

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

**Detektion von strahleninduzierter Lungenfibrose im Mausmodell
mittels Dunkelfeld - Röntgenbildgebung**

Thomas Gora

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Weber

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jan J. Wilkens
2. Priv.-Doz. Dr Rickmer Braren

Die Dissertation wurde am 14.05.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.12.2020 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	3
2. GRUNDLAGEN	7
2.1 DIE LUNGE DES MENSCHEN.....	7
2.1.1 <i>Anatomie</i>	7
2.1.2 <i>Physiologie</i>	9
2.1.3 <i>Histologie</i>	10
2.2 DIE LUNGE DER MAUS	12
2.2.1 <i>Anatomie</i>	12
2.2.2 <i>Histologie</i>	14
2.3. DIE STRAHLENINDUZIERTER LUNGENFIBROSE.....	15
2.3.1 <i>Ätiologie</i>	16
2.3.2 <i>Prädisponierende Faktoren</i>	20
2.3.3 <i>Symptomatik</i>	22
2.3.4 <i>Diagnostik</i>	22
2.3.5 <i>Epidemiologie</i>	25
2.3.6 <i>Klassifikation</i>	25
2.3.7 <i>Differentialdiagnosen</i>	26
2.3.8 <i>Therapie</i>	27
2.4. BILDGEBUNGSPRINZIPIEN	28
2.4.1 <i>Phasenkontrastbildung</i>	28
2.4.2 <i>Skyscan 1190 Phasenkontrast MicroCT</i>	30
3. METHODEN	33
3.1 VERSUCHSPLANUNG UND DURCHFÜHRUNG.....	33
3.2 MÄUSE.....	33
3.3 BESTRAHLUNG	35
3.4 BILDGEBUNG	40
3.5 PROZESSIERUNG UND REKONSTRUKTION DER SKYSCAN CTs	42
3.6 AUSWERTUNG.....	43
3.6.1 <i>Qualitative Auswertung</i>	43
3.6.2 <i>quantitative Auswertung</i>	44
3.6.3 <i>Histologie</i>	45
4. ERGEBNISSE	47
4.1 QUALITATIVE AUSWERTUNG.....	47
4.2 QUANTITATIVE AUSWERTUNG	60
4.3 HISTOLOGIE.....	65
5. DISKUSSION	73
5.1 VERGLEICH MIT FACHLITERATUR	73
5.2 STUDIENERGEBNISSE.....	75
5.3 VERGLEICH BEIDER BILDGEBUNGSMODALITÄTEN.....	76
5.4 HISTOLOGIE.....	80
5.5 WEITERE ASPEKTE.....	82
6. GESAMTZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	85
7. LITERATURVERZEICHNIS	90
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	94
9. TABELLENVERZEICHNIS	94
ANHANG	97
DANKSAGUNG	98

1. Einleitung

Im Thoraxbereich können zahlreiche bösartige Tumore auftreten, die unterschiedliche epidemiologische Häufigkeiten aufzeigen. Lungenkrebs ist eine der häufigsten bösartigen Erkrankungen weltweit. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen ist Lungenkrebs die dritthäufigste Tumorerkrankung. Das Mammakarzinom ist bei Frauen als Krebsursache an erster Stelle. Speiseröhrenkrebs reiht sich bei Männern an dreizehnter und bei Frauen an sechzehnter Stelle ein. Auch andere thorakale Tumore wie Lymphome, Thymome und Mesotheliome treten häufig auf.

Die Strahlentherapie ist neben der Chemotherapie und der operativen Resektion eine der drei Säulen der Therapie bei bösartigen Karzinomen. Sie wird sowohl bei palliativer als auch bei kurativer Zielsetzung angewendet. Auch die vorbeugende Bestrahlung des Brustkorbs kann durchgeführt werden, um beispielsweise die Lebenszeit von Patienten mit kleinzelligem Bronchialzellkarzinom zu verlängern.

Abschätzungen aus Deutschland und den USA gehen davon aus, dass etwa die Hälfte aller Patienten mit bösartigen Tumoren im Laufe ihrer Erkrankung bestrahlt wird. Schätzungsweise 50-60% aller Fälle von Lungenkrebs erfordern zumindest eine einmalige Bestrahlung. Die Radiochemotherapie ist auch beim Speiseröhrenkrebs die aktuelle Standardbehandlung (Luo, Mao, Wang, Yu, & Li, 2018).

Hierbei ist das Ziel der kurativen Strahlentherapie die lokale und regionale Tumorkontrolle bei gleichzeitiger Vermeidung schwerer Nebenwirkungen. Die Wirksamkeit der Strahlentherapie ist jedoch durch die Strahlenresistenz der Tumorzellen und die Normalgewebstoxizität limitiert, sodass damit Komplikationen einhergehen können.

Auch die Bestrahlung der Lunge kann zu einigen akuten aber auch chronischen Komplikationen führen. Eine dieser chronischen Komplikationen ist die Fibrosierung des Gewebes im bestrahlten Gebiet, im Falle der Lunge also eine Lungenfibrose. Lungenfibrose ist eine häufig auftretende und schwere Nebenwirkung nach Bestrahlung von Tumoren im Thorax (z.B. Brust, Lunge, Ösophagus, Lymphome). Als bedeutende Komplikation nach Thoraxbestrahlungen ist sie wichtig für die Langzeit- Lebensqualität (Benveniste et al., 2013; Mattonen, Palma, Haasbeek, Senan, & Ward, 2013; Oh et al., 2012). Da sie zu einer schweren Ateminsuffizienz führen kann, ist die Lungenfibrose eine lebensbedrohliche Erkrankung. Allerdings gibt es auch heutzutage keine kausale Therapie, die Heilung verspricht. Wegen der hohen Mortalität der

strahleninduzierten Lungenfibrose gab es in den vergangenen Jahren große Bemühungen, an Behandlungs- und Diagnosemöglichkeiten zu forschen (Dadrach et al., 2016).

