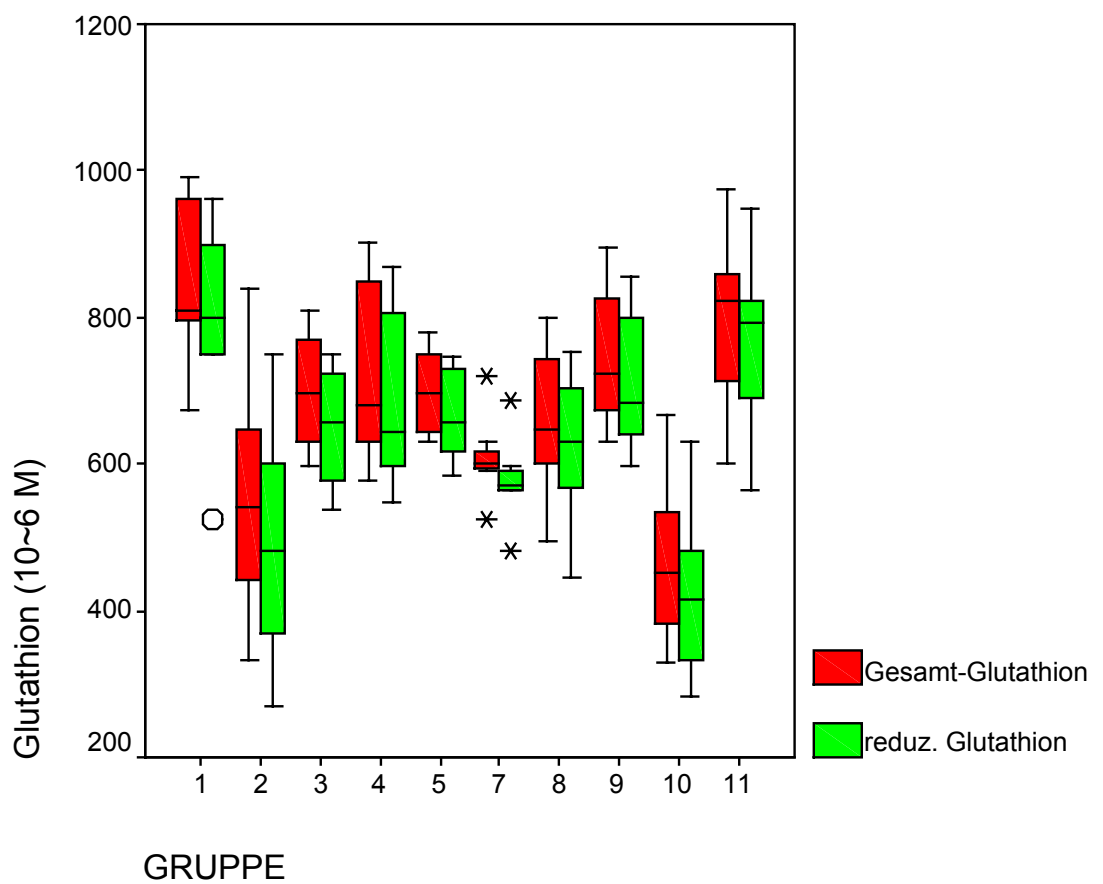


Abb. 28: Glutathion (10~6 M) / Gruppe

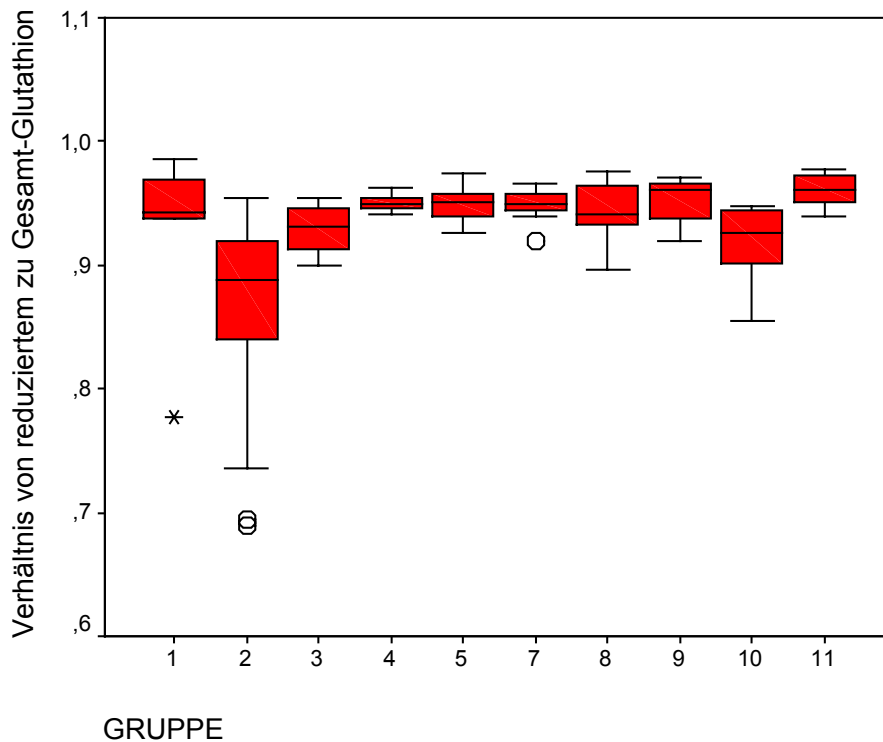


Abb. 29: Verhältnis von reduziertem zu Gesamt-Glutathion / Gruppe

Glutathion-Werte unter Strahlentherapie (Gruppe 6) standen nicht zur Verfügung. Es war jedoch auffällig, daß nach Chemo- wie Strahlentherapie ein zeitabhängiger Erholungsvorgang mit langsamem Anstieg der Glutathion-Konzentration in der ELF zu beobachten war. Bemerkenswert hierbei war, daß sich das Verhältnis von reduziertem zu Gesamt-Glutathion rascher als der Gesamt-Glutathion-Wert normalisierte und lediglich unmittelbar unter der Therapie vermindert war.

In der Gruppe von Patienten mit Pneumonitis oder Lungenfibrosierung fanden sich jeweils deutlich erniedrigte Werte für Gesamt-Glutathion und ein verminderter Anteil an reduziertem Glutathion:

Gruppe 7: Glutathion Median $600 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH $570 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, 25. Perzentil Glutathion $564 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH $541 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, 75. Perzentil Glutathion $598 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH $582 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, Proben 1-3: Glutathion 542, 548 und $554 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH 529, 521, $529 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Gruppe 8: Glutathion Median $648 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH $631 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, 25. Perzentil Glutathion $600 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH $567 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, 75. Perzentil Glutathion $750 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH $726 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, Proben 1 und 2: Glutathion 562 und $555 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, GSH 531 und $520 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

5.8 Hitzeschockproteine (HSP)

Diese Untersuchungen konnten an einem Subset von 21 Proben durchgeführt werden. Dargestellt wird der Prozentsatz von Alveolarmakrophagen, bei denen durchflußzytometrisch eine Expression des jeweiligen Hitzeschockproteins nachweisbar war.

Tabelle 14: Prozentsatz von Alveolarmakrophagen, bei denen durchflußzytometrisch eine Expression des jeweiligen Hitzeschockproteins nachweisbar war

Gruppe	2	3	4	5	7	8	9	11
HSP-70 (%)								
24,18						X		
27,57		X						
59,92							X	
62,87						X		
67,45								X
68,93							X	
73,54					X			
79,14			X					
80,06	X							
80,91	X							
84,02								X
86,01								X
86,42						X		
86,62				X				
87,20	X							
88,15	X							
90,19								X
91,60							X	
94,68					X			
96,00						X		
99,32						X		
Gruppe	2	3	4	5	7	8	9	11

Tabelle 15: Prozentsatz von Alveolarmakrophagen, bei denen durchflußzytometrisch eine Expression des jeweiligen Hitzeschockproteins nachweisbar war

Gruppe	2	3	4	5	7	8	9	11
HSP-90 (%)								
20,61							X	
23,93							X	
26,49						X		
29,00						X		
44,28								X
46,17		X						
47,10						X		
47,27						X		
48,21								X
55,48					X			
59,06								X
63,53							X	
67,52	X							
84,57	X							
85,82	X							
91,71								X
91,98			X					
94,13				X				
94,54					X			
98,25	X							
99,54						X		
Gruppe	2	3	4	5	7	8	9	11

Für die Gruppen unter Radiotherapie (Gruppe 6) und unter Chemotherapie nach vorangegangener Radiotherapie standen keine Meßdaten zur Verfügung. Für HSP-90 schien sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Expression in den Proben unter Chemotherapie (Gruppe 2) anzudeuten. Hier fand sich in Fisher's exaktem Test für kleine Stichproben eine Signifikanz von lediglich 0,2 (nicht signifikant), jedoch eine Punkt-Wahrscheinlichkeit von 0,043.

Zusammenfassend konnte an den vorliegenden Ergebnissen zur HSP-70 und HSP-90 Expression an BALF-Zellen lediglich tendenziell eine vermehrte HSP-90 Expression unter Chemotherapie abgelesen werden.

5.9 Korrelationen zwischen den einzelnen Untersuchungsparametern

Die Ergebnisse des Zusammenhangs der gemessenen Parameter in der ELF untereinander sind in Tabelle 16 dargestellt. Erwartungsgemäß zeigen die Konzentrationen von Gesamt-Glutathion, reduziertem Glutathion und Methioninsulfoxidgehalt einen sehr engen Zusammenhang, der die Interaktion dieser zentralen Parameter des pulmonalen Oxidantien/Antioxidantien-Systems dokumentiert. Weiterhin sind insbesondere die Zytokine IL-6 und IL-8, hochsignifikant invers mit der Glutathion-Konzentration in der ELF verbunden. Ebenfalls ein enger Zusammenhang besteht zwischen der Gesamt-Zellzahl und dem Anteil an neutrophilen Granulozyten, also den Zellpopulationen, die Zytokineinwirkung reaktive Sauerstoffspezies generieren (s.u.).

Tabelle 16: Korrelationskoeffizienten zwischen ELF- Parametern (Korrelationskoeffizient "r" nach Freadman, Signifikanzniveau ("p") darunter)

Parameter	IL-1	IL-2	IL-6	IL-8	TNF-a	TGFb	VEGF	EGF	GN	GSH	Met(O)
IL-2	0,25 <0,05										
IL-6	0,35 <0,01	0,25 <0,05									
IL-8	0,51 <0,01	0,43 <0,01	0,49 <0,01								
TNF-a	0,61 <0,01	0,24 <0,05	0,37 <0,01	0,53 <0,01							
TGF-b	0,26 <0,05	0,10 n.s.	0,43 <0,01	0,32 <0,05	0,42 <0,01						
EGF	0,14 n.s.	0,07 n.s.	0,13 n.s.	0,11 n.s.	0,08 n.s.	0,32 <0,05					
VEGF	0,23 <0,05	0,25 <0,05	0,31 <0,01	0,48 <0,01	0,41 <0,01	0,24 <0,05	0,36 <0,05				
GN	-0,27 <0,05	-0,33 <0,01	-0,41 <0,05	-0,61 <0,01	-0,54 <0,01	-0,25 <0,05	-0,31 <0,01	0,13 n.s.			
GSH	-0,25 <0,05	-0,32 <0,01	-0,42 <0,05	-0,60 <0,01	-0,55 <0,01	-0,22 <0,05	-0,33 <0,01	0,08 n.s.	0,99 <0,01		
Met(O)	0,31 <0,05	0,22 <0,05	0,64 <0,01	0,56 <0,01	0,49 <0,01	-0,07 <0,01	0,43 <0,01	0,21 n.s.	0,82 <0,01	0,83 <0,01	
Zellenzahl	0,31 <0,05	0,22 <0,05	0,58 <0,01	0,61 <0,01	0,42 <0,01	0,12 n.s.	0,33 <0,01	0,04 n.s.	-0,47 <0,01	-0,49 <0,01	0,62 <0,01
PMN	0,36 <0,01	0,29 <0,05	0,61 <0,01	0,57 <0,01	0,41 <0,01	0,45 <0,01	0,47 0,01	0,13 n.s.	-0,53 <0,01	-0,55 <0,01	0,58 <0,01
Recovery	0,11 n.s.	0,10 n.s.	0,04 n.s.	0,08 n.s.	0,07 n.s.	0,12 n.s.	0,06 n.s.	0,03 n.s.	0,11 n.s.	0,03 n.s.	0,02 n.s.

Legende: n.s. : nicht signifikant; IL-1 : Interleukin 1; IL-2 : Interleukin 2; IL-6 : Interleukin 6; IL-8 : Interleukin 8; TNF-a : TNF-alpha; TGF-b : TGF-beta; EGF : epidermal growth factor; VEGF : vaskular endothelial growth factor; GN : Gesamt-Glutathion; GSH : reduziertes Glutathion; Meth(O) : prozentualer Anteil der oxidierten Methioninreste am Gesamtmethioningehalt der ELF-Proteine; PMN : polymorphkernige neutrophile Granulozyten.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die systematische Analyse von bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom unter zytoreduktiver Therapie. Untersucht wurden Kenngrößen der pulmonalen Toxizität unter Standard-Chemotherapieregimen, wie sie derzeit zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Bronchialkarzinoms routinemäßig zur Anwendung kommen, sowie unter Strahlentherapie. Durch die konsekutive Untersuchung eines großen Patientenkollektivs, das sich in einer Lungenheilstätte zur Therapie befand, konnten Lavagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und unter unterschiedlichen Therapiemodalitäten gewonnen werden.

Insgesamt wurden 261 Lavageproben von 199 Patienten untersucht, die vor, unter oder nach einer zytoreduktiven Therapie standen, wobei 54 Proben unter Chemotherapie und 174 Proben unter oder nach Radio- und/oder Chemotherapie gewonnen wurden.

6.1 Zelluläre Bestandteile der BALF

In unserer Untersuchung fand sich in den BALF-Proben der Patienten unter Radio- sowie Chemotherapie eine signifikant erhöhte Zellzahl, weiterhin ein erhöhter Anteil an Lymphozyten. Die Vermehrung der Gesamtzellzahl ging hierbei mit einer Erhöhung des Gesamt-Proteingehaltes der ELF sowie einer Verminderung des Quotienten von Gesamt-Protein und Albumin im Sinne einer eingeschränkten Schrankenfunktion der alveolokapillären Membran einher. Bereits in den 70er Jahren wurde in Lavagen eine Vermehrung der Gesamtzellzahl als unspezifischer Parameter einer akuten Lungentoxizität bzw. eines akuten Lungenschadens gewertet (Kylstra et al., 1971; Reynolds et al., 1974; Schweisfurth et al., 1990) und in der Folge in zahlreichen klinischen Studien bestätigt (Thrall et al., 1982; White et al., 1987; Faith et al., 1992; Maasilta et al., 1993; Schnabel et al., 1997). Auch tierexperimentell finden sich etwa bei der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose (Fahey et al., 1982; Thrall et al., 1982; Low et al., 1988) oder in anderen Modellen der akuten Lungenschädigung in der Initialphase eines Lungentraumas eine Vermehrung des BALF-Zellgehaltes (Bassett et al., 1989; Leigh et al., 1997; Afaq et al., 1998).

Es ist die These dieser Arbeit, daß die therapieassoziierte akute Lungenschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt ist. Dies wird auch durch die erhöhte Zellzahl in den BALF-Proben unter Chemotherapie als Ausdruck einer Schrankenstörung sowie eines vermehrten Recruitments von Entzündungszellen indirekt belegt. Weiterhin wird sie bestätigt durch die in den Proben der Patienten unter Strahlentherapie nochmals deutlich erhöhte Zellzahl mit vermehrtem Anteil von Granulozyten und Lymphozyten. Hier stellte sich bei den Patienten auch ohne die klinischen Symptome einer manifesten Lungenschädigung eine subklinische Pneumonitis bzw. lymphozytäre Alveolitis als Folge der Strahleneinwirkung dar, die entsprechend dem physikalischen Prinzip der Strahlenschäden ROS-vermittelt ist (Vergara et al., 1987; Calhoun, 1991; Monson et al., 1998).

Interessanterweise lag die Zellzahl in der Lavage der Patienten, die nach einer Radiatio erneut chemotherapiert wurden, höher als unter primärer Chemotherapie. Dieser Effekt wurde nicht nur bei der Zellzahl, sondern bei den meisten anderen in dieser Arbeit untersuchten Parametern beobachtet.

Diese vermehrte pulmonale Reaktion, die insbesondere unter einer Chemotherapie nach Strahlentherapie aufgetreten war, belegt eindrücklich die Interaktionen und mögliche Potenzierung von therapieassoziierten toxischen Prozessen in der Lunge und weist damit auf die mögliche Grundlage der klinisch beobachteten hohen pulmonalen Nebenwirkungsrate in der multimodalen Therapie des Bronchialkarzinoms hin (Turrisi et al., 1988; Gregor et al., 1997). Sie belegt weiterhin das Persistieren der zellulären und interzellulären Krankheitsaktivität nach pulmonaler Bestrahlung, ein Phänomen, das unter dem Begriff des Zytokin-Netzwerkes bzw. der persistierenden Zytokinkaskade nach Strahlentherapie beschrieben wurde (s.u.) (Rubin et al., 1992; Rubin et al., 1995).

6.2 Zytokine und Wachstumsfaktoren

In der vorliegenden Arbeit wurden in der Lavageflüssigkeit der Patienten in den Therapiegruppen erhöhte Zytokin-Konzentrationen (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) als Hinweis einer vermehrten toxischen Reaktion unter zytoreduktiver Therapie gefunden, wobei diese Parameter durchgängig in der kleinen Patientengruppe mit Pneumonitis oder Lungenfibrosierung die höchsten Werte zeigten.

Zytokine sind als Mittlerstoffe des akuten Lungenschadens in zahllosen klinischen wie experimentellen Untersuchungen im peripheren Blut wie in der Lavageflüssigkeit beschrieben worden, wobei bereits 1988 die zytokinvermittelte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten als wesentlicher Pathomechanismus der Pneumokoniose erkannt wurde (Maly, 1988). Im selben Jahr wurde am Makrophagen der Ratte gezeigt, daß diese Zellen unter oxidativem Stress vermehrt Zytokine ausschütten (Warren et al., 1988). Damit werden immunkompetente Zellen durch Zytokine nicht nur zur Generierung von ROS stimuliert. Diese reaktiven Sauerstoffspezies führen im Sinne einer sich selbst verstärkenden Kaskade selbst wiederum zu einem erheblichen Zytokin-Release und damit einer vermehrten Generierung von ROS durch ortsständige wie immunkompetente Zellen (Kelley, 1990). Dieser sich selbst verstärkende Mechanismus im Wechselspiel zwischen Zytokin-Release und ROS-Generierung führte zu der Begriffsbildung des Zytokin-Netzwerkes, das bereits 1993 als entscheidende Größe der Krankheitsaktivität von interstitiellen Lungenerkrankungen allgemein sowie insbesondere von der alveolären Lungenfibrose postuliert wurde (Rochester et al., 1993).

Im selben Jahr wurden die ersten Ergebnisse von Versuchen publiziert, am Tier pulmonale Folgeschäden der Strahlentherapie durch Gabe von Zytokinen und damit den Influx von Entzündungszellen in das Parenchym zu modulieren (Rosiello et al., 1993). Ein Jahr zuvor war die Genese der strahleninduzierten Pneumonitis und Fibrose im Tierversuch molekularbiologisch differenziert und unterschiedlichen Pathomechanismen zugeordnet worden (Rubin et al., 1992), eine Hypothese, die zwei Jahre später von der selben Arbeitsgruppe widerrufen wurde (Rubin et al., 1995).

Entscheidend in der Publikation von 1982 war jedoch die erstmalige Erkenntnis, daß die zuvor bestehende Meinung, nach Einwirken des Traumas (Bestrahlung) käme es zu einer Latenzzeit und erst dann mit erneuter Krankheitsaktivität zur Ausbildung der Pneumonitis oder Lungenfibrose, durchbrochen wurde. Gegen diese gängige Vorstellung, die von dem klinischen Verlauf der Symptompräsentierung bestimmt war, wurde nun eine kontinuierliche Krankheitsaktivität postuliert und durch eine persistierende Zytokinaktivität belegt, die auch noch Monate nach Bestrahlung meßbar gewesen war. Wesentlich neu war damals weiterhin, daß diese Zytokinaktivität auch bei den Tieren nachweisbar war, die klinisch keine Krankheitsaktivität boten (Rubin et al., 1992).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fand sich bei den von uns untersuchten Proben nicht nur bei Patienten mit manifesten Folgeschäden der Strahlentherapie, sondern auch bei den Patienten ohne klinische Symptomatik eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Erhöhung von TNF-alpha, IL-1, IL-6 und IL-8, wobei diese Konzentrationen mit den Zahlen ihrer Ziel- und Effektorzellen in der BALF (Gesamtzellzahl, neutrophile Granulozyten) einen signifikanten Zusammenhang zeigten.

IL-1 wies in den Patientenproben deutlich erhöhte Werte unter Strahlentherapie sowie unter Chemotherapie auf, sofern eine Radiatio vorangegangen war, und erschien damit als akute Stress-Antwort auf die Therapie in der Lavageflüssigkeit. Der Expression von IL-1 könnte hierbei eine protektive Rolle zuzukommen, da im Tierversuch durch Gabe von TNF, nicht jedoch von IL-1 ein akutes Lungenversagen induziert werden konnte (Eichacker et al., 1991). Somit erscheint IL-1 als möglicher Indikator des therapieassoziierten Lungenschadens, obwohl es IL-6, ein zentrales Zytokin in der Genese des akuten wie chronischer Lungenschadens, aktiviert (Shahar et al., 1996).