Veränderungen durch strahleninduzierte Lungenschäden können allerdings von Tumorrezidiven schwer zu unterscheiden sein. Erst nach neun Monaten können durch bestimmte Analysemethoden quantitative Veränderungen der Hounsfield-Einheiten festgestellt werden. 80-100% der bestrahlten Patienten zeigen in ihrer CT Diagnostik Veränderungen der Lungenstruktur auf. Daraus lässt sich schließen, dass späte, nicht tumorsuspekte Veränderungen in den CT Bildgebungen des betroffenen Patientenkollektivs verbreitet sind. Etwa 15% der Patienten entwickeln nach Thoraxbestrahlung trotz moderner und exakter Bestrahlungstechniken eine Pneumonitis und daraus folgend eine Lungenfibrose (Dadrach et al., 2016). Durch die heutzutage bei der Strahlentherapie benutzten hohen Dosen und steile Dosisgradienten und durch die Anpassung des Bestrahlungsfelds an die Morphologie des Tumors, entwickeln die fibrotischen Areale oft tumorähnliche Muster und können so Rezidive nachahmen. Durch eine entsprechende Diagnostik, die Tumorrezidive von fibrotischen Arealen unterscheiden kann, könnte man dem Patienten unnötige Eingriffe ohne onkologischen Nutzen ersparen. Biopsien des verdächtigen Gewebes bieten zwar die höchste diagnostische Sicherheit, allerdings bergen sie ein hohes Komplikationsrisiko (Pneumothorax 20%, Hämoptysen 5-10%). Mithilfe von gezielter Diagnostik könnte man aber auch im Falle eines Rezidivs verhindern, eine Chance auf Heilung zu vertun. Da solche zweideutigen CT-Befunde immer häufiger sind, werden bessere diagnostische Mittel benötigt (Mattonen et al., 2013).

Zur Untersuchung von Strahlen-induzierter Lungenfibrose wurde bisher in Mausmodellen meist der gesamte Thorax mit einer hohen Einzeldosis (20 Gy) bestrahlt (Eldh et al., 2012; Flechsig et al., 2012; Flechsig et al., 2010; Li et al., 2009; Shu et al., 2013). In diesen Studien konnte die Lungenfibrose ungefähr ab Woche 20 mittels CT Bildgebung oder histologisch detektiert werden. In einer präklinischen Studie mit Mäusen, die die klinische Situation besser simuliert, wurde nur der obere Teil einer Lunge mit bis zu 20 Gy bestrahlt (Granton et al., 2014). Hier konnte die Lungenfibrose erst später als in den Studien, in denen der gesamte Thorax mit der gleichen Dosis bestrahlt wurde, detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass das bestrahlte Lungenvolumen den Zeitpunkt des Auftretens und den Schweregrad der Fibrose beeinflusst.

In Studien, in denen nur ein kleiner Teil (3-7 mm Durchmesser) einer Lunge stereotaktisch mit hohen Dosen (bis zu 100 Gy) bestrahlt wurde, zeigte sich Lungenfibrose in der Immunhistochemie nach 1-6 Monaten in Abhängigkeit von der Größe des Bestrahlungsfeldes

und der Dosis (Cho et al., 2010; Choi et al., 2015; Hong et al., 2016). Die Detektion der Lungenfibrose mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden, wie zum Beispiel CT- oder planarer Röntgenbildgebung (Projektionsradiographie), ist jedoch nicht sehr sensitiv und die Unterscheidung von Fibrose und Tumorrezidiv oftmals sehr schwierig.

Aus diesem Grund ist die Korrelation zwischen dosimetrischen Faktoren (Bestrahlungsdosis, -volumen, Fraktionierung) und der Entstehung von Lungenfibrose weder im Patienten noch im präklinischen Modell gut charakterisiert. Deshalb sind Methoden, die fibrotische Regionen exakt detektieren können, Voraussetzung, um den Dosis-Effekt-Zusammenhang genau zu bestimmen.

Seit einigen Jahren wird zunehmend an der Röntgen-Dunkelfeldbildgebung geforscht, die zu einem deutlich verbesserten Kontrast und mehr Empfindlichkeit führt und die Lunge in idealer Weise abbildet (Velroyen et al., 2015; A Yaroshenko et al., 2013).

Die Dunkelfeldbildgebung hat eine besonders hohe Sensitivität für granuläre Strukturen, wie etwa die Alveolen, die die Lunge bilden. Deshalb eignet sich diese Methode besonders gut für die frühe Detektion von Veränderungen in der Lunge, auch wenn diese im regulären CT noch nicht zu erkennen sind (Weber et al., 2012).

Mittels Dunkelfeldbildgebung können frühe pathologische Veränderungen aufgrund von Lungenfibrose in Mäusen detektiert und quantifiziert werden (Yaroshenko et al., 2015). Die neuartige Methode ist wesentlich sensitiver in der Detektion von Bleomycin-induzierter Lungenfibrose im Vergleich zu konventioneller Röntgenbildgebung. Hervorzuheben ist, dass die Strahlenbelastung der Mäuse bei der Dunkelfeldbildgebung in einer Projektion wesentlich geringer ist als bei hochauflösenden computertomographischen Aufnahmen (Yaroshenko et al., 2015).

Radiologen, die Dunkelfeldbildgebung benutzten, um fibrotische Veränderungen in der Lunge am Mausmodell zu diagnostizieren, schätzten ihr Vertrauen in ihre eigene diagnostische Entscheidung höher ein als bei konventionellen, absorptionsbasierten Radiographien (Hellbach et al., 2015).

Die Dunkelfeldbildgebung wurde bisher im Mausmodell nur für die durch das Chemotherapeutikum Bleomycin induzierte Lungenfibrose validiert (Hellbach et al., 2017). Dies entspricht nicht exakt der klinischen Realität von strahlentherapeutischen Patienten. Deshalb sollte in der von uns durchgeführten Studie erstmalig die strahleninduzierte Lungenfibrose mittels Dunkelfeldbildgebung detektiert werden. Das Modell der

strahleninduzierten Lungenfibrose an Mäusen zeigte sich hierbei repräsentativ für die Darstellung der Reaktion der menschlichen Lunge auf Bestrahlung (Jackson et al., 2012).

So soll die Dunkelfeldbildgebung zunehmend als diagnostische Option zunächst in Forschung und später im klinischen Alltag etabliert werden.

Ziel der Forschung war es, die klinische Anwendung ionisierender Strahlen bei Tumorpatienten zu verbessern. Eine frühzeitige Detektion ermöglicht ein rechtzeitiges Abbrechen beziehungsweise eine Anpassung der Strahlentherapie, um auf diese Weise eine Lungenfibrose als Komplikation zu verhindern oder ihr Fortschreiten aufzuhalten. Auch könnte eine frühzeitige Unterscheidung von Rezidiven oder Lungenfibrose wie zuvor dargelegt möglich sein. Weitere Forschung auf diesem Gebiet erlaubt uns auch eine bessere und so auch fibrosevermeidende Therapieplanung, wenn wir die Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abhängigkeit von Faktoren wie zum Beispiel dem Lungenvolumen oder der Lage in der Lunge besser verstehen.

2. Grundlagen

2.1 Die Lunge des Menschen

2.1.1 Anatomie

Die Lunge als Atmungsorgan des Menschen besteht aus einer linken und einer rechten Lunge, welche wiederum in Lappen unterteilt sind (Abbildung 1). Diese lassen sich jeweils in funktionelle Segmente einteilen. Die Luft wird durch ein System aus Bronchien zu den Lungenbläschen (Alveolen) geleitet, in denen der Gasaustausch stattfindet. Rechte und linke Lunge haben ein Gewicht von ca. 800 g und ein Gesamtvolumen von etwa 2,9 Litern, von denen 1,5 Liter auf den rechten und 1,4 Liter auf die linke Lunge entfallen. Durch das feine gasaustauschende System der Alveolen erreicht die Lunge eine Oberfläche von ca. 100 m².

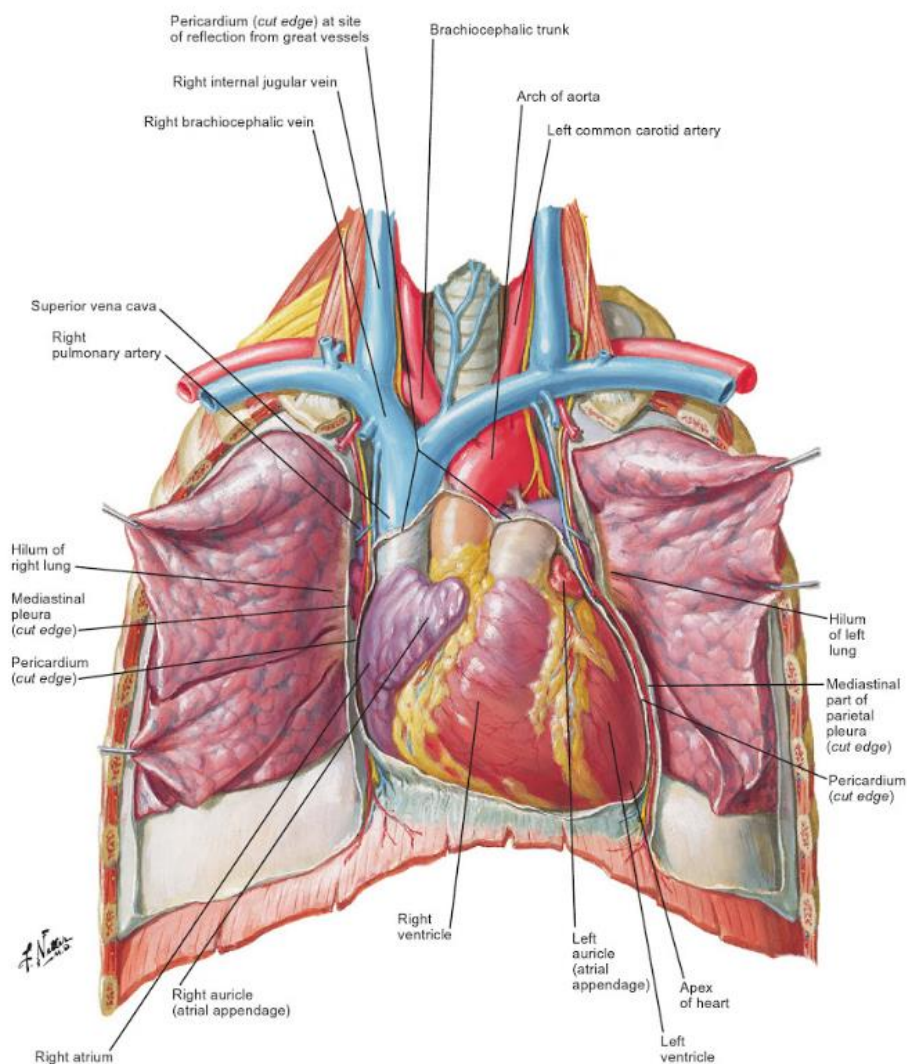


Abbildung 1: Die menschliche Lunge besteht aus rechter und linker Lunge. Die rechte Lunge ist aus drei Lungenlappen, die linke Lunge aus zwei Lungenlappen aufgebaut. Die Oberfläche der Lungen ist von der Pleura überzogen. (Netter, 2020)

Die Lunge als Atmungsorgan des Menschen besteht aus einer linken und einer rechten Lunge, welche wiederum in Lappen unterteilt sind (Abbildung 1). Diese lassen sich jeweils in funktionelle Segmente einteilen. Die Luft wird durch ein System aus Bronchien zu den Lungenbläschen (Alveolen) geleitet, in denen der Gasaustausch stattfindet. Rechte und linke Lunge haben ein Gewicht von ca. 800 g und ein Gesamtvolumen von etwa 2,9 Litern, von denen 1,5 Liter auf den rechten und 1,4 Liter auf die linke Lunge entfallen. Durch das feine gasaustauschende System der Alveolen erreicht die Lunge eine Oberfläche von ca. 100 m².

Die 10 cm lange Trachea verbindet den Kehlkopf mit dem Bronchialsystem der Lunge. Sie ist aus U-förmigen Knorpelspannen aufgebaut, die dorsal durch eine Muskel-Bindegewebs-Platte verbunden sind. Neben der Weiterleitung der Atemluft ist sie auch für das Anwärmen dieser, die Immunabwehr und den Transport von Schmutz und Schleim aus den Atemwegen hinaus (mucociliäre Clearance) verantwortlich.

Das Bronchialsystem spaltet sich ab der Bifurcatio tracheae in seinem Verlauf etwa zwanzig Mal zweiteilig (dichotom) auf. Die Einteilung der Lunge in Lappen und Segmente entspricht der Aufspaltung des Bronchialsystems. Ein Lungenlappen entspricht somit dem Lungenabschnitt, der von einem Lappenbronchus mit Atemluft versorgt wird. Dementsprechend wird ein Lungensegment durch das Versorgungsgebiet der Segmentbronchien definiert.