Für diese These könnte auch sprechen, daß IL-1 gegenüber Bleomycin-induzierten Lungenschäden im Tierversuch protektiv ist (Smith et al., 1998). Da der Wirkmechanismus der Lungenschädigung von Bleomycin ROS-vermittelt ist (Kanofsky, 1986; Hay et al., 1987; Hay et al., 1991; Nici et al., 1998), könnte diesem Interleukin eine regulatorische antioxidative Wirkung zukommen.

Die IL-2-Konzentrationen in der ELF zeigten in den Patientengruppen keinen gerichteten Zusammenhang. Lediglich in der Chemotherapiegruppe nach Strahlentherapie waren erhöhte IL-2-Konzentrationen nachweisbar. Interessanterweise zeigte sich hier ein signifikanter Zusammenhang mit dem Anteil lymphozytären Zellen in der BALF, was darauf hinweisen könnte, daß IL-2 unter oxidativem Stress von T-Lymphozyten sezerniert wird (Tatla et al., 1999).

IL-2 wird als Immunmodulator unter anderem zur Therapie des Nierenzellkarzinoms eingesetzt (Spencer et al., 1992). Durch IL-2 aktivierte NK-Zellen können transbronchial gewonnene Fibroblasten in vitro lysiert werden (Zambello et al., 1996), ein Versuch, der zeigt, daß erhöhte IL-2 Konzentrationen auch in der Interaktion zwischen Entzündungszellen und Fibroblasten involviert sind und damit in der Genese therapieassoziiertes Lungenschäden eine Rolle spielen könnten. Hierfür spricht auch, daß neuere Untersuchungen diesem Zytokin in der Interaktion mit IL-15 eine

wesentliche Rolle bei der T-Zell-Alveolitis bei Patienten mit Sarkoidose zu messen (Agostini et al., 1996). Als Indikator des intrapulmonalen Stress kam IL-2 in unserem Kollektiv jedoch keine wesentliche Bedeutung zu.

ELF-IL-6-Konzentrationen zeigten in den Lavageproben einen deutlichen Zusammenhang mit der Chemo- wie der Radiotherapie. Im Vergleich zu IL-1 waren hier die Konzentrationen nach Therapieende erhöht, wobei dieser Effekt interessanterweise nach Chemotherapie ausgeprägter als nach Strahlentherapie war. Ein ähnlicher Effekt wurde in einem Tiermodell gesehen, in dem durch Endotoxin-Infusion ein akutes Lungenversagen induziert wurde (Simons et al., 1996). Hier wurden als zentrale Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-alpha gemessen. Während im peripheren Blut der Tiere TNF-alpha und IL-1 nur initial anstieg, persistierte der erhöhte IL-6 Konzentrationen und wies damit auf eine mögliche Schlüsselrolle dieses Interleukins in der Perpetuation des akuten inflammatorischen Lungenprozesses hin.

Bei dem Tiermodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose wurde neben TNF-alpha IL-6 als zweiter spezifischer Stimulus die Expression von Makrophagen-inflammatorischen Protein-1 alpha (MIP-1) identifiziert, das als zentrales Chemokin sowohl des Recruitments für monozytäre Zellen als auch in der Genese der alveolären Fibrosierung gilt (Smith et al., 1998). Bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen wie Pneumokoniose (Vanhée et al., 1995), Asbestose (Simeonova et al., 1997), Sarkoidose (Takizawa et al., 1997) oder fibrosierender Alveolitis (Shahar et al., 1996) wurden in der ELF erhöhte IL-6-Konzentrationen gesehen, Befunde, die weiterhin auf die zentrale Rolle von IL-6 in der Genese dieser ROS-vermittelten interstitiellen Lungenerkrankungen (Buhl et al., 1994) hinweisen.

IL-6 wird von zahlreichen Zellen, vor allem von stimulierten Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, in geringerem Maße auch von Makrophagen, B- und T- Lymphozyten, und neutrophilen Granulozyten produziert (Kelley, 1990). Es interagiert mit zahlreichen anderen Interleukinen, unter anderem IL-8 und TNF-alpha, und ist durch IL-1 induzierbar. Hier war der gesehene Zusammenhang zwischen den IL-1- und IL-6-Konzentrationen in den untersuchten Lavageproben zwar signifikant, jedoch nur schwach ausgeprägt, was dem unterschiedlichen Zeitfenster, in dem der Anstieg dieser Interleukine gesehen wurde, entsprach.

Der IL-8-Konzentrationen war in den ELF der Patienten unter und nach Therapie deutlich erhöht und zeigte hier eine hochsignifikante Korrelation mit der Gesamtzellzahl der BALF wie insbesondere dem Anteil an neutrophilen Granulozyten.

Dieses Interleukin nimmt gemeinsam mit TNF-alpha eine zentrale Stellung in der Genese fibrosierender Lungenerkrankungen wie der systemischen Sklerose oder Sarkoidose (Bolster et al., 1997; Takizawa et al., 1997), exogen allergischen Alveolitis (Beinert et al., 1994), ARDS (Kurdowska et al., 1997) oder der Bronchiolitis obliterans (DiGiovine et al., 1996) ein. Im Tiermodell der akuten wie chronischen Lungenschädigung unterschiedlichster Genese ist IL-8 ein zentraler Baustein des inflammatorischen Zytokinnetzes (Yamamoto et al., 1998; Legastelois et al., 1997; Miller et al., 1996; Mulligan et al., 1993), unterliegt einer Hochregulation durch reaktive

Sauerstoffspezies (Verhasselt et al., 1998) und wird unter anderem durch IL-1 und IL-6 induziert (Schönbohn et al., 1995). IL-8 ist das stärkste Chemoattraktans für PMN-Zellen, deren Influx weiterhin von IL-1, TNF, aktiviertem Komplement und als Folge der Lipidperoxidation entstandenem 4-Hydroxynonenal (4-HNE) gesteuert wird. In der vorliegenden Untersuchung entsprach dies einer Korrelation von sowohl IL-8 wie IL-1 mit der Zellzahl und dem Anteil an neutrophilen Granulozyten. IL-8 erscheint auch in unseren Untersuchungen als zentrale Größe des akuten therapieassoziierten Lungenschadens und ist als möglicher Promotor der persistierenden Zytokinkaskade auch im zeitlichen Intervall zum schädigenden Agens nachweisbar.

In der Patientengruppe unter Strahlentherapie sowie in der Chemotherapiegruppe, die nach Bestrahlung erneut systemisch therapiert wurden, fanden sich deutlich erhöhte TNF-alpha-Konzentrationen in der ELF. Weiterhin zeigten die TNF-alpha-Konzentrationen in der ELF der Patienten mit manifester therapieassoziiierter Lungenschädigung gegenüber der Therapie- wie der Referenzgruppe erhöhte Werte. Bemerkenswert war zudem der signifikante Zusammenhang zwischen Gesamtzellzahl, neutrophilen Granulozyten und TNF-alpha-Konzentrationen in der BALF. TNF-alpha ist, gemeinsam mit IL-8, wesentlich an dem Einstrom an Entzündungszellen in das Lungenparenchym beteiligt, wobei neutrophile Granulozyten durch TNF-alpha zu einer vermehrten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies angeregt werden (Yonemaru et al., 1989; Simons et al., 1996). Unter ROS-Einwirkung wird wiederum die TNF-alpha Produktion stimulierter Alveolarmakrophagen induziert (Erroi et al., 1996), ein Prozeß, der diesem Zytokin eine wichtige Schlüsselrolle in dem Zytokinnetzwerk der therapieassoziierten Lungenschädigung zuweist. Eine weitere oxidative Potenz kommt TNF-alpha durch seine Depletion von intrazellulärem Glutathion zu, eine Protein-Kinase C vermittelte Reaktion, die an peripheren Lungenendothelien nachgewiesen werden konnte (Phelps et al., 1995).

Durch diese Mechanismen spielt TNF-alpha eine zentrale Rolle in der Genese fibrosierender Lungenerkrankungen (Rochester et al., 1993) und wurde in der ELF bei Pneumokoniosen (Vanhée et al., 1995), experimentell induzierten Silikosen (Gossart et al., 1996) wie der Bleomycin-vermittelten Lungenfibrose vermehrt nachgewiesen (Piguet et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, daß unter TNF-alpha die extrazelluläre Matrixproduktion und Kollagendeposition erhöht ist (Piguet et al., 1997), was die Bedeutung dieses Interleukins in der Genese therapieassoziiierter Lungenschäden nochmals unterstreicht.

Erhöhte Konzentrationen von TGF-beta fanden wir in der ELF von Patienten nach Chemotherapie, nicht jedoch nach Strahlentherapie. In der Gruppe der Patienten, die pulmonale Folgeschäden nach Therapie entwickelt hatten, war der ELF-Spiegel von TGF-beta ebenfalls erhöht. Dies weist ihm eine mögliche Bedeutung in der Erfassung therapieassoziiierter Lungenschädigungen hin, wobei eine wesentliche Rolle für TGF-beta in der Genese der Lungenfibrosierung unterschiedlicher Ätiologie vermutet wird (Khalil et al., 1991; Yu et al., 1993; Denis, 1994). Hier kommt es u.a. durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 zur Steigerung der intrapulmonalen Kollagenexpression (Poli et al., 1997). Einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß in der Literatur kaum Messungen dieses Zytokins in der BALF von Patienten vorliegen.

Beteiligt ist TGF-beta an dem pulmonalen Influx von neutrophilen Granulozyten im Rahmen des

initialen Entzündungsgeschehens, wahrscheinlich durch eine Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 an den peripheren Lungengefäßendothelien (Suzuki et al., 1994). In dem Tiermodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose wurde weiterhin eine TGF-beta-abhängige Regulation der Proliferation von Typ-II-Pneumozyten nachgewiesen, was auf eine mögliche Regulation von Proliferations- und Reparationsprozessen unter akuter Traumatisierung hinweist (Khalil et al., 1994). Neuere Untersuchungen zeigten, daß TGF-beta unter oxidativem Stress differente Isoformen exprimiert, ohne quantitativ wesentlich zuzunehmen (O'Reilly et al., 1997), was möglicherweise unsere Beobachtung erklärt, daß dieses Zytokin nach Strahlentherapie bei den klinisch inapparenten Patienten nicht signifikant erhöht war.

In den von uns untersuchten Patientengruppen ließ sich kein gerichteter Zusammenhang zwischen EGF- und PDGF-Konzentrationen in der ELF und zytoreduktiver Therapie nachweisen.

Zwar konnte am Tiermodell für EGF gezeigt werden, daß dieser potente Regulator epithelialer Zellproliferation durch reaktive Sauerstoffspezies in der BALF als Reaktion auf das Lungentrauma hochreguliert wird (Madtes et al., 1994; Nici et al., 1996). Dennoch scheint diesem Wachstumsfaktor keine wesentliche Rolle in der Genese fibrosierender Lungenerkrankungen zuzukommen.

PDGF wirkt in niedriger Konzentration als Chemoattraktans für Fibroblasten, in höherer Konzentration induziert es die Fibroblastenproliferation (Kovacs et al., 1986; Antoniades et al., 1990; Walsh et al., 1993). Im Tiermodell wurde PDGF unter oxidativem Stress vermehrt ausgeschüttet (Fabisiak et al., 1989). Diese Beobachtungen könnten auf eine mögliche Bedeutung dieses Wachstumsfaktors bei chronisch fibrosierenden Lungenerkrankungen deuten. Allerdings fand sich, in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit bei Asbest-exponierten Patienten kein Zusammenhang zwischen pulmonaler Krankheitsaktivität und PDGF-Konzentrationen in der BALF (Mutsaers et al., 1998).

Zusammengefaßt erscheinen weder EGF noch PDGF geeignet, therapieassoziierte Lungenschäden bei Patienten unter (Radio-) Chemotherapie zu erfassen.

Über VEGF-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage wurde erstmalig von unserer Arbeitsgruppe berichtet (Beinert et al., 1999b, Beinert et al., 2000b). In der vorliegenden Arbeit wurden in der Patientengruppe, die vor Therapie stand, die höchsten VEGF-Konzentrationen in der ELF gemessen. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit zahlreichen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die an peripheren Blutproben von Tumorpatienten hohe VEGF-Konzentration als primären Indikator einer hohen Tumorbelastung beziehungsweise für eine hohe Tumoraktivität fanden (Salven et al., 1998; El-Assal et al., 1998; Locopo et al., 1998, Salven et al., 1999). Somit erscheint in dieser Patientengruppe die VEGF-Konzentration primär als Ausdruck der Tumoraktivität, die beim Bronchialkarzinom bei Erstdiagnose typischerweise bereits fortgeschritten ist. Diese Interpretation wird weiter belegt durch die signifikante Korrelation zwischen den VEGF-Konzentrationen im peripheren Blut, die bei einem Teil der Patienten vergleichend zu den Werten in der ELF erhoben wurden. Der Übertritt in den Alveolarraum wird einerseits durch die Größe des Moleküls begünstigt, das mit 34 - 43 kDa vergleichsweise klein ist. Weiterhin ist VEGF ein überaus

wirksamer Permeabilitätsfaktor (Senger et al., 1983, Roberts et al., 1995), der damit lokal seinen Übertritt in den Alveolarraum selbst verstärkt.

In dem von uns untersuchten Kollektiv lagen die VEGF-Konzentrationen in der ELF unter Chemotherapie deutlich niedriger als bei Diagnosestellung, was der verminderten Tumorlast entsprechen könnte. Interessanterweise wiesen jedoch in der Subgruppe der Patienten, die vor der Chemotherapie eine Strahlentherapie erhalten hatten, deutlich höhere VEGF-Konzentrationen auf. Auch wenn die Aussagekraft hier entsprechend der geringen Fallzahl in dieser Gruppe eingeschränkt ist, scheint eine erhöhte Tumorlast hierfür als Ursache wenig wahrscheinlich. Diese Patienten befanden sich in engmaschiger Nachkontrolle und zeigten nur in etwa der Hälfte ein metastasiertes Tumorwachstum, so daß weitgehend ausgeschlossen werden kann, daß die Patienten in dieser Gruppe eine höhere Tumorbelastung aufwiesen als diejenigen Patienten, bei denen der Tumor bei Diagnosestellung bereits lokal fortgeschritten und in der überwiegenden Mehrzahl der Patienten metastasiert war.

Vielmehr weisen diese Ergebnisse auf eine mögliche Interaktion zwischen VEGF und oxidativem pulmonalen Stress hin, der in der strahlentherapeutisch vorbehandelten Gruppe unter Chemotherapie höher lag als bei den primär chemotherapierten Patienten. Dies wird belegt durch den in dieser Subgruppe signifikant höheren Anteil an oxidierten Methioninreste in der ELF, da Methioninsulfoxid ein indirektes Maß der oxidativen Nettobelastung der Lunge darstellt (Behr et al., 1994; Behr et al., 1995, Beinert 2000b).

Somit spricht die Parallelität des relativen Anstieges von VEGF-Konzentration und dem Anteil an Alveolarproteinen mit oxidierten Methioninresten in diesen beiden Therapiegruppen für eine Hochregulation von VEGF auch durch oxidativen Stress (Beinert et al., 1999b, Beinert et al., 2000b).

Diese These wird weiter gestützt durch das Ergebnis zahlreicher *in vitro*-Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, in den gezeigt wurde, daß VEGF durch ROS (Kuroki et al., 1996; Brauchle et al., 1996) wie durch ionisierende Strahlen hochreguliert werden kann (Ando et al., 1998). Zudem kann die zelluläre Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies durch VEGF deutlich erhöht (Yang et al., 1997) und die stressinduzierte Apoptose-Rate hematopoetischer Zellen durch VEGF gesenkt werden (Kato et al., 1995).

Unsere Ergebnisse weisen zusammenfassend in Übereinstimmung mit diesen Berichten darauf hin, daß VEGF in der ELF bei Patienten mit Bronchialkarzinom nicht nur ein Spiegel der Tumoraktivität ist, sondern auch durch reaktive Sauerstoffspezies hochreguliert werden kann. Hierfür sprechen weiterhin die hochsignifikanten Korrelationen von VEGF-Konzentrationen mit TNF-alpha, IL-1, IL6 und IL-8, Interleukine, die unter oxidativem Stress vermehrt ausgeschüttet werden bzw bei der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch Zellaktivierung beteiligt sind (Yonemaru et al., 1989; Pison et al., 1994; Simeonova et al., 1995; Depuydt et al., 1996; Gutierrez et al., 1996; Simeonova et al., 1997; Spickett et al., 1998).

Somit ist VEGF nicht nur eine Meßgröße der Tumoraktivität oder der Tumorgroße, sondern auch des therapieassoziierten oxidativen Stress. Während der prognostische Stellenwert prätherapeutischer VEGF-Konzentrationen hinreichend belegt ist, (Volm et al., 1997; Szabo et al., 1998; Gadducci et al., 1999; Ikeda et al., 1999), sollte die Wertigkeit eines VEGF-Monitorings als

Erfolgskontrolle der zytoreduktiven Therapie kritisch überprüft werden.

6.3 Bindegewebsproteine

Die Konzentrationen von Laminin und P-III-P in der ELF zeigten eine breite Streuung über die Patientengruppen und ließen keine gerichteten Tendenzen erkennen. Lediglich in der kleinen Patientengruppe mit manifester Lungenschädigung fanden sich Erhöhung der P-III-P-Werte, die jedoch bei geringer Fallzahl nicht statistisch relevant war.

Laminin ist als Bestandteil der Basalmembran in reparative Prozesse involviert und bei Erkrankungen mit erhöhtem Gewebeumbau im peripheren Blut vermehrt nachweisbar (Tsutsumi et al., 1996; Körner et al., 1996; Gabrielli et al., 1996). Weiterhin wurde im Tiermodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu Beginn der Fibrosierung histologisch eine massive lokale Basalmembran-Akkumulation gesehen, Ergebnisse, die gleichartig und ebenfalls histologisch bei der strahleninduzierten Lungenfibrose nachgewiesen wurden (Rosenkrans et al., 1987). Vergleichswerte über Messungen in Lavageflüssigkeiten von Patienten liegen bislang nicht vor und erscheinen anhand unserer Ergebnisse als Marker des pulmonalen oxidativen Stress nicht sensitiv. Ein Grund hierfür könnte in der Größe des Moleküls liegen, das mit 200 - 300 kDa die alveolokapilläre Membran nur in geringem Umfang durchdringt. So konnte auch in den Proben der Patienten mit therapieassoziiertem Lungenschaden kein erhöhter Laminin-Spiegel gemessen werden.

Das abgespaltene N-terminale primäre Prokollagen-III-Peptid wird im Verhältnis 1:1 zum Kollagen-Typ-III gebildet und ist im Blut und zum Teil auch in der BALF von Patienten mit idiopathischer oder exogen induzierter Lungenfibrose und Sarkoidose als Marker der intrapulmonalen Kollagen-Typ-III-Produktion und damit der Fibrosesaktivität nachgewiesen worden (Bjermer et al., 1986; Maasilta et al., 1991). Die ungerichteten Ergebnisse bei unserer Untersuchung könnten durch die relativ geringe Krankheitsaktivität der Patienten bedingt sein. Hierauf weisen auch die erhöhten P-III-P-Werte bei den Patienten mit manifestem Lungenparenchymschaden nach zytoreduktiver Therapie hin. Somit könnte diesem Meßparameter, etwa beim Monitoring einer dosisintensivierten Radio-Chemotherapie, durchaus Gewicht zuzumessen sein.

6.4 Hitzeschockproteine

Bei lediglich 21 Patienten konnte in der BALF die HSP-70 und HSP-90 Expression von Alveolarmakrophagen untersucht werden. Entsprechend der kleinen Fallzahl ließen sich hier keine signifikanten Zusammenhänge darstellen, es fiel aber auf, daß der Anteil an HSP-90 positiven Zellen in der BALF der Patienten unter Chemotherapie tendenziell erhöht schien.

Hitzeschockproteine (HSP) treten als zelluläre Antwort auf zahlreiche physikalische oder chemische Stressfaktoren auf (Dingwall et al., 1992). Entdeckt wurden HSP bei E. Coli Bakterien und Larven der Fruchtfliege, die supraphysiologischen Temperaturen ausgesetzt worden waren - was auch zur Namensgebung "Hitzeschockproteine" geführt hatte (Lanks, 1986). Während die

zelluläre Antwort auf Stressfaktoren zu einer Downregulation der meisten Gene führt, entspricht die Generierung der HSP einer aktiven Zellantwort im Sinne einer Schutzfunktion zellulärer Moleküle (Nagata, 1998). Zunehmend wird die Expression von HSP auf die Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies bezogen (Guidot et al., 1995; Choi et al., 1996; Kondo et al., 1997; Wang et al., 1997; Gorman et al., 1999), wobei dies auch in Zusammenhang mit oxidativem pulmonalen Stress beschrieben wird (Choi et al., 1996). Weiter bestätigt werden diese Ansätze durch die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse über die vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen durch repetitive Gewebe-Ischämie und -Reperfusion, einem Modell zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (Nishizawa et al., 1999). Weiterhin werden Hitzeschockproteine in humanen Alveolarmakrophagen durch Exposition gegenüber Bleomycin, das die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies induziert (Kanofsky, 1986), vermehrt exprimiert (Hamilton et al., 1995). Auch bei interstitiellen Lungenerkrankungen konnte ein Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und der Expression von HSP nachgewiesen werden. (Polla et al., 1993).

Zusammengefaßt scheint die Expression von HSP in Alveolarmakrophagen ein möglicher Indikator für pulmonalen oxidativen Stress zu sein und könnte insbesondere in der intensivierten Radio-Chemotherapie nicht nur das Maß an reaktiven Sauerstoffspezies, denen die Lunge ausgesetzt ist, sondern auch statthabende Kompensationsmechanismen hiergegen anzeigen.

6.5 Gluthionssystem und Methioninsulfoxidgehalt der alveolären Proteine

In der ELF der Patientengruppen unter zytoreduktiver Therapie fanden sich signifikant erniedrigte Konzentrationen von Gesamt-Glutathion sowie reduziertem Glutathion (GSH). Ebenfalls in der ELF in den Therapiegruppen deutlich vermindert zeigte sich der Quotient der Konzentration von reduziertem zu Gesamt-Glutathion.