Hierbei werden die Abschnitte unterteilt in: Hauptbronchien, Lappenbronchien, Segmentbronchien und Subsegmentbronchien. Aus diesen lässt sich, wie bereits erwähnt, die Untergliederung des Lungengewebes in Lungenlappen und Lungensegmente herleiten.

Durch die Lage des Herzens unterscheiden sich die linke und rechte Lunge in ihrem Aufbau. So hat die linke Lunge (durch einen fehlenden Mittellappen) nur zwei Lungenlappen, welche sich in neun Lungensegmente unterteilen. Die rechte Lunge hingegen besteht aus drei Lappen und zehn Segmenten.

Der gasaustauschende Abschnitt der Lunge beginnt mit den Bronchioli respiratorii, die in den Alveolargang (Ductus alveolaris) münden. Von diesem gehen traubenförmig die vielzähligen Sacculi alveolares ab. Durch diese feine Aufspaltung enthält die Lunge eine Anzahl von etwa 300 Millionen Alveolen, deren Fläche insgesamt etwa 100m² beträgt. Auch von den Bronchioli respiratorii zweigen sich vereinzelt Alveolen ab. Die Alveolen sind voneinander durch Inter-alveolaresepten getrennt, welche kapillarisiert sind und elastische Fasern enthalten.

Die Lunge hat eine besondere Gefäßversorgung, bei der zwei Systeme, die Lungengefäße und die Bronchialgefäße unterschieden werden. Die Lungenarterien werden gehören zu den Vasa publica der Lunge und tragen sauerstoffarmes Blut aus dem rechten Herzen durch die Lunge, um dort den Gasaustausch zu ermöglichen. Sie verlaufen entlang der Bronchien zentral in den Lappen und Segmenten der Lunge. Die Bronchialarterien, die zu den Vasa privata der Lunge gehören, sind Teil des Körperkreislaufs und versorgen (mit Ausnahme der Alveolen, die aus den Lungengefäßen versorgt werden) das Lungengewebe selbst mit sauerstoffreichem Blut. Sie finden ihren Ursprung direkt aus der Aorta oder den Arteriae intercostales posteriores und ziehen von dorsal durch das peribronchiale Bindegewebe zu den Bronchien.

Dem arteriellen System entsprechend ist auch der venöse Abfluss der Lunge eingeteilt. Lungenvenen (zu den Vasa publica gehörend) leiten das in den Alveolen oxygenierte Blut aus der Lunge zum linken Herzen. Bronchialvenen (zu den Vasa privata gehörend) führen sauerstoffarmes Blut zurück in den Körperkreislauf.

Die Oberfläche der Lungen ist von der Pleura überzogen, die in Pleura pulmonalis und Pleura parietalis gegliedert wird. Zwischen diesen beiden Schichten liegt ein dünner Flüssigkeitsspalt, der Pleuraspalt, in dem ein Unterdruck herrscht, der beide Blätter zusammenhalten lässt.

Es existieren zwei Systeme des Lymphabflusses in der Lunge. Zum einen das subpleurale Abflusssystem, das entlang der Lungenvenen verläuft, zum anderen das peribronchiale System, das entlang der Lungenarterien verläuft. Beide fließen in den Nodi lymphoidei tracheobronchiales zusammen.

2.1.2 Physiologie

Die Hauptfunktion der Lunge ist die Aufnahme von Sauerstoff in den Blutkreislauf und die Abgabe von Kohlendioxid in die Atemluft. Drei Mechanismen sind dabei von Bedeutung. Beim Gasaustausch zwischen Blut und Alveolarraum wird durch Diffusion Sauerstoff ins Blut aufgenommen und Kohlendioxid in die Atemluft abgegeben. Dabei werden in Ruhe pro Minute 310 ml Sauerstoff aufgenommen und 260 ml Kohlendioxid abgegeben. Dieser Mechanismus dient auch der Regulation des pH-Wertes des Blutes.

Die Ventilation bezeichnet die Verteilung der Atemluft auf die verschiedenen Lungenanteile. Dadurch soll die Versorgung der Alveolen mit frischer Luft sichergestellt werden, um so den Gasaustausch zu ermöglichen. Als Alveolarraum bezeichnet man den Teil der Atemwege, der am Gasaustausch teilnimmt. Hiervon werden die Abschnitte der Atemwege abgegrenzt, die

lediglich Luft leiten und nicht zum Gasaustausch fähig sind. Diese werden als Totraum bezeichnet. Von alveolärem Totraum spricht man, wenn Alveolen zwar belüftet, aber nicht durchblutet sind und deshalb nicht am Gasaustausch teilnehmen können.

Als Perfusion bezeichnet man die Durchblutung der Alveolen über die Arteria pulmonalis. Da das gesamte Blutvolumen des Menschen die Lunge passieren muss, entspricht die Lungendurchblutung dem Herzzeitvolumen (ca. 5L/min). Allerdings unterscheidet sich die Verteilung des Blutes auf die verschiedenen Lungenabschnitte, was einen großen Einfluss auf die Oxygenierung des Blutes hat. So ist die Durchblutung in der Lungenbasis, bedingt durch die Schwerkraft, stärker als in den Lungenspitzen. Die Perfusion muss auf die Ventilation und den Sauerstoffbedarf des Menschen abgestimmt sein, weshalb das Ventilations-Perfusions-Verhältnis konstant gehalten werden soll. Wird beispielsweise ein Lungenabschnitt durchblutet aber nicht ventiliert, so sinkt die Sauerstoffkonzentration im Blut. Deshalb reagieren die Gefäße der Lunge auf Sauerstoffmangel mit einer Vasokonstriktion. Diesen Mechanismus, der dem Erhalt des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses dient, bezeichnet man als Euler-Liljestrand-Mechanismus.

2.1.3 Histologie

Die Bronchien lassen sich histologisch in drei Schichten aufteilen: die Tunica mucosa, die Tunica fibromusculocartilaginea und die Tunica adventitia. Die innerste der drei Schichten, die Tunica mucosa, teilt sich auf in eine Lamina epithelialis und eine Lamina propria. Die Lamina epithelialis enthält neben dem respiratorischen Epithel mitsamt seiner beweglichen Kinozilien auch Becherzellen und Neuroendokrine Zellen und ermöglicht den Bronchien, sich selbst zu reinigen. Dieser Mechanismus wird auch Mucociliäre Clearance genannt. Die durch ein feines Kapillarnetz gut durchblutete Lamina propria enthält Fibroblasten, elastische Fasern, seromuköse Drüsen und Immunzellen, wodurch sie mehrere Funktionen erfüllen kann. Die hohe Durchblutung ermöglicht eine Anwärmung der Atemluft, die elastischen Fasern lassen eine Anpassung des Thoraxvolumens bei der Atmung zu und die Immunzellen dienen als Abwehrmechanismus.

Auch die darunter liegende Tunica fibromusculocartilaginea teilt sich in zwei Schichten auf. Die Tunica fibromuscularis, eine gitterartige Schicht aus glatter Muskulatur, erlaubt die Veränderung des Durchmessers der Bronchien zur Steuerung der Luftverteilung. Die Tunica

cartilaginea, eine Schicht aus hyalinen Knorpelplatten, welche mit elastischen Fasern verbunden sind, hält das Lumen auch bei negativen intrathorakalen Drücken offen.

Die äußerste Schicht der Bronchien, die Tunica adventitia, enthält versorgende Gefäße, Nerven und Bindegewebe, deren Funktion die vegetative Regulation und die Versorgung sind.

Die verschiedenen Abschnitte des Bronchialbaums weisen histologische Merkmale auf, durch die sie sich voneinander unterscheiden lassen. Der Bronchiolus entspricht mit seinem Wandaufbau dem der Bronchien, wobei sie keine Drüsen und keinen Knorpel mehr enthalten. Im folgenden Abschnitt teilt sich der Bronchiolus in mehrere Bronchioli terminales auf. Auch der Wandaufbau der Bronchioli terminales ist dreigeschichtet. Im innen gelegenen Flimmerepithel sind allerdings keine Becherzellen mehr aufzufinden. Stattdessen zeigen sich hier Keulenzellen, Zilienfreie, sekretorische Zellen. Bis hier dient das Epithel hauptsächlich der Luftleitung. Dies ändert sich nach der darauffolgenden Aufzweigung, auf die die Bronchioli respiratorii folgen. Die Bronchioli respiratorii sind der erste Abschnitt des Bronchialbaums der am Gasaustausch teilnimmt. Hier können auch schon vereinzelt Alveolen in den Wänden liegen. Über den Ductus alveolaris münden die Bronchioli respiratorii dann in die endständigen Alveolen.

Der Aufbau der Alveolen ist durch die flachen, einschichtigen Wände aus Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten optimal an ihre gasaustauschende Funktion angepasst. Typ 1 Pneumozyten sind einer der Hauptbestandteile der Blut-Luft-Schranke und bedecken 95% der Alveolaroberfläche. Es handelt sich bei ihnen um flache Epithelzellen, die untereinander durch Tight Junctions verbunden sind. Typ 2 Pneumozyten bedecken 5% der Alveolaroberfläche und sind für die Produktion von Surfactant zuständig. Dieses besteht aus Phospholipiden und bestimmten Proteinen und setzt die Oberflächenspannung der Alveolen herunter, wodurch die Atemarbeit reduziert wird. So wird die Compliance der Lunge aufrechterhalten und eine normale Atmung ermöglicht. Die Typ 2 Pneumozyten sind kubisch, enthalten Vakuolen und liegen verstreut zwischen den Typ 1 Pneumozyten. Bei Gewebsverletzung und Verlust von Typ 1 Pneumozyten sind sie in der Lage, diese zu ersetzen.

Die Alveolen enthalten zudem auch Alveolarmakrophagen, welche sich innerhalb der Alveolen frei bewegen und dabei Bakterien, Zelldetritus und Schmutzpartikel phagozytieren können. Pro Alveole gibt es etwa 50 Alveolarmakrophagen.

An die Alveolen lagern sich Kapillaren an, durch welche sauerstoffarmes Blut aus den Lungenarterien transportiert wird. Die sogenannte Blut-Luft-Schranke, also die

Alveolarmembran besteht aus dem Kapillarendothel, einer gemeinsamen Basallamina, Typ 1 Pneumozyten und einer Schicht aus Surfactant. Mit der Dicke von ca. 0,2-2 μm schafft die Blut-Luft-Schranke, eine besonders kurze Diffusionsstrecke zwischen der Atemluft im Alveolarraum und dem Blut in den Kapillaren.

2.2 Die Lunge der Maus

Zwischen der murinen und der menschlichen Lunge gibt es Unterschiede in ihrem anatomischen Aufbau und der histologischen Zellbestandteile der einzelnen Organabschnitte. Diese Unterschiede kompensieren zum Beispiel den Größenunterschied von Mäusen oder ihren höheren metabolischen Grundumsatz. So haben Mäuse eine deutlich höhere Atemfrequenz, welche 250-350 Atemzüge pro Minute beträgt. Auch ist die relative Größe der Atemwegslumina der Mäuse größer, um so den Atemwegswiderstand zu verringern, der sonst durch die hohe Atemfrequenz der Mäuse zu hoch wäre.

2.2.1 Anatomie

Die rechte Lunge von Mäusen ist in vier Lungenlappen unterteilt: den rechten Oberlappen, den rechten Mittellappen, den rechten Unterlappen und den Akzessorischen Lappen, der sich wiederum in den Zwischenlappen und den Diaphragmatischen Lappen unterteilen lässt. Die rechte Lunge von Mäusen besteht hingegen aus nur einem Lungenlappen.

Die Trachea von Mäusen als größter luftleitender Weg besteht aus 15-18 C-förmigen Knorpelringen. Diese gehen von proximal nach distal zunehmend in weniger organisierte Knorpelplatten über. Die menschliche Trachea enthält hingegen 15-20 U-förmige Knorpelringe, deren Aufbau unverändert bleibt. Auch bei Mäusen spaltet sich die Trachea über dem Herzen in den rechten und linken Bronchus auf. Der rechte Bronchus teilt sich dann in drei Lobärbronchien und der linke Bronchus in zwei Lobärbronchien auf.

Die Aufspaltung der Bronchien und Bronchioli erfolgt bei Mäusen monopodial, also asymmetrisch. Das größere, vorausliegende Segment geht hierbei fließend in das kleinere Segment über. Hieraus zweigen die weiteren Atemwege asymmetrisch ab. Beim Menschen ist diese Aufspaltung der Atemwege hingegen dichotom organisiert. Der vorausgehende Atemwegsabschnitt geht in einem Winkel von 45° in zwei kleinere, gleichgroße Tochtersegmente über.