Eine gegensinnige Bewegung zeigte der Methioninsulfoxidgehalt (Met(O)) der alveolären Proteine. Hier fand sich unter Therapie in der ELF ein deutlich erhöhter Anteil an oxidierten Methioninresten in der ELF, ein Effekt, der bei den Patienten mit manifester Lungenschädigung besonders stark ausgeprägt war.

Erwartungsgemäß ließ sich zwischen diesen zentralen Größen des intrapulmonalen Redox-Systems ein hochsignifikanter Zusammenhang nachweisen, wobei der Methioninsulfoxidgehalt invers mit der Konzentration des Gesamt-Glutathions und GSH und ebenfalls invers mit dem Verhältnis von reduziertem Glutathion zum Gesamt-Glutathion korrelierte.

Die Aminosäure Methionin besitzt durch ihre Thioäthergruppe eine besondere Empfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies. Damit kommt ihr als Antioxidans eine ähnliche Wirkung zu wie Albumin, Vitamin E oder Vitamin C (Hunter et al., 1994). Methionin ist ubiquitär am Aufbau humaner Proteine beteiligt und macht etwa 2-3% aller alveolärer Proteine aus. Somit ist der Anteil an oxidiertem Methionin, der Methioninsulfoxidgehalt in der Lavageflüssigkeit, ein direkter Parameter der akuten oxidativen pulmonalen Belastung (Maier et al., 1991, Beinert et al., 2000b). Methioninreste werden jedoch erst dann oxidiert, wenn die Kapazität andere Antioxidantien, insbesondere von GSH, Vitamin E und Vitamin C, bereits erschöpft ist. Das heißt, daß der in der

ELF gemessene Anteil an Methioninsulfoxidgehalt an den alveolären Proteinen Aufschluß über den Anfall reaktiver Sauerstoffspezies gibt, die die primäre antioxidative Kapazität des pulmonalen Abwehrsystems bereits überstiegen haben. Somit spiegelt dieser Parameter sowohl den Funktionszustand des pulmonalen Oxidantien /Antioxidantien-Systems als auch die akute oxidative Belastung wider und erscheint als Meßgröße der therapieassoziierten pulmonalen Toxizität vorrangig geeignet (Beinert et al., 2000b).

Bezeichnend für die komplexe Aussagequalität dieses Parameters fand sich lediglich in der ELF derjenigen Patienten, die unter Therapie standen, ein erhöhter Methioninsulfoxidgehalt der alveolären Proteine, während sich, im Gegensatz zu Glutathion, dieser Parameter nach Therapie rasch normalisierte.

Ebenfalls interessant ist, daß in der Gruppe, die nach vorausgegangener Strahlentherapie erneut in eine Chemotherapie einmündete, der Methioninsulfoxidgehalt der ELF höher war als in der Patientengruppe unter primärer Chemotherapie. Dies weist darauf hin, daß die in dieser Studie nachgewiesene Persistenz von Zytokinen nach zytoreduktiver Therapie nicht nur zu einer vermehrten Toxizität unter einer erneuten Chemotherapie führt. Der Anstieg oxidierter Methioninreste in der ELF der erneut chemotherapierten Patienten ist insbesondere der Nachweis, daß dieser therapieassoziierte pulmonale Stress oxidativ vermittelt ist.

Die Oxidation von Methioninresten bedeutet zumeist die Inaktivierung, selten aber auch Aktivierung funktionell bedeutsamer Proteine des Alveolarraums (Swaim et al.,1988). Im Kontext des pulmonalen antioxidativen Systems ist das Protein, das am leichtesten durch Oxidation seines Methioninrestes inaktiviert wird, alpha-1-Antitrypsin, dem Hauptvertreter der Antiproteasen (Swaim et al.,1988). Dieses Protein besitzt nur einen Methioninrest (Met³⁵⁸) im aktiven Bindungszentrum für die Elastase neutrophiler Granulozyten (Stief et al.,1988). Dies heißt, daß der Gehalt an Methioninsulfoxid in der ELF zugleich ein inverser Marker für die intrapulmonale Antiproteasenaktivität ist (Matheson et al.,1981).

Aus Makrophagen und insbesondere neutrophilen Granulozyten freigesetzte Proteasen, insbesondere Elastasen, Kollageneasen, Cathepsin g und Gelatinasen (Rodell et al.,1988; Anderson et al.,1990) spielen im unspezifischen Abwehrprozeß der Lunge vor allem durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies eine vorrangige Rolle (Ward et al.,1988). Überwiegt im Redox-System Lunge jedoch die oxidative Belastung, sind es gerade diese Mechanismen zur Abwehr von Lungenschäden, die überschießend zu einem Parenchymschaden führen können (Hogg, 1987; Worthen et al.,1987; Rodell et al.,1988; Carre et al.,1991; Maier et al.,1991, Behr et a.l., 2000). In der Folge kommt es durch die weitere Inaktivierung von Antiproteasen wie alpha-1-Antitrypsin oder alpha-2-Makroglobulin (Gonias et al.,1988; Stief et al.,1988; Reddy et al.,1989) zu einem Circulus vitiosus, der die oxidative Schädigung an Matrixproteinen durch die Wirkung aktivierter Proteasen potenziert (Swaim et al.,1988) und damit die interaktive, destruiierende Wechselwirkung zwischen ROS und Antiproteasen eindrucksvoll beschreibt.

Der Abfall der Glutathionkonzentration in der ELF in den Patientengruppen unter Therapie war mit

einer zunehmenden Oxidation von Methioninresten der alveolären Proteinen assoziiert. Die in den Graphen dargestellte inverse Beziehung zwischen der Gesamt-Glutathionkonzentration mit dem Methioninsulfoxidgehalt in der ELF wurde durch die hochsignifikante inverse Korrelation zwischen diesen beiden Größen unterstrichen. Dieses Phänomen spiegelt das intrapulmonale Gleichgewicht des Oxidantien/Antioxidantiensystems wider und dokumentiert den Stellenwert von Met(O) als Marker des oxidativen pulmonalen Stress (White et al., 1986; Cantin et al., 1991). Zudem ließ sich für die antioxidative Kapazität ein Schwellenwert der alveolären Glutathion-Konzentration darstellen, der bei etwa 400 µM lag. Unterhalb dieses Schwellenwertes kam es zu einem raschen Anstieg des Met(O)-Anteiles in der ELF, so daß diese Glutathion-Konzentration als kritischer Wert für die Funktion der intrapulmonalen antioxidativen Abwehr gelten kann.

Das in der ELF vorhandene Glutathion stammt in erster Linie aus Pneumozyten Typ II und Alveolarmakrophagen (Cantin et al., 1991). Es wurde daher vermutet, daß Veränderungen des Glutathion-Gehaltes in der ELF hauptsächlich auf Funktionsänderungen dieser Zellen zurückgehen (Housset et al., 1991; Dörger et al., 1997). So wurde als Ursache der erhöhten Glutathion-Konzentrationen bei Rauchern (Cantin et al., 1991; van Poppel et al., 1992, Rahman et MacNee, 1999), die sich auch in unserem Patientenkollektiv darstellte, postuliert, daß Alveolarmakrophagen durch die Phagozytose alveolär deponierter Aerosolteilchen aus dem Zigarettenrauch gegenregulativ vermehrt Glutathion in die ELF abgeben (Cantin et al., 1991).

In den Patientengruppen nach Therapie kam es in der ELF zu einer langsamen Erholung der unter Therapie deutlich verminderten Glutathion-Konzentrationen. Verminderte Glutathion-Konzentrationen finden sich regelhaft bei interstitiellen Lungenerkrankungen wie der idiopathischen Lungenfibrose (Behr et al., 1997), die mit einer vermehrten pulmonalen oxidativen Belastung einhergehen (Saleh et al., 1997). Auch konnten wir bei Patienten mit symptomatischer Farmerlunge gegenüber asymptomatischen, exponierten Bauern einen deutlich verminderten Glutathiongehalt in der ELF nachweisen und damit oxidativen Stress als wesentliches Agens der Erkrankungsprogression wahrscheinlichmachen (Behr et al., 2000). Als Ursache für diese Beobachtungen werden Änderungen des Glutathion-Metabolismus vermutet, wobei der Glutathion-Mangel der idiopathischen Lungenfibrose auf die ELF limitiert ist (Cantin et al., 1987), während Patienten mit ARDS oder zystischer Fibrose, Erkrankungen, die durch erheblichen pulmonalen oxidativen Stress gekennzeichnet sind (Jackson, 1990; Elborn et al., 1990; Grealley et al., 1993, Matthes et al., 1999), ein generelles Defizit an Glutathion aufweisen (Buhl et al., 1989; Eck et al., 1989; Borok et al., 1991). Zu diskutieren sind hierfür zwei mögliche Mechanismen: Zum einen kommt es unter der Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Oxidation von intrazellulärem Glutathion und damit zu einer Verminderung der Konzentration an reduziertem Glutathion (Rahman et al., 1999) Zudem werden Pneumozyten Typ II und Alveolarmakrophagen direkt durch reaktive Sauerstoffspezies geschädigt, was zu einer verminderten Produktion von Glutathion und nachfolgenden Beeinträchtigung des Redox-Systems führen kann, das dann zum Recycling von Glutathiondisulfid zur Verfügung steht (Cantin et al., 1991). Hieraus würde jedoch ein Anstieg des Glutathiondisulfids in der BALF folgen. Dies wurde jedoch, wie auch bei den Messungen an unserem Patientenkollektiv, bislang bei interstitiellen Lungenerkrankungen nicht beobachtet, vielmehr ist die Glutathion-Gesamtkonzentration bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose

(Cantin et al.,1987) oder HIV-Infektionen (Eck et al.,1989) gegenüber Kontrollpersonen vermindert. Aus diesen Beobachtungen muß gefolgert werden, daß das im Alveolarraum gebildete Glutathiondisulfid eliminiert werden kann.

Neben dem erwarteten hochsignifikanten Zusammenhang der Kerngrößen des pulmonalen antioxidativen Systems und des Methioninsulfoxid-Gehaltes als Marker der oxidativen Belastung waren diese Parameter signifikant mit den meisten der untersuchten Zytokinen assoziiert. Dies unterstreicht nicht nur den Begriff des Zytokin-Netzwerkes, in dem Endothelzellen mit Entzündungszellen über Interleukine und Wachstumsfaktoren eine komplexe Interaktion eingehen, sondern weist zugleich auf reaktive Sauerstoffspezies als den entscheidenden zentralen Faktor der pulmonalen Gewebeschädigung hin.

Reaktive Sauerstoffspezies werden vorrangig von neutrophilen Granulozyten gebildet, die im Vergleich zu Alveolarmakrophagen eine höhere oxidative Potenz besitzen (Strausz et al.,1989). Neutrophile Granulozyten produzieren mehr Superoxidanionen als Alveolarmakrophagen und sind in der Lage, das oxidative Enzym Myeloperoxidase zu synthetisieren und auszuschütten, über das Alveolarmakrophagen nicht verfügen (Constantin et al.,1994). Es ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung und weist wiederum auf reaktive Sauerstoffspezies als zentrale Größe des therapieassoziierten pulmonalen Stress hin, daß vor allem das Auftreten neutrophiler Granulozyten mit einer Reduktion der Gesamt-Glutathion-Konzentration in der ELF vergesellschaftet war, während eine Vermehrung von Lymphozyten die Glutathion-Konzentration im Alveolarflüssigkeitsfilm geringer beeinträchtigte.

Zusammengefaßt stellen die von uns durchgeführten Untersuchungen reaktive Sauerstoffspezies in das Zentrum des unter zytoreduktiver Therapie induzierten pulmonalen Stress. Reaktive Sauerstoffspezies sind somit nicht Folge, sondern primäre Ursache subklinischer wie klinisch manifester Lungenparenchymveränderungen unter Radio-Chemotherapie. Die ROS-vermittelte Krankheitsaktivität läßt sich hierbei über vier pathophysiologische Schritte beschreiben, die in der interstitiellen Parenchymschädigung münden:

- - Vermehrung der Entzündungszellen
- - Gesteigerte oxidative Aktivität der Entzündungszellen
- - Verminderter antioxidativer Schutz durch Glutathion
- - Fibroblastenaktivierung durch gesteigerte lokale oxidative Nettobelastung der Lunge

Wie oben aufgeführt, unterscheiden sich die durch Strahlentherapie oder Zytostase induzierte Lungenparenchymveränderung nicht grundsätzlich von anderen interstitiellen Lungen-

erkrankungen, die mit einer fibrosierenden Alveolitis einhergehen, sondern stellen vielmehr eine stark vereinfachte, allgemeine pathophysiologische Grundstruktur interstitieller Lungenerkrankungen dar (Beinert et al., 1999d).

6.6 Patientenkollektiv

Die in den aufgeführten Untersuchungen als Referenzgruppe genannten Patienten wurden im Rahmen der Nachsorge bei zumindest 2 Jahren zurückliegender operativer Entfernung eines Lungentumors untersucht. Diese Patienten wurden alle vor 1998 operiert und daher noch routinemäßig einer postoperativen Strahlentherapie zugeführt, ein Verfahren, das zwischenzeitlich nicht mehr dem klinischen Standard entspricht (Munro, 1998; Burdett et al., 1998). Somit wurde als Kontrollgruppe ein Kollektiv gewählt, das sowohl das Trauma einer Lungenoperation als auch einer thorakalen Bestrahlung erfahren hatte. Um Einflüsse hierdurch auf die Ergebnisse der BALF-Untersuchungen weitgehend auszuschließen, wurde vorgegeben, daß nur tumorfreie Patienten eingeschlossen werden, die eine postoperative Strahlentherapie mindestens vor 18 Monaten beendet hatten, und bei denen weiterhin klinisch und lungenfunktionsanalytisch kein Hinweis auf das Bestehen einer Lungenfibrosierung bestand. Der Zeitrahmen wurde mit 18 Monaten gewählt, da hiernach keine subklinischen aktiven strahleninduzierten pulmonalen Prozesse mehr zu erwarten sind (Franchin et al., 1991; Moores et al., 1994, Rubin et al., 1995). Die Erfahrung hat gezeigt, daß Kontrollkollektive für invasive Untersuchungen, die aus gesunden Probanden bestehen, zumeist wesentlich jünger sind als die zu untersuchenden Patientengruppen. Dies gründet einerseits in der mit dem Alter offensichtlich deutlich abnehmenden Bereitschaft, sich etwa für Forschungszwecke lavagieren zu lassen, andererseits ist es mit zunehmenden Alter deutlich schwieriger, Probanden zu finden, die gesund sind. Daher wurde für die vorliegenden Untersuchungen bewußt ein Vergleichskollektiv gewählt, das bezüglich Alter, Geschlechtsverteilung, Rauchgewohnheiten und auch anderen, sozialen Kenngrößen weitgehend den Patientengruppen entsprach.

Mit 35% war der Anteil an Proben von Patienten mit SCLC gegenüber einem Verteilungsmuster der histomorphologischen Diagnosen bei Patienten mit Bronchialkarzinom von etwa 20% überrepräsentiert (Beinert et al., 1998). Dies könnte, trotz des spätestens seit 1993 bestehenden Konsens, daß auch Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC von einer Chemotherapie profitieren (Souquet et al., 1993), am ehesten Ausdruck einer noch immer zögerlichen Haltung in der Therapie des fortgeschrittenen NSCLC sein (Mirimanoff, 1994; Dancey et al., 1997; Repetto et al., 1998; Beinert et al., 1999a). Dagegen ist die Radio-Chemotherapie von Patienten mit dem schnell wachsenden SCLC mit einer Tumorverdopplungszeit von etwa 29 Tagen und, entsprechend der hohen Proliferationsrate auch guten Chemosensibilität, seit vielen Jahren klinischer Standard (Iannuzzi et al., 1986; Osterlind et al., 1986; De Leij et al., 1987; Papac et al., 1987).

Lediglich drei Patienten in der Gruppe unmittelbar nach Strahlentherapie und 2 Patienten in der

Gruppe 2,5 bis 15 Monate nach Strahlentherapie entwickelten klinisch manifeste pulmonale therapieassoziierte Manifestationen. Damit blieb die Rate an Pneumonitiden und Lungenfibrosen in diesem Kollektiv hinter der zu erwartenden Komplikationsrate nach Tumorthherapie deutlich zurück. Dies ist in der Rekrutierungsform des kooperierenden Zentrums begründet:

Insbesondere nach Abschluß der Strahlentherapie wurde die Mehrzahl der Patienten von den zuweisenden Stellen für eine Dauer von 4 Wochen in eine Anschlußheilbehandlung überführt. Somit ist in den Gruppen bis jeweils 2,5 Monaten nach zytoreduktiver Therapie der Anteil der Patienten, der innerhalb der ersten 6 Wochen untersucht wurde, deutlich vermindert. Diese Zeit ist jedoch der typische Prädiktionsrahmen für die Entwicklung und Manifestation der therapieassoziierten Pneumonitis.

Patienten mit Lungenfibrosierung und in der Folge respiratorischer Insuffizienz wurden zumeist nicht erneut am Zentrum vorgestellt, da sie von den zuweisenden Einheiten für eine weitere Chemotherapie als nicht mehr qualifizierend eingestuft wurden und daher nur noch vereinzelt zur weiteren invasiven Diagnostik zugewiesen wurden.

7 ROS-assoziierte pulmonale Krankheitsbilder

Erst vergleichsweise spät, nämlich im Jahre 1987, wurde der Zusammenhang zwischen oxidativer Lungenbelastung und einer Lungenparenchymschädigung entdeckt. Der entscheidende Nachweis war hier, daß Entzündungszellen aus der Lunge von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose vermehrt Oxidantien produzierten (Cantin et al., 1987). Diese bahnbrechende Untersuchung eröffnete erstmals den Blick auf den direkten pathophysiologischen Zusammenhang zwischen oxidativem Streß und Schädigungen des Lungengewebes.

(Dieser Zusammenhang ist für die idiopathische und die exogen induzierte Lungenfibrose, für die exogen allergische Alveolitis bei Farmern, weiterhin für die Lungenfibrosierung bei Sarkoidose bereits in Einleitung und Diskussion ausführlich dargestellt worden und wird daher nicht nochmals aufgenommen) .

Unter Hyperoxie, einer Inhalation von über 60% reinem Sauerstoff entsprechend, kommt es zu einem Leakage-Syndrom mit Schädigung der alveolokapillären Membran und damit zu einem Lungenödem. Diese Schädigung der Membran beruht auf der direkten Einwirkung von ROS und wird durch die Gabe von Bleomycin, das die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies induziert (Kanofsky, 1986; Hay et al., 1991), verstärkt (Matalon et al., 1987).

Das Adult Respiratory Distress Syndrom (ARDS) wird in seiner Frühphase von einem massiven Influx von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet, die vermehrt ROS freisetzen (Bernard et al., 1997). In der Folge wird u.a. alpha-1-Antitrypsin oxidativ deaktiviert, woraus eine verstärkte Elastaseaktivität (Antonelli et al., 1989) und damit verstärkte Proteolyse resultiert (Gonias et al., 1988, Bernard et al., 1997, Matthay et al., 1999).

Inhalierete Asbestfasern können durch Phagozytose nicht lysiert werden und führen hiermit zu einer Dauerstimulierung von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten. Die Folge ist eine vermehrte Produktion von ROS durch diese intrapulmonalen Abwehrzellen (Simeonova et al., 1995; Simeonova et al., 1997). Das in Asbestfasern komplex gebundene Eisen II katalysiert zudem durch die Haber-Weiss-Reaktion die Umwandlung von Sauerstoff zu Hydroxylradikalen (Weiss, 1989). In der Folge kommt es zur oxidativen Schädigung von Proteinen, Membranlipiden und Nukleinsäuren bis zum lokalen Gewebeuntergang durch Proteolyse (Simeonova et al., 1995), Lungenfibrose (Lange et al., 1986; Lemaire et al., 1986) oder auch zur malignen Entartung (Albin et al., 1999).

Zusammengefaßt stellt die Lungenfibrosierung eine gemeinsame Endstrecke aller interstitiellen Lungenerkrankungen dar und verbindet in diesem Bild die Endstadien der idiopathischen wie der exogen allergisch induzierten Lungenfibrose mit der terminalen Lungenfibrosierung als Folge der Radio-Chemotherapie.

Daneben wird eine oxidative Genese der Lungenparenchymzerstörung auch für die zystische Fibrose (Gao et al., 1999; Roum et al., 1999), für Asthma bronchiale oder die chronisch obstruktive Bronchopneumopathie (Kelly, 1999) diskutiert. Diese Entwicklung zeigt, daß pulmonaler oxidativer Stress als zentrales pathophysiologisches Agens auch bei den nicht interstitiellen Lungenerkrankungen vermehrt fokussiert wird.

8 Therapieansätze zur Modulation des pulmonalen oxidativen Stress bei Lungenerkrankungen

Insbesondere bei der idiopathischen Lungenfibrose wurden in der Vergangenheit verschiedene antioxidative Therapiestrategien verfolgt:

Durch die Applikation von reduziertem Glutathion als Aerosol sollte versucht werden, die Glutathion-Konzentration in der ELF bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose zu erhöhen, ein Effekt, der trotz einer Inhalationstherapie mit 2 x 600 Methioninsulfoxidgehalt pro Tag nach drei Tagen zu keinem signifikanten Anstieg des Gesamt-Glutathions in der ELF der Patienten mehr führte (Buhl et al., 1994).

Erfolgreicher war der Versuch, bei Patienten mit fibrosierender Alveolitis die Glutathion-Synthese durch hohe Gaben von N-Acetyl-Cystein zu steigern. Unter 3 x täglich 600 mg NAC über 12 Wochen fiel hier der Methioninsulfoxidgehalt der ELF signifikant ab (Behr et al., 1997). Somit könnte diese Substanz, die klinisch als Mucolyticum eingeführt ist, auch ihren Platz in der supportiven Therapie von Tumorpatienten unter Zytostase finden.