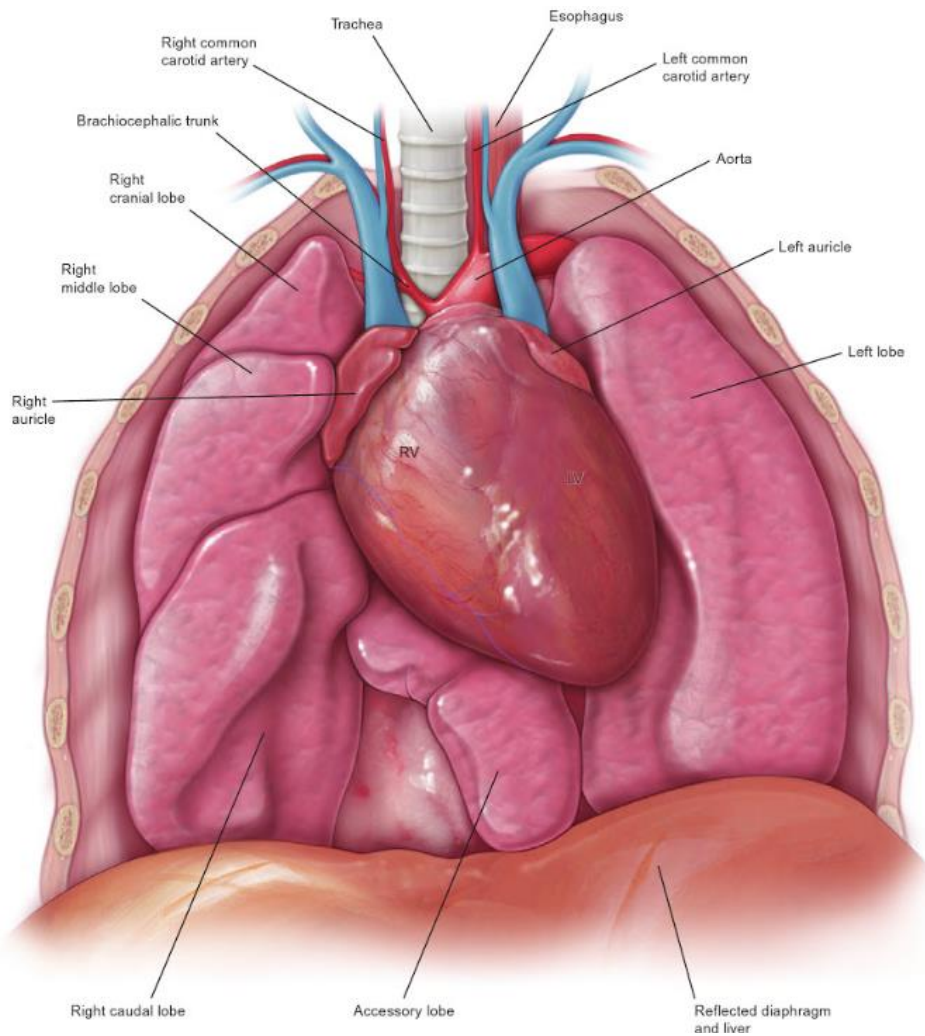


Abbildung 2: Die rechte Lunge von Mäusen besteht aus vier Lungenlappen. Die linke Lunge von Mäusen besteht aus einem Lungenlappen. (Treuting, 2011)

Die weitere Unterscheidung der kleineren Atemwege von Mäusen gestaltet sich schwieriger als beim Menschen. Die intrapulmonalen Bronchien von Mäusen enthalten keinen Knorpel, sodass zwischen den Bronchien und Bronchioli nicht eindeutig unterschieden werden kann. Auch haben Mäuse keine, beziehungsweise nur wenige respiratorischen Bronchioli. Die Terminalen Bronchiolen enden direkt im Ductus alveolaris.

Im gasaustauschenden Abschnitt lässt sich feststellen, dass Mäuse weniger Atemwegsabzweigungen haben als der Mensch. Während bei Mäusen ein respiratorischer Bronchiolus 13-17 Atemwegsabzweigungen und damit Alveolarsäcke versorgt, sind es beim Menschen 17-21.

Hinzu kommt, dass das Lungenparenchym von Mäusen proportional einen größeren Anteil am gesamten Lungenvolumen ausmacht als beim Menschen. Das für die Atmung zuständige Lungenparenchym macht bei Mäusen einen Anteil von 18% - beim Menschen einen Anteil von 12% am Lungenvolumen aus (Salomon, 2008).

2.2.2 Histologie

Die Histologie der einzelnen Lungenabschnitte ist an die entsprechenden Funktionen und Erfordernisse der Segmente abgestimmt. Auch auf mikroanatomischer Ebene zeigen sich Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen.

In der Trachea von Mäusen überwiegen nicht-zilientragende, sekretorische Bronchialepithelzellen, sog. Clara-Zellen. Diese produzieren eine schützende Schleimschicht zur Luftbefeuchtung und filtern Schmutzpartikel und Keime aus der Luft heraus. Auch Bestandteile des Surfactants werden von ihnen produziert. Am zweithäufigsten treten hier zilientragende, zylindrische Zottenepithelzellen auf. Weitere Zellen, die sich in der murinen Trachea finden lassen, sind Bürstenzellen, Neuroendokrine Zellen und Basalzellen. Die in der menschlichen Trachea häufigsten Zellen sind die sogenannten Becherzellen. Bei Mäusen sind diese deutlich seltener, kommen höchstens im Bereich der Carina vor und produzieren ein muköses Sekret. Nennenswert ist, dass Mäuse aus spezifisch pathogenfreien (SPF) Haltungen deutlich weniger Becherzellen besitzen als gewöhnliche Labormäuse. Mäuse aus SPF Haltungen besitzen in der Lamina propria der Trachea zudem deutlich weniger Lymphozyten als andere Mäuse. Dadurch lässt sich ein Zusammenhang mit der Exposition gegenüber körperfremden Partikeln und Pathogenen erkennen. Die Submukosa der Trachea enthält bei Mäusen nur wenige submuköse Drüsen, welche 1-6mm distal des Larynx gelegen sind. Beim Menschen hingegen enthält die Submukosa zahlreiche submuköse Drüsen.

Die in den Bronchien am häufigsten vorkommenden Zellen sind bei Mäusen die Clara-Zellen (59%). Die zweithäufigsten Zellen sind die zilientragenden Zellen (28-36%). Im Vergleich dazu hat der Mensch keine Clara-Zellen in den Bronchien. An dieser Stelle treten beim Menschen hingegen muköse Becherzellen (10%) und seröse Zellen (3%) auf. Die Bronchien von Mäusen haben nur eine dünne Lamina Propria, eine Submukosa ohne submuköse Drüsen und enthalten keine Knorpelringe. In diesen Aspekten unterscheiden sie sich von den menschlichen Bronchien, welche histologisch dem Aufbau der Trachea ähneln.

Der Übergang der Bronchien in Bronchiolen ist bei Mäusen nur sehr schwer zu unterscheiden, da wie zuvor genannt Knorpelringe, Becherzellen und submuköse Drüsen im Bronchialepithel von Mäusen fehlen und somit keine histologischen Anhaltspunkte zur Unterscheidung bieten. In den terminalen Bronchiolen machen bei Mäusen Clara Zellen 60-80% der Epithelzellen aus, wobei der Anteil an Becherzellen unter 1% liegt. Mäuse haben keine, beziehungsweise sehr wenige respiratorische Bronchiolen. Die terminalen Bronchiolen gehen daher größtenteils

direkt in den Ductus alveolaris über. Die Zellzusammensetzung der Alveolen von Mäusen ist unbekannt, jedoch ist sie höchstwahrscheinlich der des Menschen ähnlich (Treuting, 2011).

2.3. Die strahleninduzierte Lungenfibrose

Bei der Lungenfibrose kommt es zu einer Zunahme von Bindegewebe in der gesamten Lunge. Da auch die Blut-Luft-Schranke davon betroffen ist, ist die Diffusionsstrecke erhöht und dadurch der Gasaustausch und somit die Atmung beeinträchtigt. Ätiologisch werden zwei Formen der Lungenfibrose unterschieden, die Idiopathische interstitielle Pneumonie und die sekundäre Lungenfibrose. Beide machen jeweils etwa 50% der Fälle aus. Ursachen für die sekundäre Lungenfibrose können Autoimmunerkrankungen, inhalative Noxen organischen oder anorganischen Ursprungs, Medikamente und Strahlentherapie sein. Im Folgenden wird die strahleninduzierte Lungenfibrose behandelt.

Die strahleninduzierte Lungenfibrose ist eine bedeutende Komplikation nach strahlentherapeutischen Behandlungen im Thoraxbereich. Da sie zu einer schweren Ateminsuffizienz führen kann, ist sie wichtig für die Langzeit-Lebensqualität für Patienten nach Bestrahlung im Thoraxbereich. Späte Veränderungen im CT treten nach Bestrahlung mit ≥ 40 Gy bei 80-100% der Patienten auf (Mattonen et al., 2013).

Die Folgen der Lungenbestrahlung manifestieren sich subakut, in einer verzögerten Frühreaktion als Strahlenpneumonitis und im Rahmen einer chronischen Spätreaktion als Lungenfibrose.

Da mit der Zunahme der Volumen-Dosis und der Referenzdosis auch das Volumen des Fibroseareals wächst, hat die Strahlentherapie im Thoraxbereich nur eine geringe therapeutische Breite. Die pulmonalen Nebenwirkungen limitieren die Verabreichung einer Dosis für die adäquate Behandlung des Tumors (Benveniste et al., 2013; Mattonen et al., 2013; Oh et al., 2012).

2.3.1 Ätiologie

Morphologisch gleicht die akute Strahlenreaktion einer interstitiellen Pneumonie. Die Strahlenreaktion der Lunge hat eine parenchymale (alveoläre), eine entzündliche und eine vaskuläre Komponente. Die Strahleninduzierte Lungenfibrose ist das letzte Stadium des strahleninduzierten Lungenschadens. Dieser wird in der Lunge durch den Einfluss ionisierender Strahlung ausgelöst. Der strahleninduzierte Lungenschaden teilt sich in drei aufeinanderfolgende pathologische Phasen, die exsudative Phase, die organisierende-proliferative Phase und die chronische fibrotische Phase auf. Die beiden ersten entwickeln sich in den ersten 3 Monaten nach der Bestrahlung der Lunge und gehören zur akuten Strahlenreaktion, der strahleninduzierten Pneumonitis.

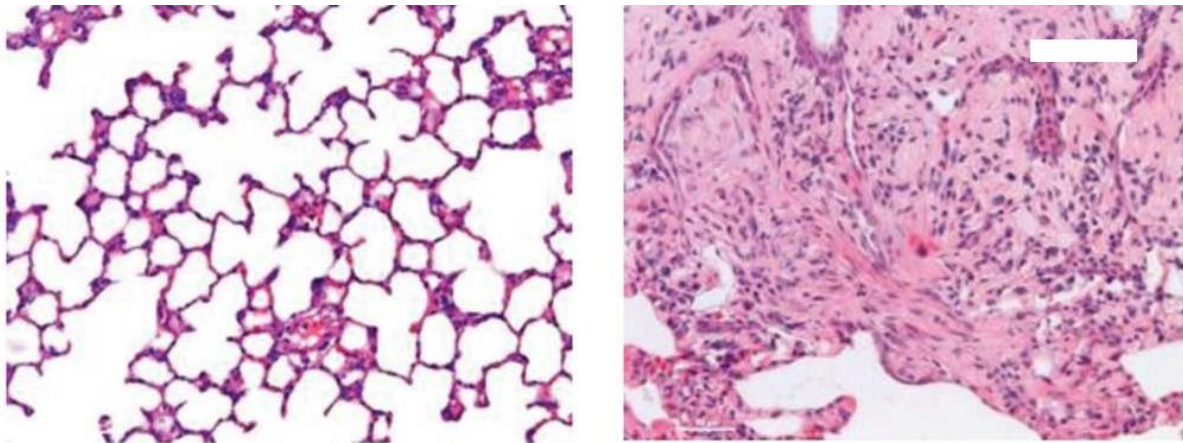


Abbildung 3: Hämatoxylin-Eosin- Präparate einer gesunden Lunge (links) und einer fibrotisierten Lunge (rechts). Während im linken Bild die Struktur der Alveolen intakt ist, sind diese im rechten Bild eingefallen und mit Bindegewebe verwachsen. Längensbalken: 100 μ m (You et al., 2014)

Die eigentliche strahleninduzierte Fibrose beginnt sich nach neun Monaten auszubilden und verbleibt nach zwei Jahren stabil. Sie kann aus einer vorhergehenden Strahlenpneumonitis entstehen; kann aber auch auf direkte Weise auftreten (Park, Chung, Chun, & Suh, 2000).