Secretory Leukoprotease Inhibitor (SLPI) wirkt als Antiprotease ähnlich wie alpha-1-Antitrypsin und steht als rekombinantes Molekül zur Verfügung (rSLPI). Neben seiner Eigenschaft als Antiprotease wirkt es zugleich als Antioxidans, was es zum therapeutischen Einsatz prädestiniert (Schuster et al., 1996). Am Tier konnte nach inhalativer Verabreichung ein signifikanter Anstieg von GSH in der ELF nachgewiesen werden (Buhl et al., 1990). Ergebnisse über Studien an Patienten etwa an Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose, alpha-1-Antitrypsinmangel oder Mukoviszidose liegen derzeit noch nicht vor. In Abhängigkeit der klinischen Erfahrungen könnte eine zur Radio-Chemotherapie begleitende Gabe von rSLPI möglich sein.

Amifostin wurde als Protonenfänger in den 50er Jahren im Walter Reed Army Institute of Research gegen Strahlenschäden im Kriegsfall entwickelt. Das Prodrug Thiophosphat wird seiner aktiven Form, einem freien Thiol, intrazellulär durch die ubiquitär vorkommende membrangebundene alkalische Phosphatase dephosphorilisiert. Dieses freie Thiol ist ein hochwirksames Antioxidans und ähnlich dem Glutathion in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies zu deaktivieren (Souid et al., 1998). Da die Aktivität der alkalischen Phosphatase in malignen Zellen gegenüber normalem Gewebe deutlich vermindert ist, kommt es zu einer selektiven antioxidativen Schutzwirkung der nicht entarteten Zellen durch Amifostin (Capizzi et al., 1995; Peters et al., 1995). Zudem wurde für Thiol ein aktiver Transport aus Tumorzellen hypothetisiert, wodurch es zu einem potentiell

zytotoxischer Effekt für die entartete Zellpopulation kommen könnte (Taylor et al., 1997; Kurbacher et al., 1998). Zu der antioxidativen Wirkung von Thiol kommt die Fähigkeit, alkylierende Substanzen oder auch Platin direkt zu binden und damit zu neutralisieren. Dies hat zwischenzeitlich zu dem Einsatz in zahlreichen Therapiestudien bei Patienten mit malignen Erkrankungen als zytoprotektive Substanz geführt. Neben der geringeren allgemeinen Toxizität unter zytoreduktiver Therapie wurde klinisch eine verminderte Knochenmarksuppression (Budd, 1996a; Budd et al., 1997; Pierelli et al., 1998) und damit geringeres Auftreten von Neutropenien (Betticher et al., 1995) und Thrombopenien (Budd et al., 1996b) vermerkt. Diese Beobachtungen gaben Anlaß zum Einbezug von Amifostin in der multimodalen Therapie des NSCLC (Capizzi et al., 1995; Schiller, 1996; Tannehill et al., 1997) wie auch bei HNO-Tumoren (Bohuslavizki et al., 1998a; Bohuslavizki et al., 1998b) oder malignen Systemerkrankungen (Avilés et al., 1997). Zudem wurde es in mehreren Therapiestudien zum Gewebeschutz unter Strahlentherapie eingesetzt (Peters et al., 1995; Spencer et al., 1995; Capizzi et al., 1995; Patchen, 1995; Rieth et al., 1996; Tannehill et al., 1996).

Über die Wirkungsweise am Patienten liegen neben der eher allgemeinen Vorstellung, daß Amifostin antioxidativ wirkt und damit zum Organschutz unter Radio-Chemotherapie beiträgt, nur wenige Daten vor. Unter Doxorubicin-Gabe wurde für Amifostin eine cardioprotektive Wirkung bei der Ratte (Nazeyrollas et al., 1998) bzw. in vitro an Rattenherzmyocyten (Dorr et al., 1996) beschrieben, wobei die protektive Wirkung mit einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Glutathion-Konzentration verbunden war - ein Zusammenhang, der auch in neueren Übersichtsarbeiten zu diesem Thema vermehrt betont wird (Hospers et al., 1999; Links et al., 1999).

Zur Modulation von pulmonaler Toxizität unter Amifostin liegen nur wenige Daten vor. Am Tiermodell der Bleomycin-induzierten Fibrose wurde die Modulation von pulmonaler oxidativer Belastung sowohl bezüglich der Akuttoxizität (Tag 2) als auch der Fibroseinduktion (Tag 21) untersucht, wobei Amifostin die Lungenschäden signifikant vermindern konnte (Nici et al., 1998).

Amifostin ist somit als Radikalfänger in zahlreichen zytoreduktiven Therapiekombinationen vertreten, für die nur zum Teil oxidativer Streß als Ursache für unerwünschte Wirkungen beschrieben ist. Über seinen Wirkungsmechanismus als Protonenfänger ergibt sich jedoch auch aus der klinischen Erfahrungen die Evidenz, daß reaktive Sauerstoffspezies die Hauptursache unerwünschter pulmonaler Nebenwirkungen unter Radio-Chemotherapie sind.

Wirkungsweise und bisherige klinische Erfahrung scheinen den Versuch, dieser Substanz bei primär pneumologischen Krankheitsbildern mit vermehrtem pulmonalen oxidativen Stress, etwa bei Mukoviszidose oder idiopathischer Lungenfibrose einzusetzen, zu rechtfertigen. Bei Patienten mit Mukoviszidose bietet sich dieser Behandlungsansatz nicht nur wegen der chronisch entzündlichen Zerstörung des Lungengewebes im Rahmen der perpetuierten bakteriellen Kolonisierung und frühzeitigen Erschöpfung der Antiproteasen an (Roum et al., 1999). Kürzlich konnte hier an Epithelzelllinien gezeigt werden, daß neben der Mutation des transmembranen Conductance Regulator Genes mit nachfolgender Elektrolytverschiebung im bronchialen Schleim auch ein verminderter epithelialer Transport für Glutathion vorliegt (Gao et al., 1999).

9 Zusammenfassung

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß reaktive Sauerstoffspezies die entscheidenden Faktoren der pulmonalen Toxizität unter Radio-Chemotherapie sind. Sie induzieren eine akute pulmonale entzündliche Reaktion, unter der es zur Ausschüttung einer sich selbst verstärkenden Zytokinkaskade im Sinne eines multifaktoriellen Zytokinnetzwerkes und in der Folge unter einer persistierenden Zytokinkaskade zur Generierung von sekundären reaktiven Sauerstoffspezies kommt.

Die Aktivierung dieser Zytokinkaskade ist noch Monate nach Chemotherapie oder Strahlentherapie auch bei Patienten, die klinisch keine Symptome der Lungenschädigung zeigen, nachweisbar. Die Perpetuierung dieses Prozesses, der, ähnlich wie bei der fibrosierenden Alveolitis, mit einer Fibrosierung des Lungengewebes mit Ablagerung von extrazellulärer Matrix einhergehen kann, führt bei wiederholter zytoreduktiver Therapie, wie sie dem rezidivierenden Charakter des fortgeschrittenen Bronchialkarzinoms entspricht, zu einer überproportionalen oxidativen Lungenbelastung.

Die vorliegende Arbeit hat durch die systematische Analyse an 261 Lavagen von 199 Bronchialkarzinom-Patienten vor, unter und nach zytoreduktiver Therapie die Determinanten des oxidativen pulmonalen Stress untersucht.

Als Meßparameter des akuten oxidativen Stress ist die Gesamtzellzahl in der BALF, der Methioninsulfoxidgehalt sowie die Konzentration von Glutathion (gesamt und reduziert), IL-1, IL-6 und IL-8, TNF-alpha, weiterhin die VEGF-Konzentration in der ELF geeignet. Erstmalig gezeigt werden konnte hierbei, daß VEGF nicht nur im Rahmen der Neoangiogenese, sondern auch durch reaktive Sauerstoffspezies hochreguliert wird und oxidativen Stress sensitiv anzeigt.

Im Intervall zum akuten Lungentrauma ist die Konzentration von Glutathion, IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha und VEGF in der ELF ein Marker des perpetuierten oxidativen Stress, der auch Monate nach der zytoreduktiven Therapie nachweisbar ist.

Bei manifester Lungenfibrosierung könnte P-III-P ein sensibler Marker der Fibroblastenaktivierung und der Produktion extrazellulärer Matrix sein.

Die Untersuchungen ergaben zwischen den Folgen der Strahlentherapie und Chemotherapie lediglich quantitative, keine qualitativen Unterschiede.

Die vorliegende Arbeit möchte die Grundlage schaffen, dosisintensivierte multimodale Therapien bezüglich der oxidativen pulmonalen Belastungen invasiv zu monitoren. Dies könnte eine individuelle Dosisoptimierung durch die Bestimmung der individuellen oxidativen pulmonalen Kapazität, insbesondere der Glutathionkonzentration in der ELF, schaffen. Es wird hierbei die Hypothese aufgestellt, daß sich die Akuttoxizität wie die Wahrscheinlichkeit eines pulmonalen Folgeschadens nach Radio-Chemotherapie aus der Formel:

Lungenschaden = ROS + Inaktivierung von Antiproteasen

ableiten läßt.

Nach dieser Formel könnte unter invasivem Monitoring eine optimierte Dosisanpassung der Therapie und gegebenenfalls Modulation der Toxizität durch Gabe von Antiproteasen und Antioxidantien beim einzelnen Patienten erfolgen.

10 Verzeichnis der Abkürzungen

Verzeichnis der Abkürzungen

EGF	epidermal growth factor
GSSG	Glutathiondisulfid
GSH	reduziertes Glutathion
GSht	Gesamtkonzentration an Glutathion (GSH + GSSG)
HSP	Hitzeschockproteine
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
Met(O)	oxidierte Methioninreste am Gesamtmethioningehalt der ELF-Proteine
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
NADPH	Nikotinamid-Adenindinucleotidphosphat
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
P-III-P	N-terminales Prokollagen-III-Peptid
PBS	phosphate buffered saline
RIA	Radioimmunoassay
TGF-beta	Transforming growth factor beta
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

11 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

WHO handbook for reporting results of cancer treatment, Geneva:WHO Offset Publication, Ed. 48th, 1979.

Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur. Respir. J.* 2:561-585, 1989.

Clinical characteristics, diagnosis and treatment of elderly patients with lung cancer at non-surgical institutions: a multicenter study. North-Eastern Italian Oncology Group. Neoplasms of the Elderly Committee. *Tumori* 76:429-433, 1990.

Kompendium Internistische Onkologie, Teil 1, Berlin Heidelberg New York:Springer, 2. Auflage, 1996.

Adamson, I.Y., Bakowska, J. and Bowden, D.H. Mesothelial cell proliferation: a nonspecific response to lung injury associated with fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10:253-258, 1994.

Adamson, I.Y., Hedgecock, C. and Bowden, D.H. Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am. J. Pathol.* 137:385-392, 1990.

Adkins, W.K. and Taylor, A.E. Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia-reperfusion injury in rabbit lung. *J. Appl. Physiol.* 69:2012-2018, 1990.

Afaq, F., Abidi, P., Matin, R. and Rahman, Q. Activation of alveolar macrophages and peripheral red blood cells in rats exposed to fibers/particles. *Toxicol. Lett.* 99:175-182, 1998.

Stief, T.W., Aab, A. and Heimburger, N. Oxidative inactivation of purified human alpha-2-antiplasmin, antithrombin III, and C1-inhibitor. *Thromb. Res.* 49:581-589, 1988.

Agosti, J.M., Altman, L.C., Ayars, G.H., Loegering, D.A., Gleich, G.J. and Klebanoff, S.J. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes in vitro. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 79:496-504, 1987.

Agostini, C., Trentin, L., Facco, M., Sancetta, R., Cerutti, A., Tassinari, C., Cimarosto, L., Adami, F., Cipriani, A., Zambello, R. and Semenzato, G. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *J. Immunol.* 157:910-918, 1996.

Ahrendt, S.A., Chow, J.T., Xu, L.H., Yang, S.C., Eisenberger, C.F., Esteller, M., Herman, J.G., Wu, L., Decker, P.A., Jen, J. and Sidransky, D. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:332-339, 1999.

Aisner, J., Goutsou, M., Maurer, L.H., Cooper, R., Chahinian, P., Carey, R., Skarin, A., Slawson, R., Perry, M.C. and Green, M.R. Intensive combination chemotherapy, concurrent chest irradiation, and warfarin for the treatment of limited-disease small-cell lung cancer: a Cancer and Leukemia Group B pilot study. *J. Clin. Oncol.* 10:1230-1236, 1992.

Albain, K.S., Crowley, J.J. and Livingston, R.B. Long-term survival and toxicity in small cell lung cancer. Expanded Southwest Oncology Group experience. *Chest* 99:1425-1432, 1991.

Alberti, A., Luisetti, M., Braschi, A., Rodi, G., Iotti, G., Sella, D., Poletti, V., Benori, V. and Baritussio, A. Bronchoalveolar lavage fluid composition in alveolar proteinosis - Early changes after therapeutic lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154:817-820, 1996.

Albin, M., Magnani, C., Krstev, S., Rapiti, E. and Shefer, I. Asbestos and cancer: An overview of current trends in Europe. *Environ. Health Perspect.* 107 Suppl. 2:289-298, 1999.

Anderson, B.O., Brown, J.M., Bensard, D.D., Grosso, M.A., Banerjee, A., Patt, A., Whitman, G.J. and Harken, A.H. Reversible lung neutrophil accumulation can cause lung injury by elastase-mediated mechanisms. *Surgery* 108:262-267, 1990.

Ando, S., Nojima, K., Majima, H., Ishihara, H., Suzuki, M., Furusawa, Y., Yamaguchi, H., Koike, S., Ando, K., Yamauchi, M. and Kuriyama, T. Evidence for mRNA expression of vascular

endothelial growth factor by X-ray irradiation in a lung squamous carcinoma cell line. *Cancer Lett.* 132:75-80, 1998.

Antonelli, M., Lenti, L., Bufi, M., De Blasi, R.A., Vivino, G., Conti, G., Pelaia, P., Zicari, A., Pontieri, G. and Gasparetto, A. Differential evaluation of bronchoalveolar lavage cells and leukotrienes in unilateral acute lung injury and ARDS patients. *Intens. Care Med.* 15:439-445, 1989.

Antoniades, H.N., Bravo, M.A., Avila, R.E., Galanopoulos, T., Neville Golden, J., Maxwell, M. and Selman, M. Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 86:1055-1064, 1990.

Armitage, A.K., Ashford, J.R., Gorrod, J.W. and Sullivan, F.M. Environmental tobacco smoke - Is it really a carcinogen. *Med. Sci. Res.* 25:3-7, 1997.

Arriagada, R., de Guevara, J.C., Mouriessse, H., Hanzen, C., Couanet, D., Ruffie, P., Baldeyrou, P., Dewar, J., Lusinchi, A., Martin, M. and et al, Limited small cell lung cancer treated by combined radiotherapy and chemotherapy: evaluation of a grading system of lung fibrosis. *Radiother. Oncol.* 14:1-8, 1989.

Arriagada, R., Le Chevalier, T., Quoix, E., Ruffie, P., de Cremoux, H., Douillard, J.Y., Tarayre, M., Pignon, J.P. and Laplanche, A. ASTRO (American Society for Therapeutic Radiology and Oncology) plenary: Effect of chemotherapy on locally advanced non-small cell lung carcinoma: a randomized study of 353 patients. GETCB (Groupe d'Etude et Traitement des Cancers Bronchiques), FNCLCC (Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer) and the CEBI trialists. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20:1183-1190, 1991.

Avilés, A., Díaz-Maqueo, J.C., Talavera, A., García, E.L., Guzmán, R. and Nambo, M.J. Bone marrow protection with amifostine in the treatment of high-risk malignant lymphoma. *Eur. J. Cancer [A]* 33A:1323-1325, 1997.

Ballantyne, B., Dodd, D.E., Pritts, I.M., Nachreiner, D.J. and Fowler, E.H. Acute vapour inhalation toxicity of acrolein and its influence as a trace contaminant in 2-methoxy-3,4-dihydro-2H-pyran. *Hum.Toxicol.* 8:229-235, 1989.

Barnett, D. Preclinical Toxicology of Ifosfamide. *Semin. Oncol.* 9 (Suppl 1):8-13, 1982.

- Bassett, D.J., Elbon, C.L., Reichenbaugh, S.S., Boswell, G.A., Stevens, T.M., McGowan, M.C. and Kerr, J.S. Pretreatment with EDU decreases rat lung cellular responses to ozone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100:32-40, 1989.
- Bayreuther, K., Francz, P.I., Gogol, J. and Kontermann, K. Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems in vivo and in vitro. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 663:167-179, 1992.
- Becker, N. Cigarette smoking and lung cancer: a reconsideration of the British doctors' data with cumulative damage models. *Epidemiology* 5:27-34, 1994.
- Behr, J., Adelman-Grill, B.C., Krombach, F., Beinert, T., Schwaiblmair, M. and Fruhmann, G. Fibroblast chemotactic response elicited by native bronchoalveolar lavage fluid from patients with fibrosing alveolitis. *Thorax* 48:736-742, 1993.
- Behr, J., Beinert, T., Vogelmeier, C., Maier, K. and Fruhmann, G. Einfluß der Glutathionkonzentration in der epithelial lining fluid (ELF) auf die Oxidation alveolärer Proteine. *Pneumologie* 48:613-614, 1994.
- Behr, J., Degenkolb, B., Beinert, T., Meurer, M., Braun, B., Krombach, F., Vogelmeier, C. and Fruhmann, G. Increased oxidation of extracellular glutathione by bronchoalveolar inflammatory cells in diffuse fibrosing alveolitis. *Eur. Respir. J.* 8:1286-1295, 1995.
- Behr, J., Maier, K., Degenkolb, B., Krombach, F. and Vogelmeier, C. Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis - Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:1897-1901, 1997.
- Behr, J., B. Degenkolb, T. Beinert, F. Krombach and C. Vogelmeier. Pulmonary glutathione levels in acute episodes of farmers lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000 (*in press*).
- Beinert, T., Vogelmeier, C., Mazur, G., Krombach, F., Behr, J., Schluckebier, S. and Fruhmann, G. Nachweis von IL-8 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Patienten mit Farmerlunge nach akuter Heustaubexposition. *Atemw-Lungenkrkh.* 8:446-447, 1994.

- Beinert, T., Mergenthaler, H.G. and Possinger, K. Bronchialkarzinome. Diagnostik, Therapie, Nachsorge. Schriftenreihe der Medizinischen Universitäts-Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie Charité, Campus Mitte, Humboldt Universität zu Berlin. Gladenbach, Kempkes Verlag, 1. Auflage, 1998.
- Beinert, T., Mergenthaler, H.G., Sezer, O. and Possinger, K. Palliative chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: Goals and reality. *Onkologie* 22:63-64, 1999.
- Beinert, T., Binder, D., Oehm, C., Ziemer, S., Priem, F., Schweigert, M., Stuschke, M., Fleischhacker, M., Siebert, G., Mergenthaler, Werner, T.G., H.-G., Sezer, O., Possinger, K.: Increased levels of vascular endothel growth factor in bronchoalveolar lavage of patients with bronchial carcinoma B effect of tumor activity and oxidative stress due to radio-chemotherapy? *Eur. J. Med. Res.* 4:328-334, 1999.
- Beinert, T., Mergenthaler, H.G., Sezer, O., Löffel, J., Binder, D., Werner, T., Oehm, C. and Possinger, K.: Hypoxie bei soliden Tumoren. *DMW* 124: 534-40, 1999
- Beinert, T., Binder, D., Stuschke, M., Jörres, R.A., Oehm, C., Fleischhacker, M., Sezer, O., Mergenthaler, H.G. and Possinger, K. Oxidant-induced lung injury in anticancer therapy. *Eur J. Med. Res.* 4:43-53, 1999
- Beinert, T., Binder, D., Stuschke, M., Oehm, C., Jörres, R., Fleischhacker, M., Sezer, O, Abdija, S., Werner, T.-G., Mergenthaler, H.-G., Behr, J., Possinger, K. Oxidative Lungenschädigungen unter Chemo- und Strahlentherapie. *Pneumologie* 54:201-211, 2000.
- Beinert, T., Binder, D., Oehm, C., Ziemer, S., Priem, F., Stuschke, M., Schweigert, M., Siebert, G., Mergenthaler, H.-G., Sezer, O., Werner, T.-G., Schmid, P., Fleischhacker, M., Possinger, K. Further evidence for oxidant-induced VEGF upregulation in the bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients undergoing radio-chemotherapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126:352-356, 2000.
- Belinsky, M. and Jaiswal, A.K. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 12:103-117, 1993.
- Bernard, G.R., Wheeler, A.P., Arons, M.M., Morris, P.E., Paz, H.L., Russell, J.A., Wright, P.E., Carmichael, L.C., Higgins, S.B., Dupont, W.D., Edens, T.R., Swindell, B.B. and Steinberg,

K.P. A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. *Chest* 112:164-172, 1997.

Betticher, D.C., Anderson, H., Ranson, M., Meely, K., Oster, W. and Thatcher, N. Carboplatin combined with amifostine, a bone marrow protectant, in the treatment of non-small-cell lung cancer: A randomised phase II study. *Br. J. Cancer* 72:1551-1555, 1995.

Bikfalvi, A. Significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. *Eur. J. Cancer [A]* 31A:1101-1104, 1995.

Bjermer, L., Thunell, M. and Hallgren, R. Procollagen III peptide in bronchoalveolar lavage fluid. A potential marker of altered collagen synthesis reflecting pulmonary disease in sarcoidosis. *Lab. Invest.* 55:654-656, 1986.

Bjermer, L., Franzen, L., Littbrand, B., Nilsson, K., Angstrom, T. and Henriksson, R. Effects of smoking and irradiated volume on inflammatory response in the lung of irradiated breast cancer patients evaluated with bronchoalveolar lavage. *Cancer Res.* 50:2027-2030, 1990.

Bjermer, L., Hallgren, R., Nilsson, K., Franzen, L., Sandstrom, T., Sarnstrand, B. and Henriksson, R. Radiation-induced increase in hyaluronan and fibronectin in bronchoalveolar lavage fluid from breast cancer patients is suppressed by smoking. *Eur. Respir. J.* 5:785-790, 1992.

Bleehen, N.M., Girling, D.J., Gregor, A., Leonard, R.C., Machin, D., McKenzie, C.G., Morgan, D.A., Smyth, J.F., Spittle, M.F., Stephens, R.J. and et al, Can long-term survival be improved in patients with small-cell lung cancer (SCLC) and good performance status? Medical Research Council Lung Cancer Working Party. *Br. J. Cancer* 70:142-144, 1994.

Blot, W.J. and McLaughlin, J.K. Passive smoking and lung cancer risk: What is the story now. *J. Natl. Cancer Inst.* 90:1416-1417, 1998.

Boffetta, P., Pershagen, G., Jöckel, K.H., Forastiere, F., Gaborieau, V., Heinrich, J., Jahn, I., Kreuzer, M., Merletti, F., Nyberg, F., Rösch, F. and Simonato, L. Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: A multicenter study from Europe. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:697-701, 1999.

- Bohuslavizki, K.H., Brenner, W., Klutmann, S., Hübner, R.H., Lassmann, S., Feyerabend, B., Lüttges, J., Tinnemeyer, S., Clausen, M. and Henze, E. Radioprotection of salivary glands by amifostine in high-dose radioiodine therapy. *J. Nucl. Med.* 39:1237-1242, 1998.
- Bohuslavizki, K.H., Klutmann, S., Brenner, W., Mester, J., Henze, E. and Clausen, M. Salivary gland protection by amifostine in high-dose radioiodine treatment: Results of a double-blind placebo-controlled study. *J. Clin. Oncol.* 16:3542-3549, 1998.
- Bolster, M.B., Ludwicka, A., Sutherland, S.E., Strange, C. and Silver, R.M. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 40:743-751, 1997.
- Bonay, M., Soler, P., Riquet, M., Battesti, J.P., Hance, A.J. and Tazi, A. Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am J Respir Cell Mol.Biol.* 10:453-461, 1994.
- Borgström, P., Hillan, K.J., Sriramarao, P. and Ferrara, N. Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: Novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res.* 56:4032-4039, 1996.
- Borok, Z., Buhl, R., Grimes, G.J., Bokser, A.D., Hubbard, R.C., Holroyd, K.J., Roum, J.H., Czerski, D.B., Cantin, A.M. and Crystal, R.G. Effect of glutathione aerosol on oxidant-antioxidant imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 338:215-216, 1991.
- Botterman, J., Tasson, J., Schelstraete, K., Pauwels, R., Van der Straeten, M. and De Schryver, A. Scintigraphic, spirometric, and roentgenologic effects of radiotherapy on normal lung tissue. Short-term observations in 14 consecutive patients with breast cancer. *Chest* 97:97-102, 1990.
- Bouvet, M., Ellis, L.M., Nishizaki, M., Fujiwara, T., Liu, W.B., Bucana, C.D., Fang, B.L., Lee, J.J. and Roth, J.A. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res.* 58:2288-2292, 1998.
- Boyce, N.W., Fernando, N.S., Neale, T.J. and Holdsworth, S.R. Acute pulmonary and renal injury after administration of heterologous anti-lung antibodies in the rat. Characterization of

ultrastructural binding sites, basement membrane epitopes, and inflammatory mediation systems. *Lab. Invest.* 64:272-278, 1991.

Boyle, P. and Maisonneuve, P. Lung cancer and tobacco smoking. *Lung Cancer* 12:167-181, 1995.

Brauchle, M., Funk, J.O., Kind, P. and Werner, S. Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 271:21793-21797, 1996.

Brieland, J.K., Kunkel, R.G. and Fantone, J.C. Pulmonary alveolar macrophage function during acute inflammatory lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:1300-1306, 1987.

Brigham, K.L. and Meyrick, B. Endotoxin and lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:913-927, 1986.

Buccheri, G. Is there a standard treatment for locally advanced non-small cell lung cancer. *Chest* 109:864-866, 1996.

Budd, G.T. Amifostine and chemotherapy-related thrombocytopenia. *Semin. Oncol.* 23 *Suppl.* 8:49-52, 1996.

Budd, G.T., Ganapathi, R., Bukowski, R.M. and Murthy, S. Clinical effects of amifostine (Ethyol(R)) in patients treated with carboplatin. *Eur. J. Cancer [A]* 32A *Suppl.* 4:S43-S45, 1996.

Budd, G.T., Ganapathi, R., Adelstein, D.J., Pelley, R., Olencki, T., Petrus, J., McLain, D., Zhang, J.L., Capizzi, R. and Bukowski, R.M. Randomized trial of carboplatin plus amifostine versus carboplatin alone in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 80:1134-1140, 1997.

Buhl, R., Jaffe, H.A., Holroyd, K.J., Wells, F.B., Mastrangeli, A., Saltini, C., Cantin, A.M. and Crystal, R.G. Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals. *Lancet* 2:1294-1298, 1989.

Buhl, R. and Vogelmeier, C. Therapie von Lungenkrankheiten mit Antioxidantien. *Pneumologie* 48:50-56, 1994.

Buhl, R., Vogelmeier, C., Critenden, M., Hubbard, R.C., Hoyt, R.F.J., Wilson, E.M., Cantin, A.M.

and Crystal, R.G. Augmentation of glutathione in the fluid lining the epithelium of the lower respiratory tract by directly administering glutathione aerosol. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 87:4063-4067, 1990.

Bunn, P.A., Jr., Vokes, E.E., Langer, C.J. and Schiller, J.H. An update on North American randomized studies in non-small cell lung cancer. *Semin.Oncol.* 25 *Suppl.* 9:2-10, 1998.

Burdett, S., Parmar, M.K.B., Stewart, L.A., Souhami, R.L., Arriagada, R., Girling, D.J., Pignon, J.P., Torri, V., Bricet, A.H., Lafitte, J.J., Dautzenberg, B., Debevec, M., Kovac, V., Stephens, R.J., Gregor, A., Piantadosi, S., Rocmans, P., Van Houtte, P., Wang, M. and PORT Meta-Anal Trialists Grp, Postoperative radiotherapy in nonsmall-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. *Lancet* 352:257-263, 1998.

Calhoun, W.J. Enhanced reactive oxygen species metabolism of air space cells in hypersensitivity pneumonitis. *J. Lab. Clin. Med.* 117:443-452, 1991.

Calogero, A.E., Minacapilli, G., Nicolosi, A.M., Moncada, M.L., Mistretta, A., Latteri, S.F., Polosa, P. and D'Agata, R. Limited clinical usefulness of plasma corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin and beta-endorphin measurements as markers of lung cancer. *J. Endocrinol. Invest.* 15:581-586, 1992.

Cantin, A.M. and Begin, R. Glutathione and inflammatory disorders of the lung. *Lung* 169:123-138, 1991.

Cantin, A.M., North, S.L., Fells, G.A., Hubbard, R.C. and Crystal, R.G. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 79:1665-1673, 1987.

Capelli, O., Rovatti, E., Gilioli, F., Garuti, G.C., Lega, M., De Maria, D., Covi, M., Capitolo, S., Fontana, A., Pellegrino, M. and et al, BAL modifications after antineoplastic and immunomodulant therapy in lung cancer. *Respiration* 59 *Suppl* 1:50-52, 1992.

Capizzi, R.L. and Oster, W. Protection of normal tissue from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine: Clinical experiences. *Eur. J. Cancer [A]* 31A *Suppl.* 1:S8-S13, 1995.

- Carre, P.C., Mortenson, R.L., King, T.E.J., Noble, P.W., Sable, C.L. and Riches, D.W. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* 88:1802-1810, 1991.
- Castranova, V., Rabovsky, J., Tucker, J.H. and Miles, P.R. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93:472-483, 1988.
- Castro, M., Veeder, M.H., Mailliard, J.A., Tazelaar, H.D. and Jett, J.R. A prospective study of pulmonary function in patients receiving mitomycin. *Chest* 109:939-944, 1996.
- Cerny, T., Kaplan, S., Pavlidis, N., Schoffski, P., Epelbaum, R., van Meerbeek, J., Wanders, J., Franklin, H.R. and Kaye, S. Docetaxel (Taxotere) is active in non-small-cell lung cancer: a phase II trial of the EORTC Early Clinical Trials Group (ECTG). *Br. J. Cancer* 70:384-387, 1994.
- Charloux, A., Quoix, E., Wolkove, N., Small, D., Pauli, G. and Kreisman, H. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: Reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. *Int. J. Epidemiol.* 26:14-23, 1997.
- Choi, A.M.K. and Alam, J. Heme oxygenase-1: Function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15:9-19, 1996.
- Choung, J., Taylor, L., Thomas, K., Zhou, X., Kagan, H., Yang, X. and Polgar, P. Role of EP2 receptors and cAMP in prostaglandin E2 regulated expression of type I collagen $\alpha 1$, lysyl oxidase, and cyclooxygenase-1 genes in human embryo lung fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 71:254-263, 1998.
- Claffey, K.P., Brown, L.F., Del Aguila, L.F., Tognazzi, K., Yeo, K.T., Manseau, E.J. and Dvorak, H.F. Expression of vascular permeability factor vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res.* 56:172-181, 1996.
- Claffey, K.P. and Robinson, G.S. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: Consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 15:165-176,

1996.

Clark, C.J., Pollock, A.J., Reid, W.H., Campbell, D. and Gemmell, C. Role of pulmonary alveolar macrophage activation in acute lung injury after burns and smoke inhalation. *Lancet* 2:872-874, 1988.

Clelland, C., Higenbottam, T., Otulana, B., Stewart, S., Igboaka, G., Scott, J., Smyth, R. and Wallwork, J. Histologic prognostic indicators for the lung allografts of heart-lung transplants. *J Heart Transplant.* 9:177-185, 1990.

Cochrane, C.G. Mechanisms of oxidant injury of cells. *Molec. Aspects Med.* 12:137-147, 1991.

Colvin, M. The Comparative Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Semin. Oncol.* 9 (Suppl. 1):2-7, 1982.

Comella, P., Frasci, G., Panza, N., Manzione, L., Lorusso, V., Di Rienzo, G., Cioffi, R., De Cataldis, G., Maiorino, L., Bilancia, D., Nicoletta, G., Natale, M., Carpagnano, F., Pacilio, C., De Lena, M., Bianco, A. and Comella, G. Cisplatin, gemcitabine, and vinorelbine combination therapy in advanced non-small-cell lung cancer: A phase II randomized study of the Southern Italy Cooperative Oncology Group. *J.Clin.Oncol.* 17:1526-1534, 1999.

Comis, R.L. Carboplatin in the treatment of non-small cell lung cancer: a review. *Oncology* 50 Suppl 2:37-41, 1993.

Comstock, G.W., Alberg, A.J., Huang, H.Y., Wu, K.N., Burke, A.E., Hoffman, S.C., Norkus, E.P., Gross, M., Cutler, R.G., Morris, J.S., Spate, V.L. and Helzlsouer, K.J. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: Ascorbic acid, carotenoids, α -tocopherol, selenium, and total peroxyl radical absorbing capacity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6:907-916, 1997.

Constantin, D., Mehrotra, K., Rahimtula, A., Moldeus, P. and Jernstrom, B. Stimulatory effects of sulfur and nitrogen oxides on carcinogen activation in human polymorphonuclear leukocytes. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 4:161-164, 1994.

Cremades, M.J., Menéndez, R., Rubio, V. and Sanchis, J. Fibronectin in bronchoalveolar lavage

fluid in lung cancer: Tumor or inflammatory marker. *Respiration* 65:178-182, 1998.

Crew, J.P. Vascular endothelial growth factor: An important angiogenic mediator in bladder cancer. *Eur. Urol.* 35:2-8, 1999.

Crouch, E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 259:L159-L184, 1990.

Crystal, R.G., Reynolds, H.Y. and Kalica, A.R. Bronchoalveolar lavage. The report of an international conference. *Chest* 90:122-131, 1986.

Curzio, M., Esterbauer, H. and Dianzani, M.U. Chemotactic activity of hydroxyalkenals on rat neutrophils. *Int. J. Tissue React.* 7:137-142, 1985.

Curzio, M. Interaction between neutrophils and 4-hydroxyalkenals and consequences on neutrophil motility. *Free Radic. Res. Commun.* 5:55-66, 1988.

Dancey, J. and Le Chevalier, T. Non-small cell lung cancer: An overview of current management. *Eur. J. Cancer [A] 33A Suppl.* 1:S2-S7, 1997.

Davidson, J.M. Biochemistry and turnover of lung interstitium. *Eur. Respir. J.* 3:1048-1063, 1990.

Davis, G.S. Pulmonary macrophage interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production in chronic lung injury and remodeling. *Chest* 99:80S, 1991.

De Gracia, J., Bravo, C., Miravittles, M., Tallada, N., Orriols, R., Bellmunt, J., Vendrell, M. and Morell, F. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147:649-652, 1993.

De Leij, L., Berendsen, H. and The, H. Small cell lung cancer. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 149:1-4, 1987.

De, A.K., Rajan, R.R., Krishnamoorthy, L., Bhatt, M.B. and Singh, B.B. Oxidative stress in

radiation-induced interstitial pneumonitis in the rat. *Int. J. Radiat. Biol.* 68:405-409, 1995.

Dearing, M.P., Steinberg, S.M., Phelps, R., Anderson, M.J., Mulshine, J.L., Ihde, D.C. and Johnson, B.E. Outcome of patients with small-cell lung cancer: effect of changes in staging procedures and imaging technology on prognostic factors over 14 years. *J. Clin. Oncol.* 8:1042-1049, 1990.

Demling, R., Lalonde, C., Ikegami, K., Picard, L. and Nayak, U. Alpha-tocopherol attenuates lung edema and lipid peroxidation caused by acute zymosan-induced peritonitis. *Surgery* 117:226-231, 1995.

Deneke, S.M., Susanto, I., Vogel, K.A., Williams, C.E. and Lawrence, R.A. Mechanisms of use of extracellular glutathione by lung epithelial cells and pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12:662-668, 1995.

Denis, M., Cormier, Y., Fournier, M., Tardif, J. and Laviolette, M. Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:477-483, 1991.

Denis, M. Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis. *Immunology* 82:584-590, 1994.

Depuydt, C.E., Bosmans, E., Zalata, A., Schoonjans, F. and Comhaire, F.H. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. *J. Androl.* 17:699-707, 1996.

Devesa, S.S., Grauman, D.J. and Blot, W.J. Recent cancer patterns among men and women in the United States: clues for occupational research. *J. Occup. Med* 36:832-841, 1994.

DiGiovine, B., Lynch, J.P., III, Martinez, F.J., Flint, A., Whyte, R.I., Iannettoni, M.D., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Glass, M.C., Wilke, C.A., Morris, S.B., Kunkel, S.L. and Strieter, R.M. Bronchoalveolar lavage neutrophilia is associated with obliterative bronchiolitis after lung transplantation role of IL-8. *J. Immunol.* 157:4194-4202, 1996.

- Dingwall, C. and Laskey, R. The nuclear membrane. *Science* 258:942-947, 1992.
- Doherty, D.E., Worthen, G.S. and Henson, P.M. Inflammation in interstitial lung disease. In: *Interstitial lung disease*, edited by Schwarz, M.I. and King, T.E. New York: Mosby Year Book, 1993, p. 23-43.
- Dorr, R.T., Lagel, K. and McLean, S. Cardioprotection of rat heart myocytes with amifostine (Ethyol(R)) and its free thiol, WR-1065, in vitro. *Eur. J. Cancer [A]* 32A *Suppl.* 4:S21-S25, 1996.
- Dowlati, A., Loo, M., Bury, T., Fillet, G. and Beguin, Y. Soluble and cell-associated transferrin receptor in lung cancer. *Br. J. Cancer* 75:1802-1806, 1997.
- Dörger, M., Allmeling, A.M., Neuber, A., Behr, J., Rambeck, W. and Krombach, F. Interspecies comparison of rat and hamster alveolar macrophage antioxidative and oxidative capacity. *Environ. Health Perspect.* 105 *Suppl.* 5:1309-1312, 1997.
- Dresler, C.M., Fratelli, C. and Babb, J. Prognostic value of positive pleural lavage in patients with lung cancer resection. *Ann. Thorac. Surg.* 67:1435-1439, 1999.
- Drozd, R., Parmentier, C., Hachad, H., Leroy, P., Siest, G. and Wellman, M. gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radic. Biol. Med.* 25:786-792, 1998.
- Dvorak, H.F., Detmar, M., Claffey, K.P., Nagy, J.A., Van de Water, L. and Senger, D.R. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: An important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:233-235, 1995.
- Eck, H.P., Frey, H. and Droge, W. Elevated plasma glutamate concentrations in HIV-1-infected patients may contribute to loss of macrophage and lymphocyte functions. *Int. Immunol.* 1:367-372, 1989.
- Eichacker, P.Q., Hoffman, W.D., Farese, A., Banks, S.M., Kuo, G.C., MacVittie, T.J. and Natanson, C. TNF but not IL-1 in dogs causes lethal lung injury and multiple organ dysfunction similar

to human sepsis. *J. Appl. Physiol.* 71:1979-1989, 1991.

Eickelberg, O., Köhler, E., Reichenberger, F., Bertschin, S., Woodtli, T., Erne, P., Perruchoud, A.P. and Roth, M. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-1 and TGF-3. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 276:L814-L824, 1999.

Einhorn, L., Krause, M. and Hornback, N. Enhanced pulmonary toxicity with bleomycin and radiotherapy in oat cell lung cancer. *Cancer* 37:2414-2416, 1976.

El-Assal, O.N., Yamanoi, A., Soda, Y., Yamaguchi, M., Igarashi, M., Yamamoto, A., Nabika, T. and Nagasue, N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: Possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 27:1554-1562, 1998.

Elborn, J.S. and Shale, D.J. Cystic fibrosis. 2. Lung injury in cystic fibrosis. *Thorax* 45:970-973, 1990.

Elias, A., Ibrahim, J., Skarin, A.T., Wheeler, C., McCauley, M., Ayash, L., Richardson, P., Schnipper, L., Antman, K.H. and Frei, E., III Dose-intensive therapy for limited-stage small-cell lung cancer: Long-term outcome. *J. Clin. Oncol.* 17:1175-1184, 1999.

Elias, J.A., Schreiber, A.D. and Gustilo, K. Differential interleukin-1 elaboration by unfractionated and density fractionated human alveolar macrophages and blood monocytes: Relationship to cell maturity. *J. Immunol.* 135:2198-2204, 1985.

Erhola, M., Kellokumpu-Lehtinen, P., Metsä-Ketelä, T., Alanko, K. and Nieminen, M.M. Effects of anthracyclin-based chemotherapy on total plasma antioxidant capacity in small cell lung cancer patients. *Free Radic. Biol. Med.* 21:383-390, 1996.

Erhola, M., Toyokuni, S., Okada, K., Tanaka, T., Hiai, H., Ochi, H., Uchida, K., Osawa, T., Nieminen, M.M., Alho, H. and Kellokumpu-Lehtinen, P. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: Association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett.* 409:287-291, 1997.

- Ernster, V.L. The epidemiology of lung cancer in women. *Ann. Epidemiol.* 4:102-110, 1994.
- Ernster, V.L. Female lung cancer. *Annu. Rev. Public Health* 17:97-114, 1996.
- Erroi, A., Pagani, P., Sironi, M. and Salmona, M. In vivo exposure to NO₂ reduces TNF and IL-6 production by endotoxin-stimulated alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 271:L132-L138, 1996.
- Fabisiak, J.P., Evans, J.N. and Kelley, J. Increased expression of PDGF-B (c-sis) mRNA in rat lung precedes DNA synthesis and tissue repair during chronic hyperoxia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1:181-189, 1989.
- Fahey, P.J., Utell, M.J., Mayewski, R.J., Wandtke, J.D. and Hyde, R.W. Early Diagnosis of Bleomycin Pulmonary Toxicity Using Bronchoalveolar Lavage in Dogs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:126-130, 1982.
- Faith, A., Schellenberg, D.M., Rees, A.D. and Mitchell, D.M. Antigenic specificity and subset analysis of T cells isolated from the bronchoalveolar lavage and pleural effusion of patients with lung disease. *Clin. Exp. Immunol* 87:272-278, 1992.
- Feld, R., Borges, M., Giner, V., Ginsberg, R., Harper, P., Klastersky, J., Lacquet, L., Paesmans, M., Payne, D., Rosell, R. and et al, Prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 11 *Suppl* 3:S19-S23, 1994.
- Ferrara, N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 36:127-137, 1995.
- Ferrarini, M., Pupa, S.M., Zocchi, M.R., Rugarli, C. and Menard, S. Distinct pattern of HSP72 and monomeric laminin receptor expression in human lung cancers infiltrated by gamma/delta T lymphocytes. *Int. J. Cancer* 57:486-490, 1994.
- Filderman, A.E., Genovese, L.A. and Lazo, J.S. Alterations in pulmonary protective enzymes following systemic bleomycin treatment in mice. *Biochem. Pharmacol.* 37:1111-1116, 1988.

- Findlay, M.P., Griffin, A.M., Raghavan, D., McDonald, K.E., Coates, A.S., Duval, P.J. and Gianoutsos, P. Retrospective review of chemotherapy for small cell lung cancer in the elderly: does the end justify the means? *Eur. J. Cancer* 27:1597-1601, 1991.
- Franchin, G., Tumolo, S., Scarabelli, C., De Paoli, A., Boz, G., Crivellari, D., Arcicasa, M., Bortolus, R., Gobitti, C., Minatel, E. and et al, Whole abdomen radiation therapy after a short chemotherapy course and second-look laparotomy in advanced ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 41:206-211, 1991.
- Fujimoto, K., Kubo, K., Yamaguchi, S., Honda, T. and Matsuzawa, Y. Eosinophil activation in patients with pulmonary fibrosis. *Chest* 108:48-54, 1995.
- Fuks, Z., Persaud, R.S., Alfieri, A., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Schwartz, J.L., Seddon, A.P., Cordon-Cardo, C. and Haimovitz-Friedman, A. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 54:2582-2590, 1994.
- Gabrielli, G.B., Capra, F., Casaril, M., Corrocher, R., Colombari, R. and De Sandre, G. Serum laminin P1 in chronic viral hepatitis: Correlations with liver histological activity and diagnostic value. *Clin. Chim. Acta* 252:171-180, 1996.
- Gadducci, A., Ferdeghini, M., Fanucchi, A., Annicchiarico, C., Ciampi, B., Prontera, C. and Genazzani, A.R. Serum preoperative vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian cancer: Relationship with prognostic variables and clinical outcome. *Anticancer Res.* 19:1401-1405, 1999.
- Gadgeel, S.M., Ramalingam, S., Cummings, G., Kraut, M.J., Wozniak, A.J., Gaspar, L.E. and Kalemkerian, G.P. Lung cancer in patients < 50 years of age - The experience of an academic multidisciplinary program. *Chest* 115:1232-1236, 1999.
- Gao, L., Kim, K.J., Yankaskas, J.R. and Forman, H.J. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 277:L113-L118, 1999.
- Geara, F.B., Komaki, R., Tucker, S.L., Travis, E.L. and Cox, J.D. Factors influencing the development of lung fibrosis after chemoradiation for small cell carcinoma of the lung: Evidence for inherent interindividual variation. *Int .J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 41:279-286,

1998.

- Giaccone, G. Chemotherapy of advanced non-small-cell lung cancer: "Those who cannot remember the past are condemned to repeat it" - Reply 2. *J.Clin.Oncol.* 17:735, 1999.
- Gianni, L., Vigano Lanzi, L., Niggellar, M. and Malatesta, V. Role of daunosamine and hydroxyacetyl side chain in reaction with iron and lipid peroxidation by anthracyclines. *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1104-1111, 1988.
- Gibson, P.G., Bryant, D.H., Morgan, G.W., Yeates, M., Fernandez, V., Penny, R. and Breit, S.N. Radiation-Induced Lung Injury: A Hypersensitivity Pneumonitis? *Ann. Intern. Med.* 109:288-291, 1988.
- Gille, L. and Nohl, H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 23:775-782, 1997.
- Giri, S.N. and Hyde, D.M. Increases in severity of lung damage and mortality by treatment with cyclo and lipoxygenase inhibitors in bleomycin and hyperoxia model of lung injury in hamsters. *Pathology* 19:150-158, 1987.
- Gonias, S.L., Swaim, M.W., Massey, M.F. and Pizzo, S.V. cis-dichlorodiammineplatinum (II) as a selective modifier of the oxidation-sensitive reactive-center methionine in alpha 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.* 263:393-397, 1988.
- Gorman, A.M., Heavey, B., Creagh, E., Cotter, T.G. and Samali, A. Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett.* 445:98-102, 1999.
- Gossart, S., Cambon, C., Orfila, C., Séguélas, M.H., Lepert, J.C., Rami, L., Carré, P. and Pipy, B. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF- α production in rat lung inflammation induced by silica. *J. Immunol.* 156:1540-1548, 1996.
- Gozin, A., Franzini, E., Andrieu, V., Da Costa, L., Rollet-Labelle, E. and Pasquier, C. Reactive oxygen species activate focal adhesion kinase, paxillin and P130CAS tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 25:1021-1032, 1998.

- Greally, P., Hussein, M.J., Cook, A.J., Sampson, A.P., Piper, P.J. and Price, J.F. Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child* 68:389-392, 1993.
- Greenwald, R.A. and Moy, W.W. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23:455-463, 1980.
- Gregor, A., Drings, P., Burghouts, J., Postmus, P.E., Morgan, D., Sahnoud, T., Kirkpatrick, A., Dalesio, O. and Giaccone, G. Randomized trial of alternating versus sequential radiotherapy/chemotherapy in limited-disease patients with small-cell lung cancer: A European organization for research and treatment of cancer lung cancer cooperative group study. *J. Clin. Oncol.* 15:2840-2849, 1997.
- Gross, N.J. Pulmonary Effects of Radiation Therapy. *Ann. Intern. Med.* 86:81-92, 1977.
- Guerry-Force, M.L., Perkett, E.A., Brigham, K.L. and Meyrick, B. Early Structural Changes in Sheep Lung following Thoracic Irradiation. *Radiat. Res.* 114:138-153, 1988.
- Guidot, D.M., Repine, M.J., Hybertson, B.M. and Repine, J.E. Inhaled nitric oxide prevents neutrophil-mediated, oxygen radical-dependent leak in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 269:L2-L5, 1995.
- Gurtoo, H.L., Hipkens, J.H. and Sharma, S.D. Role of Glutathione in the Metabolism-dependent Toxicity and Chemotherapy of Cyclophosphamide. *Cancer Res.* 41:3584-3591, 1981.
- Gutierrez, H.H., Nieves, B., Chumley, P., Rivera, A. and Freeman, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: Oxidant-protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 21:43-52, 1996.
- Gutteridge, J.M.C., Mumby, S., Quinlan, G.J. and Chung, K.F. Pro-oxidant iron is present in human pulmonary epithelial lining fluid: Implications for oxidative stress in the lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:1024-1027, 1996.
- Hackshaw, A.K., Law, M.R. and Wald, N.J. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *Br. Med. J.* 315:980-988, 1997.

Halliwell, B. Albumin-an important extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* 37:569-571, 1988.

Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.* 91 (suppl 3C):14S-22S, 1991.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Cross, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now. *J. Lab. Clin. Med.* 119:598-620, 1992.

Halliwell, B. Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutr. Rev.* 55:S44-S49, 1997.

Halme, M., Hallman, M., Routsalainen, T., Piilonen, A., Taskinen, E., Pekonen, M., Maasilta, P. and Mattson, K. Tumor response and radiation-induced lung injury in patients with recurrent small cell lung cancer treated with radiotherapy and concomitant interferon-alpha. *Lung Cancer* 23:39-52, 1999.

Hamilton, R.F., Li, L., Felder, T.B. and Holian, A. Bleomycin induces apoptosis in human alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 269:L318-L325, 1995.

Haraf, D.J., Devine, S., Ihde, D.C. and Vokes, E.E. The evolving role of systemic therapy in carcinoma of the lung. *Semin. Oncol.* 19:72-87, 1992.

Harris, J.B., Chang, L.Y. and Crapo, J.D. Rat lung alveolar type I epithelial cell injury and response to hyperoxia. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4:115-125, 1991.

Hay, J.G., Haslam, P.L., Dewar, A., Addis, B., Turner Warwick, M. and Laurent, G.J. Development of acute lung injury after the combination of intravenous bleomycin and exposure to hyperoxia in rats. *Thorax* 42:374-382, 1987.

Hay, J.G., Haslam, P.L., Turner Warwick, M. and Laurent, G.J. The effects of iron and desferrioxamine on the lung injury induced by intravenous bleomycin and hyperoxia. *Free Radic. Res Commun.* 4:109-114, 1987.

- Hay, J., Shahzeidi, S. and Laurent, G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch. Toxicol.* 65:81-94, 1991.
- Henke, C., Marineili, W., Jessurun, J., Fox, J., Harms, D., Peterson, M., Chiang, L. and Doran, P. Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. *Am. J. Pathol.* 143:1189-1199, 1993.
- Hogg, J.C. Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiol. Rev.* 67:1249-1295, 1987.
- Holford, T.R., Zheng, T.Z. and Mayne, S.T. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90:783, 1998.
- Hopwood, P. and Stephens, R.J. Symptoms at presentation for treatment in patients with lung cancer: implications for the evaluation of palliative treatment. The Medical Research Council (MRC) Lung Cancer Working Party. *Br. J. Cancer* 71:633-636, 1995.
- Hospers, G.A.P., Eisenhauer, E.A. and De Vries, E.G.E. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents. A review, indications for use and prospects. *Br. J. Cancer* 80:629-638, 1999.
- Housset, B., Hurbain, I., Masliah, J., Laghsal, A., Chaumette Demaugre, M.T., Karam, H. and Derenne, J. Toxic effects of oxygen on cultured alveolar epithelial cells, lung fibroblasts and alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.* 4:1066-1075, 1991.
- Hunninghake, G.W., Gadek, J.E., Kawanami, O., Ferrans, V.J. and Crystal, R.G. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: Evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.* 97:149-206, 1979.
- Hunter, E.A.L. and Grimble, R.F. Cysteine and methionine supplementation modulate the effect of tumor necrosis factor " on protein synthesis, glutathione and zinc concentration of liver and lung in rats fed a low protein diet. *J. Nutr.* 124:2319-2328, 1994.
- Hussein, A.M., Feun, L.G., Sridhar, K.S., Benedetto, P., Waldman, S. and Otrakji, C.L. Combination chemotherapy and radiotherapy for small-cell carcinoma of the esophagus. A

case report of long-term survival and review of the literature. *Am. J. Clin. Oncol.* 13:369-373, 1990.

Iacobini, M., Palumbo, G., Cassiani, F., Perla, F.M., Werner, B., Menichelli, A. and Del Principe, D. Superoxide release by human polymorphonuclear leukocytes in the presence of deferoxamine. *Haematologica* 82:411-414, 1997.

Iannuzzi, M.C. and Scoggin, C.H. Small cell lung cancer. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:593-608, 1986.

Idell, S., Gonzalez, K.K., MacArthur, C.K., Gillies, C., Walsh, P.N., McLarty, J. and Thrall, R.S. Bronchoalveolar lavage procoagulant activity in bleomycin-induced lung injury in marmosets. Characterization and relationship to fibrin deposition and fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:124-133, 1987.

Ihde, D.C., Seifter, E.J., Johnson, B.E. and Glatstein, E. Review of concurrent chemotherapy/radiotherapy combinations in small cell lung cancer. *Antibiot. Chemother.* 41:92-95, 1988.

Ikeda, N., Adachi, M., Taki, T., Huang, C., Hashida, H., Takabayashi, A., Sho, M., Nakajima, Y., Kanehiro, H., Hisanaga, M., Nakano, H. and Miyake, M. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 79:1553-1563, 1999.

Issels, R.D., Meier, T.H., Müller, E., Multhoff, G. and Wilmanns, W. Ifosfamide induced stress response in human lymphocytes. *Mol. Aspects Med.* 14:281-286, 1993.

Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M. and Sato, Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 169:522-531, 1996.

Jackson, J.H., Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Vosbeck, K., Sauerheber, R., Weitzman, S.A. and Cochrane, C.G. Role of oxidants in DNA damage. Hydroxyl radical mediates the synergistic DNA damaging effects of asbestos and cigarette smoke. *J. Clin. Invest.* 80:1090-1095, 1987.

Jackson, R.M. Molecular, pharmacologic, and clinical aspects of oxygen-induced lung injury. *Clin.*

Chest. Med 11:73-86, 1990.

Janssen, Y.M.W, Van Houten, B., Borm, P.J.A. and Mossman, B.T. Cell and Tissue Responses to Oxidative Damage. Lab. Invest. 69:261-274, 1993.

Jenkinson, S.G. Free radical effects on lung metabolism. Clin. Chest. Med 10:37-47, 1989.

Johnson, D.H., Turrisi, A.T., Chang, A.Y., Blum, R., Bonomi, P., Ettinger, D. and Wagner, H. Alternating chemotherapy and twice-daily thoracic radiotherapy in limited-stage small-cell lung cancer: a pilot study of the Eastern Cooperative Oncology Group. J. Clin. Oncol. 11:879-884, 1993.

Jones, A.W. and Reeve, N.L. Ultrastructural study of bleomycin-induced pulmonary changes in mice. J. Pathol. 124:227-233, 1978.

Kamata, H. and Hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. Cell. Signal. 11:1-14, 1999.

Kanofsky, J.R. Singlet oxygen production by bleomycin. J. Biol. Chem. 261:13546-13550, 1986.

Kasper, M., Reimann, T., Hempel, U., Wenzel, K.W., Bierhaus, A., Schuh, D., Dimmer, V., Haroske, G. and Müller, M. Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis. Histochem. Cell Biol. 109:41-48, 1998.

Kasper, M., Schuh, D. and Muller, M. Bauhinia purpurea lectin (BPA) binding of rat type I pneumocytes: alveolar epithelial alterations after radiation-induced lung injury. Exp.Toxicol. Pathol. 46:361-367, 1994.

Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A. and Satow, Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res. 55:5687-5692, 1995.

Keimowitz, R.I. Immunglobulins in normal human tracheobronchial washing. J. Lab Clin. Med.

63:54-59, 1964.

Kelley, J. Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:765-788, 1990.

Kelly, F.J. and Lubec, G. Hyperoxic injury of immature guinea pig lung is mediated via hydroxyl radicals. *Pediatr. Res.* 38:286-291, 1995.

Kelly, F.J. Gluthathione: in defence of the lung. *Food Chem.Toxicol.* 37:963-966, 1999.

Khalil, N. and Greenberg, A.H. The role of TGF-beta in pulmonary fibrosis. *Ciba. F. Symp.* 157:194-207, 1991.

Khalil, N., O'Connor, R.N., Flanders, K.C., Shing, W. and Whitman, C.I. Regulation of type II alveolar epithelial cell proliferation by TGF-beta during bleomycin-induced lung injury in rats. *Am. J. Physiol.* 267:L498-L507, 1994.

Kindas-Mugge, I., Pohl, W.R., Zavadova, E., Kohn, H.D., Fitzal, S., Kummer, F. and Micksche, M. Alveolar macrophages of patients with adult respiratory distress syndrome express high levels of heat shock protein 72 mRNA. *Shock* 5:184-189, 1996.

Kirkbride, P., Gelmon, K., Eisenhauer, E., Fisher, B. and Dulude, H. A phase I/II study of paclitaxel and concurrent radiotherapy in advanced nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 39:1107-1111, 1997.

Kjellberg, S.I., Dresler, C.M. and Goldberg, M. Pleural cytologies in lung cancer without pleural effusions. *Ann. Thorac. Surg.* 64:941-944, 1997.

Klein, G., Langegger, M., Timpl, R. and Ekblom, P. Role of laminin A chain in the development of epithelial cell polarity. *Cell* 55:331-341, 1988.

Koh, D.W. and Castro, M. Pulmonary Toxicity of Chemotherapeutic Drugs. In: *The Chemotherapy Sourcebook*, edited by Perry, M.C. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 665-695. 1. Auflage, 1996

- Kolch, W., Martiny-Baron, G., Kieser, A. and Marmé, D. Regulation of the expression of the VEGF/VPS and its receptors: Role in tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 36:139-155, 1995.
- Kondo, T., Sharp, F.R., Honkaniemi, J., Mikawa, S., Epstein, C.J. and Chan, P.H. DNA fragmentation and prolonged expression of c-fos, c-jun, and hsp 70 in kainic acid-induced neuronal cell death in transgenic mice overexpressing human CuZn-superoxide dismutase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17:241-256, 1997.
- Konno, H., Arai, T., Tanaka, T., Baba, M., Matsumoto, K., Kanai, T., Nakamura, S., Baba, S., Naito, Y., Sugimura, H., Yukita, A., Asano, M. and Suzuki, H. Antitumor effect of a neutralizing antibody to vascular endothelial growth factor on liver metastasis of endocrine neoplasm. *Jpn. J. Cancer Res.* 89:933-939, 1998.
- Korfhagen, T.R., Swantz, R.J., Wert, S.E., McCarty, J.M., Kerlakian, C.B., Glasser, S.W. and Whitsett, J.A. Respiratory epithelial cell expression of human transforming growth factor-alpha induces lung fibrosis in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 93:1691-1699, 1994.
- Kovacs, E.J. and Kelley, J. Intra-alveolar release of a competence-type growth factor after lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:68-72, 1986.
- Körner, T., Kropf, J. and Gressner, A.M. Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: Markers of progression with high prognostic value. *J. Hepatol.* 25:684-688, 1996.
- Krishna, M.C., DeGraff, W., Tamura, S., Gonzalez, F.J., Samuni, A., Russo, A. and Mitchell, J.B. Mechanisms of Hypoxic and Aerobic Cytotoxicity of Mitomycin C in Chinese Hamster V79 Cells. *Cancer Res.* 51:6622-6628, 1991.
- Krombach, F., Gerlach, J.T., Padovan, C., Burges, A., Behr, J., Beinert, T. and Vogelmeier, C. Characterization and quantification of alveolar monocyte like cells in human chronic inflammatory lung disease. *Eur. Respir. J.* 9:984-991, 1996.
- Kubota, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R. and Lawley, T.J. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell. Biol.* 107:1589-1598, 1988.

- Kurbacher, C.M. and Mallmann, P.K. Chemoprotection in anticancer therapy: The emerging role of amifostine (WR-2721). *Anticancer Res.* 18:2203-2210, 1998.
- Kurdowska, A., Carr, F.K., Stevens, M.D., Baughman, R.P. and Martin, T.R. Studies on the interaction of IL-8 with human plasma 2-macroglobulin - Evidence for the presence of IL-8 complexed to 2-macroglobulin in lung fluids of patients with adult respiratory distress syndrome. *J. Immunol.* 158:1930-1940, 1997.
- Kuroki, M., Voest, E.E., Amano, S., Beerepoot, L.V., Takashima, S., Tolentino, M., Kim, R.Y., Rohan, R.M., Colby, K.A., Yeo, K.T. and Adamis, A.P. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 98:1667-1675, 1996.
- Kylstra, A.J., Rausch, D.C., Hall, K.D. and Spock, A. Lung lavage in cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 103:651-662, 1971.
- Lamoreaux, W.J., Fitzgerald, M.E.C., Reiner, A., Hasty, K.A. and Charles, S.T. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase a and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc. Res.* 55:29-42, 1998.
- Lange, A., Garncarek, D., Tomeczko, J., Ciechanowski, G. and Bisikiewicz, R. Outcome of asbestos exposure (lung fibrosis and antinuclear antibodies) with respect to skin reactivity: an 8-year longitudinal study. *Environ Res.* 47:1-13, 1986.
- Lanks, K.W. Modulators of the eukaryotic heat shock response. *Exp. Cell Res.* 165:1-10, 1986.
- Lassen, U., Osterlind, K., Hansen, M., Dombernowsky, P., Bergman, B. and Hansen, H.H. Long-term survival in small-cell lung cancer: Posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years--An analysis of 1,714 consecutive patients. *J. Clin. Oncol.* 13:1215-1220, 1995.
- Last, J.A., Gerriets, J.E., Armstrong, L.C., Gelzleichter, T.R. and Reiser, K.M. Hydroxylation of collagen by lungs of rats administered bleomycin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2:543-548, 1990.

- Last, J.A., King, T.E.J., Nerlich, A.G. and Reiser, K.M. Collagen cross-linking in adult patients with acute and chronic fibrotic lung disease. Molecular markers for fibrotic collagen. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:307-313, 1990.
- Law, M.R., Morris, J.K., Watt, H.C. and Wald, N.J. The dose-response relationship between cigarette consumption, biochemical markers and risk of lung cancer. *Br. J. Cancer* 75:1690-1693, 1997.
- Le Querrec, A., Duval, D. and Tobelem, G. Tumour angiogenesis. *Bailliere Clin Haem.* 6:711-730, 1993.
- Lee, P. Lung cancer and passive smoking (continued). *Br. J. Cancer* 64:200-201, 1991.
- Legastelois, I., Cottin, V., Mornex, J.F. and Cordier, G. Alveolar macrophages from sheep naturally infected by visna-maedi virus contribute to IL-8 production in the lung. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59:131-139, 1997.
- Lehne, G. and Lote, K. Pulmonary toxicity of cytotoxic and immunosuppressive agents. A review. *Acta Oncol.* 29:113-124, 1990.
- Leigh, J., Wang, H., Bonin, A., Peters, M. and Ruan, X.Y. Silica-induced apoptosis in alveolar and granulomatous cells in vivo. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl. 5:1241-1245, 1997.
- Lelli, J.L., Jr., Becks, L.L., Dabrowska, M.I. and Hinshaw, D.B. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 25:694-702, 1998.
- Lemaire, I., Dubois, C., Grondin, C. and Gingras, D. Immunoregulation of lung fibroblast growth: alteration in asbestos-induced pulmonary fibrosis. *Clin. Exp. Immunol* 66:201-208, 1986.
- Lingos, T.I., Recht, A., Vicini, F., Abner, A., Silver, B. and Harris, J.R. Radiation pneumonitis in breast cancer patients treated with conservative surgery and radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 21:355-360, 1991.
- Links, M. and Lewis, C. Chemoprotectants - A review of their clinical pharmacology and

therapeutic efficacy. *Drugs* 57:293-308, 1999.

Locopio, N., Fanelli, M. and Gasparini, G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 52:159-173, 1998.

Low, R.B., Adler, K.B., Woodcock Mitchell, J., Giancola, M.S. and Vacek, P.M. Bronchoalveolar lavage lipids during development of bleomycin-induced fibrosis in rats. Relationship to altered epithelial cell morphology. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:709-713, 1988.

Maasilta, P., Salonen, E.M., Vaeheri, A., Kivisaari, L., Holsti, L.R. and Mattson, K. Procollagen-III in serum, plasminogen activation and fibronectin in bronchoalveolar lavage fluid during and following irradiation of human lung. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20:973-980, 1991.

Maasilta, P., Hallman, M., Taskinen, E., Kivisaari, L. and Mattson, K. Bronchoalveolar lavage fluid findings following radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 26:117-123, 1993.

Madtes, D.K., Busby, H.K., Strandjord, T.P. and Clark, J.G. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 11:540-551, 1994.

Maier, K., Leuschel, L. and Costabel, U. Increased levels of oxidized methionine residues in bronchoalveolar lavage fluid proteins from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:271-274, 1991.

Malavaud, B., Tack, I., Jonca, F., Pradde, F., Moro, F., Ader, J.L. and Plouët, J. Activation of Flk-1/KDR mediates angiogenesis but not hypotension. *Cardiovasc. Res.* 36:276-281, 1997.

Malik, S.W., Myers, J.L., DeRemee, R.A. and Specks, U. Lung toxicity associated with cyclophosphamide use - Two distinct patterns. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 154:1851-1856, 1996.

Maly, E.R. Generation of free oxygen radicals from human polymorphonuclear granulocytes by cytokines from human mononuclear cells, treated with quartz dust DQ12 or coal mine dust

TF-1--new aspects in pathogenesis of pneumoconiosis. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. B.* 187:142-165, 1988.

Mandriota, S.J. and Pepper, M.S. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J. Cell Sci.* 110:2293-2302, 1997.

Manegold, C. and Latz, D. Concurrent radiochemotherapy with ifosfamide in locally advanced unresectable non-small-cell lung cancer. *Onkologie* 21 *Suppl.* 2:15-18, 1998.

Mannino, D.M., Ford, E., Giovino, G.A. and Thun, M. Lung cancer deaths in the United States from 1979 to 1992: an analysis using multiple-cause mortality data. *Int. J. Epidemiol.* 27:159-166, 1998.

Mark, G.J., Lehimgar-Zadeh, A. and Ragsdale, B.D. Cyclophosphamide pneumonitis. *Thorax* 33:89, 1978.

Marks, L.B., Munley, M.T., Bentel, G.C., Zhou, S.M., Hollis, D., Scarfone, C., Sibley, G.S., Kong, F.M., Jirtle, R., Jaszczak, R., Coleman, R.E., Tapson, V. and Anscher, M. Physical and biological predictors of changes in whole-lung function following thoracic irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 39:563-570, 1997.

Martiny-Baron, G. and Marmé, D. VEGF-mediated tumour angiogenesis - A new target for cancer therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:675-680, 1995.

Matalon, S., Harper, W.V., Nickerson, P.A. and Olszowka, J. Intravenous bleomycin does not alter the toxic effects of hyperoxia in rabbits. *Anesthesiology* 64:614-619, 1986.

Matalon, S., Holm, B.A. and Notter, R.H. Mitigation of pulmonary hyperoxic injury by administration of exogenous surfactant. *J. Appl. Physiol.* 62:756-761, 1987.

Matheson, N.R., Wong, P.S., Schuyler, M. and Travis, J. Interaction of human alpha-1-proteinase inhibitor with neutrophil myeloperoxidase. *Biochemistry* 20:331-336, 1981.

- Matthay, M.A., Geiser, T., Matalon, S. and Ischiropoulos, H. Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit.Care Med.* 27:2028-2030, 1999.
- Mattson, K., Holsti, L.R., Poppius, H., Korhola, O., Stenman, S., Tammilehto, L. and Salmo, M. Radiation pneumonitis and fibrosis following split-course radiation therapy for lung cancer. A radiologic and physiologic study. *Acta Oncol.* 26:193-196, 1987.
- Matuschak, G.M., Munoz, C.F., Johanns, C.A., Rahman, R. and Lechner, A.J. Upregulation of postbacteremic TNF- α and IL-1 β gene expression by alveolar hypoxia/reoxygenation in perfused rat lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:629-637, 1998.
- McDonald, S., Rubin, P., Phillips, T.L. and Marks, L.B. Injury to the lung from cancer therapy: clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31:1187-1203, 1995.
- Meier, B., Radeke, H.H., Selle, S., Younes, M., Seis, H., Resch, K. and Habermehl, G.G. Human fibroblasts release active oxygen species in response to interleukin-1 and tumour necrosis factor. *Biochem. J.* 263:539-545, 1989.
- Miller, E.J., Cohen, A.B. and Peterson, B.T. Peptide inhibitor of interleukin-8 (IL-8) reduces staphylococcal enterotoxin-A (SEA) induced neutrophil trafficking to the lung. *Inflamm. Res.* 45:393-397, 1996.
- Millward, M.J., Zalberg, J., Bishop, J.F., Webster, L.K., Zimet, A., Rischin, D., Toner, G.C., Laird, J., Cosolo, W., Urch, M., Bruno, R., Loret, C., James, R. and Blanc, C. Phase I trial of docetaxel and cisplatin in previously untreated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 15:750-758, 1997.
- Mirimanoff, R.O. Concurrent chemotherapy (CT) and radiotherapy (RT) in locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a review. *Lung Cancer* 11 *Suppl* 3:S79-S99, 1994.
- Mizzen, L.A., Chang, C., Garrels, J.I. and Welch, W.J. Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein. *J. Biol. Chem.* 264:20664-20675, 1989.

- Monson, J.M., Stark, P., Reilly, J.J., Sugarbaker, D.J., Strauss, G.M., Swanson, S.J., Decamp, M.M., Mentzer, S.J. and Baldini, E.H. Clinical radiation pneumonitis and radiographic changes after thoracic radiation therapy for lung carcinoma. *Cancer* 82:842-850, 1998.
- Moores, H.K., Beehler, C.J., Hanley, M.E., Shanley, P.F., Stevens, E.E., Repine, J.E. and Terada, L.S. Xanthine oxidase promotes neutrophil sequestration but not injury in hyperoxic lungs. *J. Appl. Physiol.* 76:941-945, 1994.
- Morgan, G.W. and Breit, S.N. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31:361-369, 1995.
- Mornex, F., Trillet, V., Chauvin, F., Ardiet, J.M., Schmitt, T., Romestaing, P., Carrie, C., Mahe, M., Mornex, J.F., Fournel, P. and et al, Hyperfractionated radiotherapy alternating with multidrug chemotherapy in the treatment of limited small cell lung cancer (SCLC). Groupe Lyonnais d'Oncologie Thoracique. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19:23-30, 1990.
- Mulligan, M.S., Jones, M.L., Bolanowski, M.A., Baganoff, M.P., Deppeler, C.L., Meyers, D.M., Ryan, U.S. and Ward, P.A. Inhibition of lung inflammatory reactions in rats by an anti-human IL-8 antibody. *J. Immunol.* 150:5585-5595, 1993.
- Munro, A.J. What now for postoperative radiotherapy for lung cancer. *Lancet* 352:250-251, 1998.
- Mustafa, M.G. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic. Biol. Med* 9:245-265, 1990.
- Mutsaers, S.E., Harrison, N.K., McAnulty, R.J., Liao, J.Y.W., Laurent, G.J. and Musk, A.W. Fibroblast mitogens in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from asbestos-exposed subjects with and without clinical evidence of asbestosis: No evidence for the role of PDGF, TNF-", IGF-1, or IL-1. *J. Pathol.* 185:199-203, 1998.
- Myrvik, Q.N., Leake, E.S. and Farris, B. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to procure them in a high state of purity. *J. Immunol.* 86:128-132, 1961.
- Nader-Djalal, N., Knight, P.R.,III, Thusu, K., Davidson, B.A., Holm, B.A., Johnson, K.J. and Dandona, P. Reactive oxygen species contribute to oxygen-related lung injury after acid aspiration. *Anesth. Analg.* 87:127-133, 1998.

- Nagata, K. Expression and function of heat shock protein 47: A collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol.* 16:379-386, 1998.
- Nakayama, Y., Makino, S., Fukuda, Y., Min, K.Y., Shimizu, A. and Ohsawa, N. Activation of lavage lymphocytes in lung injuries caused by radiotherapy for lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34:459-467, 1996.
- Nazeyrollas, P., Prévost, A., Baccard, N., Manot, L., Devillier, P. and Millart, H. Effects of amifostine on perfused isolated rat heart and on acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43:227-232, 1998.
- Negri, E., La Vecchia, C., Franceschi, S. and Levi, F. Patterns of mortality from major cancers in Europe. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 3:531-536, 1994.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB. J.* 13:9-22, 1999.
- Niedermeier, J., C. Bokemeyer and H. Fabel. Pulmonale Toxizität. In: *Kompendium Internistische Onkologie, Teil 1: Grundlagen, Richtlinien, Antineoplastische Substanzen, Toxizitäten, prophylaktische und supportive Therapie, Adressen.* (Herausgeber: H.J. Schmoll, K. Höffken, K. Possinger). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 2. Auflage, 960, 1996.
- Nici, L., Medina, M. and Frackelton, A.R. The epidermal growth factor receptor network in type 2 pneumocytes exposed to hyperoxia in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 270:L242-L250, 1996.
- Nici, L., Santos-Moore, A., Kuhn, C. and Calabresi, P. Modulation of bleomycin-induced pulmonary toxicity in the hamster by the antioxidant amifostine. *Cancer* 83:2008-2014, 1998.
- Nishizawa, J., Nakai, A., Matsuda, K., Komeda, M., Ban, T. and Nagata, K. Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. *Circulation* 99:934-941, 1999.

- Nowak, D., Ruta, U. and Piasecka, G. Nicotine increases human polymorphonuclear leukocytes chemotactic response--a possible additional mechanism of lung injury in cigarette smokers. *Exp. Pathol.* 39:37-43, 1990.
- Nör, J.E., Christensen, J., Mooney, D.J. and Polverini, P.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am. J. Pathol.* 154:375-384, 1999.
- Nyberg, F. and Pershagen, G. Passive smoking and lung cancer - Accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *Br. Med. J.* 317:347-348, 1998.
- O'Brien-Ladner, A., Nelson, M.E., Kimler, B.F. and Wesselius, L.J. Release of interleukin-1 by human alveolar macrophages after in vitro irradiation. *Radiat. Res.* 136:37-41, 1993.
- O'Reilly, M.A., Staversky, R.J., Flanders, K.C., Johnston, C.J. and Finkelstein, J.N. Temporal changes in expression of TGF- β isoforms in mouse lung exposed to oxygen. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 272:L60-L67, 1997.
- Oh, S.J., Jeltsch, M.M., Birkenhäger, R., McCarthy, J.E.G., Weich, H.A., Christ, B., Alitalo, K. and Wilting, J. VEGF and VEGF-C: Specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.* 188:96-109, 1997.
- Okrent, D.G., Lichtenstein, A.K. and Ganz, T. Direct cytotoxicity of polymorphonuclear leukocyte granule proteins to human lung-derived cells and endothelial cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:179-185, 1990.
- Oku, T., Tjuvajev, J.G., Miyagawa, T., Sasajima, T., Joshi, A., Joshi, R., Finn, R., Claffey, K.P. and Blasberg, R.G. Tumor growth modulation by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene expression: Effects on angiogenesis, vascular permeability, blood volume, blood flow, fluorodeoxyglucose uptake, and proliferation of human melanoma intracerebral xenografts. *Cancer Res.* 58:4185-4192, 1998.
- Osterlind, K., Hansen, H.H., Hansen, M. and Dombernowsky, P. Mortality and morbidity in long-term surviving patients treated with chemotherapy with or without irradiation for small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 4:1044-1052, 1986.

Ouellette, D., Desbiens, G., Emond, C. and Beauchamp, G. Lung cancer in women compared with men: Stage, treatment, and survival. *Ann.Thorac. Surg.* 66:1140-1143, 1998.

Pablos, M.I., Reiter, R.J., Chuang, J.I., Ortiz, G.G., Guerrero, J.M., Sewerynek, E., Agapito, M.T., Melchiorri, D., Lawrence, R. and Deneke, S.M. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. *J. Appl. Physiol.* 83:354-358, 1997.

Padovan, C.S., Behr, J., Allmeling, A.M., Gerlach, J.T., Vogelmeier, C. and Krombach, F.P. Immunophenotyping of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid. Comparison of flow cytometric and immunocytochemical techniques. *J. Immunol. Methods* 147:27-32, 1992.

Paesmans, M., Sculier, J.P., Libert, P., Bureau, G., Dabouis, G., Thiriaux, J., Michel, J., Van Cutsem, O., Sergysels, R., Mommen, P. and et al, Prognostic factors for survival in advanced non-small-cell lung cancer: univariate and multivariate analyses including recursive partitioning and amalgamation algorithms in 1,052 patients. The European Lung Cancer Working Party. *J. Clin. Oncol.* 13:1221-1230, 1995.

Papac, R.J., Son, Y., Bien, R., Tiedemann, D., Keohane, M. and Yesner, R. Improved local control of thoracic disease in small cell lung cancer with higher dose thoracic irradiation and cyclic chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13:993-998, 1987.

Parola, M., Pinzani, M., Casini, A., Albano, E., Poli, G., Gentilini, A. and Dianzani, M.U. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha (I) gene expression and synthesis in human liver fat storing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:1044-1050, 1993.

Patchen, M.L. Amifostine plus granulocyte colony-stimulating factor therapy enhances recovery from supralethal radiation exposures: Preclinical experience in animal models. *Eur.J.Cancer [A] 31A Suppl.* 1:S17-S21, 1995.

Patel, J.M. and Block, E.R. Cyclophosphamide-Induced Depression of the Antioxidant Defense Mechanisms of the Lung. *Exp. Lung Res.* 8:153-165, 1985.

Pectasides, D., Asproptomitis, A., Halikia, A., Visvikis, A., Antoniou, F., Kalantaridou, A.,

Karvounis, N., Batzios, S. and Athanassiou, A. Combination chemotherapy with carboplatin, docetaxel, and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: A phase II study. *J.Clin.Oncol.* 17:3816-3821, 1999.

Peterhans, E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* 56:107-116, 1997.

Peters, G.J. and Van der Vijgh, W.J.F. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (WR-2721): Preclinical aspects. *Eur. J. Cancer [A] 31A Suppl. 1:S1-S7*, 1995.

Peters, L.J. Radiation therapy tolerance limits - For one or for all? Janeway lecture. *Cancer* 77:2379-2385, 1996.

Phelps, D.T., Ferro, T.J., Higgins, P.J., Shankar, R., Parker, D.M. and Johnson, A. TNF- α induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endothelial glutathione via protein kinase C. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 269:L551-L559, 1995.

Pierelli, L., Scambia, G., Fattorossi, A., Bonanno, G., Battaglia, A., Perillo, A., Menichella, G., Panici, P.B., Leone, G. and Mancuso, S. In vitro effect of amifostine on haematopoietic progenitors exposed to carboplatin and non-alkylating antineoplastic drugs: haematoprotection acts as a drug-specific progenitor rescue. *Br. J. Cancer* 78:1024-1029, 1998.

Piguet, P.F., Kaufman, S., Barazzone, C., Muller, M., Ryffel, B. and Eugster, H.P. Resistance of TNF/LT alpha double deficient mice to bleomycin-induced fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 78:43-48, 1997.

Pison, U., Max, M., Neuendank, A., Weissbach, S. and Pietschmann, S. Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *Eur. J. Clin. Invest.* 24:586-599, 1994.

Poli, G. and Parola, M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 22:287-305, 1997.

- Polla, B.S., Kantengwa, S., Gleich, G.J., Kondo, M., Reimert, C.M. and Junod, A.F. Spontaneous heat shock protein synthesis by alveolar macrophages in interstitial lung disease associated with phagocytosis of eosinophils. *Eu.r Respir. J.* 6:483-488, 1993.
- Porembka, D.T., Kier, A., Sehlhorst, S., Boyce, S., Orlowski, J.P. and Davis, K.J. The pathophysiologic changes following bile aspiration in a porcine lung model. *Chest* 104:919-924, 1993.
- Preville, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M.V. and Arrigo, A.P. Mammalian Small Stress Proteins Protect against Oxidative Stress through Their Ability to Increase Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity and by Maintaining Optimal Cellular Detoxifying Machinery. *Exp. Cell Res.* 247:61-78, 1999.
- Pryor, W.A., Bermúdez, E., Cueto, R. and Squadrito, G.L. Detection of aldehydes in bronchoalveolar lavage of rats exposed to ozone. *Fund. Appl. Tox.* 34:148-156, 1996.
- Rahman, I. and MacNee, W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic. Biol. Med.* 21:669-681, 1996.
- Rahman, I. and MacNee, W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 277:L1067-L1088, 1999.
- Rahman, Q., Abidi, P., Afaq, F., Schiffmn, D., Mossman, B.T., Kamp, D.W. and Athar, M. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit.Rev.Toxicol.* 29:543-568, 1999.
- Rannels, D.E. and Rannels, S.R. Influence of the extracellular matrix on type 2 cell differentiation. *Chest* 96:165-173, 1989.
- Rawlinson, J. and Ackery, D. Ventilation/perfusion mismatch in interstitial fibrosis. *Clin. Nucl. Med* 13:878-879, 1988.
- Reddy, V.Y., Pizzo, S and Weiss, S.J. Functional inactivation and structural disruption of human alpha 2-macroglobulin by neutrophils and eosinophils. *J. Biol. Chem.* 264:13801-13809, 1989.

- Reif, A.E. and Heeren, T. Consensus on synergism between cigarette smoke and other environmental carcinogens in the causation of lung cancer. *Adv. Cancer Res.* 76:161-186, 1999.
- Rennard, S.I. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of cancer. *Lung* 168 *Suppl*:1035-1040, 1990.
- Rennard, S.I. Bronchoalveolar lavage in the assessment of primary and metastatic lung cancer. *Respiration* 59 *Suppl* 1:41-43, 1992.
- Repetto, L., Granetto, C., Venturino, A., De Pas, M. and Giacone, G. Lung cancer. *Crit. Rev. Onc. Hematol.* 27:133-134, 1998.
- Reynolds, H.Y. and Newball, H.H. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.* 84:559-573, 1974.
- Reynolds, H.Y. Lung inflammation: normal host defense or a complication of some diseases? *Annu. Rev. Med.* 38:295-323, 1987.
- Rieth, A., Schuth, J. and Kudielka, R.A. Cytoprotection in chemo- and radiotherapy with amifostine (ethyol): A new strategy in oncology. *Onkologie* 19:315-320, 1996.
- Roach, M.,III, Gandara, D.R., Yuo, H.S., Swift, P.S., Kroll, S., Shrieve, D.C., Wara, W.M., Margolis, L. and Phillips, T.L. Radiation pneumonitis following combined modality therapy for lung cancer: Analysis of prognostic factors. *J. Clin. Oncol.* 13:2606-2612, 1995.
- Roberts, W.G. and Palade, G.E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* 108:2369-2379, 1995.
- Rochester, C.L. and Elias, J.A. Cytokines and cytokine networking in the pathogenesis of interstitial and fibrotic lung disorders. *Sem. Resp. Med.* 14:389-416, 1993.
- Rodell, T.C., Cheronis, J.C. and Repine, J.E. Endothelial cell xanthine oxidase-derived toxic oxygen metabolites contribute to acute lung injury from neutrophil elastase. *Chest* 93:146S,

1988.

- Rojanasakul, Y., Wang, L., Hoffman, A.H., Shi, X., Dalal, N.S., Banks, D.E. and Ma, J.K.
Mechanisms of hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overloading in alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8:377-383, 1993.
- Rosenkrans, W.A.J. and Penney, D.P. Cell-cell matrix interactions in induced lung injury. IV. Quantitative alterations in pulmonary fibronectin and laminin following X irradiation. *Radiat. Res* 109:127-142, 1987.
- Rosiello, R.A. and Merrill, W.W. Radiation-induced lung injury. *Clin. Chest Med.* 11:65-71, 1990.
- Rosiello, R.A., Merrill, W.W., Rockwell, S., Carter, D., Cooper, J.A.J., Care, S. and Amento, E.P. Radiation pneumonitis. Bronchoalveolar lavage assessment and modulation by a recombinant cytokine. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:1671-1676, 1993.
- Roum, J.H., Borok, Z., McElvaney, N.G., Grimes, G.J., Bokser, A.D., Buhl, R. and Crystal, R.G. Glutathione aerosol suppresses lung epithelial surface inflammatory cell-derived oxidants in cystic fibrosis. *J.Appl.Physiol.* 87:438-443, 1999.
- Rowen, J.L., Hyde, D.M. and McDonald, R.J. Eosinophils cause acute edematous injury in isolated perfused rat lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:215-220, 1990.
- Rubin, P., Finkelstein, J. and Shapiro, D. Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes: interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24:93-101, 1992.
- Rubin, P., Johnston, C.J., Williams, J.P., McDonald, S. and Finkelstein, J.N. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33:99-109, 1995.
- Sagone, A.L.J., Husney, R.M., Wewers, M.D., Herzyk, D.J. and Davis, W.B. Effect of dimethylthiourea on the neutrophil myeloperoxidase pathway. *J. Appl. Physiol.* 67:1056-1062, 1989.

- Saleh, D., Barnes, P.J. and Giaid, A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1763-1769, 1997.
- Salven, P., Ruotsalainen, T., Mattson, K. and Joensuu, H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 79:144-146, 1998.
- Salven, P., Perhoniemi, V., Tykkä, H., Mäenpää, H. and Joensuu, H. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 53:161-166, 1999.
- Saugstad, O.D. Chronic lung disease: The role of oxidative stress. *Biol. Neonate* 74 *Suppl.* 1:21-28, 1998.
- Sauter, C. Chemotherapy of advanced non-small-cell lung cancer: "Those who cannot remember the past are condemned to repeat it". *J.Clin.Oncol.* 17:734, 1999.
- Schiller, J.H. High-dose cisplatin and vinblastine plus amifostine for metastatic non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* 23 *Suppl.* 8:78-82, 1996.
- Schnabel, A., Richter, C., Bauerfeind, S. and Gross, W.L. Bronchoalveolar lavage cell profile in methotrexate induced pneumonitis. *Thorax* 52:377-379, 1997.
- Schönbohn, H., Schuler, M., Kolbe, K., Peschel, C., Huber, C., Bemb, W. and Aulitzky, W.E. Plasma levels of IL-1, TNF alpha, IL-6, IL-8, G-CSF, and IL1-RA during febrile neutropenia: Results of a prospective study in patients undergoing chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Ann. Hematol.* 71:161-168, 1995.
- Schuster, A., Hansen, G., Zubrod-Eichert, C. and Wahn, V. Effects of native and oxidation-resistant secretory leukoprotease inhibitor on cystic fibrosis sputum: Inhibition of neutrophil elastase activity and of sputum-induced secretion from porcine tracheal submucosal glands. *Pediatr. Res.* 40:732-737, 1996.
- Schweisfurth, H., Breuer, J. and Westerdick, M. *Bronchoalveoläre Lavage*, München-Deisenhofen:Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, 1. Auflage, 1990.

- Segawa, Y., Takigawa, N., Kataoka, M., Takata, I., Fujimoto, N. and Ueoka, H. Risk factors for development of radiation pneumonitis following radiation therapy with or without chemotherapy for lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 39:91-98, 1997.
- Senger, D.R., Brown, L.F., Claffey, K.P. and Dvorak, H.F. Vascular permeability factor, tumor angiogenesis and stroma generation. *Invasion Metastasis* 14:385-394, 1994.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S. and Dvorak, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219:983-985, 1983.
- Shahar, I., Fireman, E., Topilsky, M., Grief, J., Kivity, S., Spirer, Z. and Ben Efraim, S. Effect of IL-6 on alveolar fibroblast proliferation in interstitial lung diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 79:244-251, 1996.
- Shen, A.S., Haslett, C., Feldsien, D.C., Henson, P.M. and Cherniack, R.M. The intensity of chronic lung inflammation and fibrosis after bleomycin is directly related to the severity of acute injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:564-571, 1988.
- Shepherd, F.A. Chemotherapy for non-small cell lung cancer: Have we reached a new plateau. *Semin.Oncol.* 26 *Suppl.* 4:3-11, 1999.
- Shibuya, M. Role of VEGF-FLT receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 67:281-316, 1995.
- Sibille, Y., Lwebuga Mukasa, J.S., Polomski, L., Merrill, W.W., Ingbar, D.H. and Gee, J.B. An in vitro model for polymorphonuclear-leukocyte-induced injury to an extracellular matrix. Relative contribution of oxidants and elastase to fibronectin release from amnionic membranes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:134-140, 1986.
- Siemeister, G., Martiny-Baron, G. and Marmé, D. The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: Molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Rev.* 17:241-248, 1998.
- Simeonova, P.P. and Luster, M.I. Iron and reactive oxygen species in the asbestos-induced tumor

necrosis factor- α response from alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12:676-683, 1995.

Simeonova, P.P., Toriumi, W., Kommineni, C., Erkan, M., Munson, A.E., Rom, W.N. and Luster, M.I. Molecular regulation of IL-6 activation by asbestos in lung epithelial cells - Role of reactive oxygen species. *J. Immunol.* 159:3921-3928, 1997.

Simons, R.K., Junger, W.G., Loomis, W.H. and Hoyt, D.B. Acute lung injury in endotoxemic rats is associated with sustained circulating IL-6 levels and intrapulmonary CINC activity and neutrophil recruitment - Role of circulating TNF- α and IL-1. *Shock* 6:39-45, 1996.

Singer, I.I., Kawka, D.W., McNally, S.M., Eiermann, G.J., Metzger, J.M. and Peterson, L.B. Extensive laminin and basement membrane accumulation occurs at the onset of bleomycin-induced rodent pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 125:258-268, 1986.

Sinor, A.D., Irvin, S.M., Cobbs, C.S., Chen, J., Graham, S.H. and Greenberg, D.A. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in astroglial cultures. *Brain Res.* 812:289-291, 1998.

Slosman, D.O., Costabella, P.M., Roth, M., Werlen, G. and Polla, B.S. Bleomycin primes monocytes-macrophages for superoxide production. *Eur. Respir. J.* 3:772-778, 1990.

Smith, A.W., Green, J., Eden, C.E. and Watson, M.L. Nitric oxide-induced potentiation of the killing of *Burkholderia cepacia* by reactive oxygen species: implications for cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* 48:419-423, 1999.

Smith, R.E., Strieter, R.M., Zhang, K., Phan, S.H., Standiford, T.J., Lukacs, N.W. and Kunkel, S.L. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J. Leukocyte Biol.* 57:782-787, 1995.

Smith, R.E., Strieter, R.M., Phan, S.H., Lukacs, N. and Kunkel, S.L. TNF and IL-6 mediate MIP-1 α expression in bleomycin-induced lung injury. *J. Leukocyte Biol.* 64:528-536, 1998.

Souhami, R.L. Defining the role of chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 6:317-318, 1995.

- Soud, A.K., Newton, G.L., Dubowy, R.L., Fahey, R.C. and Bernstein, M.L. Determination of the cytoprotective agent WR-2721 (Amifostine, Ethyol(R)) and its metabolites in human blood using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42:400-406, 1998.
- Souquet, P.J., Chauvin, F., Boissel, J.P., Cellerino, R., Cormier, Y., Ganz, P.A., Kaasa, S., Pater, J.L., Quoi, E., Rapp, E. and et al, Polychemotherapy in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lancet* 342:19-21, 1993.
- Specks, U., Nerlich, A., Colby, T.V., Wiest, I. and Timpl, R. Increased expression of type VI collagen in lung fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1956-1964, 1995.
- Spencer, W.F., Linehan, W.M., Walther, M.M., Haas, G.P., Lotze, M.T., Topalian, S.L., Yang, J.C., Merino, M.J., Lange, J.R., Pockaj, B.A. and et al, Immunotherapy with interleukin-2 and alpha-interferon in patients with metastatic renal cell cancer with in situ primary cancers: a pilot study. *J. Urol.* 147:24-30, 1992.
- Spencer, C.M. and Faulds, D. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 48:794-847, 1994.
- Spencer, C.M. and Goa, K.L. Amifostine - A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as a radioprotector and cytotoxic chemoprotector. *Drugs* 50:1001-1031, 1995.
- Spickett, C.M., Smith, W.E., Reglinski, J., Wilson, R. and Walker, J.J. Oxidation of erythrocyte glutathione by monocytes stimulated with interleukin-6 - Analysis by 1H spin echo NMR. *Clin. Chim. Acta* 270:115-124, 1998.
- Stadtman, E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med* 9:315-325, 1990.
- Statistisches Bundesamt, Gesundheitswesen, Fachserie 12, Reihe 4. Todesursachen in Deutschland, Wiesbaden:Metzler Poeschel, 1997.
- Stief, T.W., Aab, A. and Heimburger, N. Oxidative inactivation of purified human

alpha-2-antiplasmin, antithrombin III, and C1-inhibitor. *Thromb. Res* 49:581-589, 1988.

Strausz, J., Muller Quernheim, J., Stepling, H., Borkowski, A. and Ferlinz, R.

Sauerstoffradikalproduktion alveolärer Entzündungszellen bei Sarkoidose und bei idiopathischer Lungenfibrose. *Pneumologie* 43:440-445, 1989.

Suntres, Z.E. and Shek, P.N. Incorporation of alpha-tocopherol in liposomes promotes the retention of liposome-encapsulated glutathione in the rat lung. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:23-28, 1994.

Suzuki, Y., Tanigaki, T., Heimer, D., Wang, W., Ross, W.G., Murphy, G.A., Sakai, A., Sussman, H.H., Vu, T.H. and Raffin, T.A. TGF-beta 1 causes increased endothelial ICAM-1 expression and lung injury. *J. Appl. Physiol.* 77:1281-1287, 1994.

Swaim, M.W. and Pizzo, S.V. Methionine sulfoxide and the oxidative regulation of plasma proteinase inhibitors. *J. Leukocyte Biol.* 43:365-379, 1988.

Szabo, S. and Sandor, Z. The diagnostic and prognostic value of tumor angiogenesis. *Eur. J. Surg.* 164 *Suppl.* 582:99-103, 1998.

Takizawa, H., Satoh, M., Okazaki, H., Matsuzaki, G., Suzuki, N., Ishii, A., Suko, M., Okudaira, H., Morita, Y. and Ito, K. Increased IL-6 and IL-8 in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from patients with sarcoidosis: Correlation with the clinical parameters. *Clin. Exp. Immunol.* 107:175-181, 1997.

Tannehill, S.P. and Mehta, M.P. Amifostine and radiation therapy: Past, present, and future. *Semin. Oncol.* 23 *Suppl.* 8:69-77, 1996.

Tannehill, S.P., Mehta, M.P., Larson, M., Storer, B., Pellet, J., Kinsella, T.J. and Schiller, J.H. Effect of amifostine on toxicities associated with sequential chemotherapy and radiation therapy for unresectable non-small-cell lung cancer: Results of a phase II trial. *J. Clin. Oncol.* 15:2850-2857, 1997.

Tatla, S., Woodhead, V., Foreman, J.C. and Chain, B.M. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. *Free Radic. Biol. Med.* 26:14-24, 1999.

- Taylor, C.W., Wang, L.M., List, A.F., Fernandes, D., Paine-Murrieta, G.D., Johnson, C.S. and Capizzi, R.L. Amifostine protects normal tissues from paclitaxel toxicity while cytotoxicity against tumour cells is maintained. *Eur. J. Cancer [A]* 33A:1693-1698, 1997.
- Thatcher, N., Hopwood, P. and Anderson, H. Improving quality of life in patients with non-small cell lung cancer: Research experience with gemcitabine. *Eur. J. Cancer [A]* 33A *Suppl.* 1:S8-S13, 1997.
- Thrall, R.S., Barton, R.W., D'Amato, D.A. and Sulavik, S.B. Differential Cellular Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid Obtained at Various Stages during the Development of Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in the Rat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:488-492, 1982.
- Tsutsumi, M., Takase, S., Urashima, S., Ueshima, Y., Kawahara, H. and Takada, A. Serum markers for hepatic fibrosis in alcoholic liver disease: Which is the best marker, type III procollagen, type IV collagen, laminin, tissue inhibitor of metalloproteinase, or prolyl hydroxylase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20:1512-1517, 1996.
- Tucker, A.S., Newman, A.J. and Alvorado, C. Pulmonary pleural and thoracic changes complicating chemotherapy. *Radiology* 125:805, 1977.
- Turrisi, A.T., Glover, D.J. and Mason, B.A. A preliminary report: concurrent twice-daily radiotherapy plus platinum-etoposide chemotherapy for limited small cell lung cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 15:183-187, 1988.
- Turrisi, A.T., III, Kim, K., Blum, R., Sause, W.T., Livingston, R.B., Komaki, R., Wagner, H., Aisner, S. and Johnson, D.H. Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell lung cancer treated concurrently with cisplatin and etoposide. *N.Engl.J.Med.* 340:265-271, 1999.
- Van Poppel, G., de Vogel, N., van Balderen, P.J. and Kok, F.J. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. *Carcinogenesis* 13:303-305, 1992.
- Van Zandwijk, N. N-acetylcysteine (NAG) and glutathione (GSH): Antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. *J. Cell. Biochem.* 58 *Suppl.* 22:24-32,

1995.

- Vanhée, D., Gosset, P., Marquette, C.H., Wallaert, B., Lafitte, J.J., Gosselin, B., Voisin, C. and Tonnel, A.B. Secretion and mRNA expression of TNF α and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:298-306, 1995.
- Vergara, J.A., Raymond-U, and Thet, L.A. Changes in lung morphology and cell number in radiation pneumonitis and fibrosis: a quantitative ultrastructural study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13:723-732, 1987.
- Verhasselt, V., Goldman, M. and Willems, F. Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF- α synthesis by human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28:3886-3890, 1998.
- Vernon, R.B. and Sage, E.H. A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices. *Microvasc. Res.* 57:118-133, 1999.
- Vignola, A.M., Chanez, P., Polla, B.S., Vic, P., Godard, P. and Bousquet, J. Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13:683-691, 1995.
- Vokes, E.E., Mauer, A.M., Hoffman, P.C. and Haraf, D.J. Combined modality therapy in non-small cell lung and esophageal cancer: A phase I dose-escalation study of docetaxel with concurrent radiotherapy. *Semin.Oncol.* 25 *Suppl.* 8:28-32, 1998.
- Vogelmeier, C., Krombach, F., Munzing, S., Konig, G., Mazur, G., Beinert, T. and Fruhmann, G. Activation of blood neutrophils in acute episodes of farmer's lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:396-400, 1993.
- Volm, M., Koomägi, R. and Mattern, J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 74:64-68, 1997.
- Walsh, J., Absher, M. and Kelley, J. Variable expression of platelet-derived growth factor family proteins in acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9:637-644, 1993.

- Wang, J.H., Redmond, H.P., Watson, R.W.G. and Bouchier-Hayes, D. Induction of human endothelial cell apoptosis requires both heat shock and oxidative stress responses. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 272:C1543-C1551, 1997.
- Ward, H.E., Nicholson, A. and Berend, N. Failure of systemic N-acetyl cysteine to protect the rat lung against bleomycin toxicity. *Pathology* 19:358-360, 1987.
- Ward, H.E., Kemsley, L., Davies, L., Holecek, M. and Berend, N. The Pulmonary Response to Sublethal Thoracic Irradiation in the Rat. *Radiat. Res.* 136:15-21, 1993.
- Ward, P.A., Warren, J.S. and Johnson, K.J. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Radic. Biol. Med* 5:403-408, 1988.
- Warren, J.S., Kunkel, S.L., Cunningham, T.W., Johnson, K.J. and Ward, P.A. Macrophage-derived cytokines amplify immune complex-triggered O₂⁻ responses by rat alveolar macrophages. *Am. J. Pathol.* 130:489-495, 1988.
- Wasil, M., Halliwell, B., Hutchinson, D.C. and BAum, H. The antioxidant action of human extracellular fluids. Effect of human serum and its protein components on the inactivation of alpha 1-antiproteinase by hypochlorous acid and by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 243:219-223, 1987.
- Weiland, J.E., Dorinsky, P.M., Davis, W.B., Lucas, J.G. and Gadek, J.E. Validity of bronchoalveolar lavage in acute lung injury: recovered cells accurately reflect changes in the lung parenchyma. *Pathology* 21:59-62, 1989.
- Weiss, S.J., Peppin, G., Ortiz, X., Ragsdale, C. and Test, S.T. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 227:747-749, 1985.
- Weiss, S.S. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320:365-376, 1989.
- Wewers, M.D. and Herzyk, D.J. Alveolar macrophages differ from blood monocytes in human IL-1beta release. Quantitation by enzyme-linked immunoassay. *J. Immunol.* 143:1635-1641, 1989.

- White, C.W., Mimmack, R.F. and Repine, J.E. Accumulation of lung tissue oxidized glutathione (GSSG) as a marker of oxidant induced lung injury. *Chest* 89:111S-113S, 1986.
- White, D.A., Kris, M.G. and Stover, D.E. Bronchoalveolar lavage cell populations in bleomycin lung toxicity. *Thorax* 42:551-552, 1987.
- White, D.A., Rankin, J.A., Stover, D.E., Gellene, R.A. and Gupta, S. Methotrexate pneumonitis. Bronchoalveolar lavage findings suggest an immunologic disorder. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:18-21, 1989.
- Wilborn, A.M., Evers, L.B. and Canada, A.T. Oxygen toxicity to the developing lung of the mouse: Role of reactive oxygen species. *Pediatr. Res.* 40:225-232, 1996.
- Willsher, P.C., Xing, P.X., Clarke, C.P., Ho, D.W. and McKenzie, I.F. Mucin 1 antigens in the serum and bronchial lavage fluid of patients with lung cancer. *Cancer* 72:2936-2942, 1993.
- Wingo, P.A., Ries, L.A.G., Giovino, G.A., Miller, D.S., Rosenberg, H.M., Shopland, D.R., Thun, M.J. and Edwards, B.K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:675-690, 1999.
- Wozniak, A.J. Chemotherapy of advanced non-small-cell lung cancer: "Those who cannot remember the past are condemned to repeat it" - Reply 1. *J.Clin.Oncol.* 17:734-735, 1999.
- Wong, H.R. and Wispé, J.R. The stress response and the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 273:L1-L9, 1997.
- Wong, H.R., Menendez, I.Y., Ryan, M.A., Denenberg, A.G. and Wispé, J.R. Increased expression of heat shock protein 70 protects A549 cells against hyperoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 275:L836-L841, 1998.
- Woodcock Mitchell, J.L., Burkhardt, A.L., Mitchell, J.J., Rannels, S.R., Rannels, D.E., Chiu, J.F. and Low, R.B. Keratin species in type II pneumocytes in culture and during lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:566-571, 1986.

- Worthen, G.S., Haslett, C., Rees, A.J., Gumbay, R.S., Henson, J.E. and Henson, P.M. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:19-28, 1987.
- Yamada, M., Kudoh, S., Hirata, K., Nakajima, T. and Yoshikawa, J. Risk factors of pneumonitis following chemoradiotherapy for lung cancer. *Eur. J. Cancer [A]* 34:71-75, 1998.
- Yamamoto, T., Kajikawa, O., Martin, T.R., Sharar, S.R., Harlan, J.M. and Winn, R.K. The role of leukocyte emigration and IL-8 on the development of lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *J. Immunol.* 161:5704-5709, 1998.
- Yang, W. and De Bono, D.P. A new role for vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factors: increasing endothelial resistance to oxidative stress. *FEBS Lett.* 403:139-142, 1997.
- Yonemaru, M., Stephens, K.E., Ishizaka, A., Zheng, H., Hogue, R.S., Crowley, J.J., Hatherill, J.R. and Raffin, T.A. Effects of tumor necrosis factor on PMN chemotaxis, chemiluminescence, and elastase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 114:674-681, 1989.
- Yu, Y. and Yang, G. Growth factor gene expression in bronchoalveolar lavage cells from patients with lung fibrosis. *Chin. Med. Sci. J* 8:172-176, 1993.
- Zambello, R., Trentin, L., Enthammer, C., Cipriani, A., Agostini, C. and Semenzato, G. Lysis of pulmonary fibroblasts by lymphokine (IL-2)-activated killer cells - A mechanism affecting the human lung microenvironment. *Clin. Exp. Immunol.* 105:383-388, 1996.
- Zeiss, C.R., Leach, C.L., Smith, L.J., Levitz, D., Hatoum, N.S., Garvin, P.J. and Patterson, R. A serial immunologic and histopathologic study of lung injury induced by trimellitic anhydride. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:191-196, 1988.
- Zweier, J.L., Duke, S.S., Kuppusamy, P., Sylvester, J.T. and Gabrielson, E.W. Electron paramagnetic resonance evidence that cellular oxygen toxicity is caused by the generation of superoxide and hydroxyl free radicals. *FEBS Lett.* 252:12-16, 1989.

Zwick, H., Popp, W., Braun, O., Wanke, T. and Wagner, C. Personal spore sampling and indirect immunofluorescent test for exploration of hypersensitivity pneumonitis due to mould spores. *Allergy* 46:277-283, 1991.

12 Danksagung

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit kann nur bedingt die Leistung eines Einzelnen sein, stets setzt sie eine entsprechende Arbeitsgruppe und Logistik voraus.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. med. K. Possinger, Direktor der Klinik m.S. Hämatologie und Onkologie, der mir den Aufbau des Schwerpunkts "Bronchialkarzinom" am Zentrum ermöglichte. Herr Prof. Possinger hat es verstanden, in seiner Klinik ein intellektuelles Klima zu schaffen, das von der Hinwendung zu dem Patienten wesentlich getragen ist. In diesem Sinne konnte diese Arbeit entstehen, die versucht, wissenschaftlich Grundlagen für die unmittelbare Anwendung im klinischen Alltag bereitzustellen und damit zu einem möglichen Nutzen für unsere Patienten beizutragen.

Erst durch die großzügige Förderung und Unterstützung, die mir Herr Prof. Possinger stets angedeihen ließ, wurde die Entwicklung und Umsetzung der vorliegenden Arbeit ermöglicht.

Die vorliegenden Ergebnisse sind das Resultat einer außerordentlich fruchtbaren Kooperation mit Frau Dr. C. Oehm, Chefärztin der Abteilung für Onkologie und Pneumologie am Johanniterkrankenhaus in Treuenbrietzen. Sie hat sich der Fragestellung der pulmonalen Therapie-nebenwirkungen bei Patienten mit fortgeschrittenem Bronchialkarzinom im Besonderen verschrieben. Ihrem großen Engagement und stetem Einsatz ist es zu verdanken, daß diese ungewöhnlich große Zahl von Lavagen von Bronchialkarzinom-Patienten, die an ihrem Zentrum behandelt wurden, systematisch untersucht werden konnten.

Meine Mitarbeiterin im Forschungslabor der Abteilung, Frau C. Kahnt, hat durch ihre engagierte Arbeit und ihr experimentelles Können wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Für tätige und beratende Hilfestellung danke ich weiterhin Frau Dr. M. Ziemer, Oberärztin im Institut für Klinische Chemie am Zentrum.

Daneben gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. M. Fleischhacker, der zu allen methodischen und praktischen Fragen der angewandten Meßverfahren stets Rat wußte und zahlreiche Hilfestellungen und Anregungen gab.

Weiterhin danke ich sehr herzlich Frau G. Siebert, die als Mathematikerin im Institut für Biometrie am Zentrum die Auswertung der gewonnenen Daten begleitet hat.

13 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

daß gegen mich kein staatsanwaltliches Ermittlungsverfahren anhängig ist,

daß von mir weder früher noch jetzt gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

daß die vorliegende Habilitationsschrift von mir selbst ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt und die dargestellten Ergebnisse von mir selbst gewonnen wurden,

und daß die Zusammenarbeit mit anderen klinischen Partnern, Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Die geltende Habilitationsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 31. 5. 2000

(Dr. med. Thomas Beinert)