Die bei der Strahlentherapie verwendete Strahlung ist Energie in Form von elektromagnetischen Wellen oder Teilchen. Dabei deutet der Begriff „ionisierend“ darauf hin, dass diese Energie stark genug dazu ist, um gebundene Elektronen abzulösen. Ionisierende Strahlung bezieht sich auf alpha-, beta-, gamma- und Röntgenstrahlung. Dabei entspricht die Strahlung die für therapeutische Zwecke genutzt wird, dem Spektrum der Gammastrahlen (Straub et al., 2015).

Bei der Bestrahlung von Tumoren im Thoraxbereich wird auch das Normalgewebe der Lunge der Strahlung und deren Effekt ausgesetzt. Die Zellen werden durch die ionisierende Strahlung einerseits durch den direkten Strahleneffekt, andererseits durch den indirekten Strahleneffekt

geschädigt. So führt das Auftreffen der Strahlung auf die DNA unmittelbar zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der Nucleotidketten. Auf indirektem Wege werden durch die Interaktion der Strahlung mit Wassermolekülen hingegen freie Radikale gebildet. Bei der Strahleninduzierten Lungenfibrose stehen vor allem die Schäden durch freie Radikale (reaktive Sauerstoffspezies) im Vordergrund und sind für den Großteil des Schadens zu verantworten. Diese Radikale, wie etwa Superoxid, Hydrogenperoxid oder Hydroxylradikale, hydrolysieren dann die Phosphorsäureesterbindungen der Desoxyribose. Letztere sind für 60-70% der Schäden verantwortlich. Auch reaktive Stickstoffspezies spielen eine Rolle bei der Entstehung von Strahlenschäden. Auch andere Zellkomponenten wie Nukleinsäuren, Lipide oder Proteine werden durch die Wirkung der Strahlen beschädigt. Dadurch werden Zellmembranen und chromosomale DNA zerstört, was zu zellulärer Dysfunktion und schließlich zum Zelltod führt. Auch Enzyme wie die Superoxiddismutase, Katalase oder der Glutathion-Peroxidase welche die durch freie Radikale entstandenen Schäden kontrollieren werden zerstört. Durch den akuten Mangel dieser Enzyme kommt es zu oxidativem Stress im Gewebe (Straub et al., 2015).

Entsprechend der Strahlenwirkung auf die Zellteilung sind Zellen mit hoher Mitoserate wie Typ II Pneumozyten und Endothelzellen die Hauptzielzellen. Die Surfactant bildenden Typ II Pneumozyten haben bei Mäusen eine Umsatzrate von 20 bis 35 Tagen. Direkt nach der Bestrahlung der Lunge werden pathophysiologisch zunächst Typ-II Pneumozyten verletzt, was durch Elektronenmikroskopie und die frühe Freisetzung von Surfactant nachgewiesen wurde.

Innerhalb der ersten Stunde nach Strahlenexposition kommt es zu einer kompensatorischen Hypertrophie der Lamellarkörper in Typ-II-Pneumozyten. Lamellarkörper sind Vesikel, in welchen Surfactant gespeichert und durch Exozytose sezerniert wird. Es kommt also zur vermehrten Sekretion von Surfactant factor (Dörr 2002). Unmittelbar nach der Bestrahlung steigt die Produktion von Zytokinen an und besteht fort. Diese Zytokine regen die Genexpression von Kollagen an, die bis zum Auftreten von klinischen Auffälligkeiten persistiert. So stellte man beispielsweise fest, dass in den bestrahlten Lungen von alveolären Makrophagen und Typ 2 Pneumozyten vermehrt TGF und TGF- β synthetisiert werden. Diese aktivieren wiederum die Wachstumsfaktorrezeptoren von Fibroblasten, welche dadurch zur Proliferation angeregt werden. Hinzu kommt, dass so auch deren Kollagengene aktiviert werden, wodurch die Produktion von interstitiellem Kollagen und Fibronectin stimuliert wird. Allerdings ist dieses erhöhte Niveau an Zytokinen auch bei anderen Noxen wie z.B. Bleomycin, die ebenfalls zu Lungenfibrose führen, messbar (Rubin, Constone, Fajardo, Phillips, & Wasserman, 1995).

Nach 24 Stunden treten subendotheliale und perivaskuläre Ödeme mit proteinhaltigem Material auf. Die Pneumozyten vom Typ II haben keine lamellaren Einschlüsse mehr und die Sekretion von Surfactant verringert sich wieder (im Gegensatz zur ersten Stunde nach Strahlenexposition).

In den ersten zwei Monaten nach Bestrahlung, der akuten Phase, kommt es zur Schwellung und Vakuolisierung der Zellen. Verletzte Alveolar- und Kapillarendothelzellen lösen sich von der Basalmembran ab. Die kapillaren Endothelzellen haben eine ähnliche mitotische Aktivität wie Typ-II-Pneumozyten. Die Verletzung von Mikrokapillaren führt zu deren Schwellung, Obstruktion und schließlich zur kapillaren Stauung und Thrombose. Als Folge der Zelledepletion ist die Schutzfunktion der alveolaren Membran gegenüber exogenen Einflüssen und gegenüber dem Interstitium gestört. Durch die Schädigung des Alveolarepithels erhöht sich die Membranpermeabilität der Kapillaren und proteinreiche Flüssigkeit fließt durch Endothellücken aus den Kapillaren ins Interstitium und gelangt in die Alveolen. Ein perivaskuläres Ödem und die Migration entzündlicher Zellen, v.a. Makrophagen, können beobachtet werden. Messungen der Kapillarperfusion durch Infusion von kolloidalem Kohlenstoff haben gezeigt, dass fast 50% der Lungenacini aufgrund der verlorenen Kapillarperfusion nicht funktionstüchtig waren. In manchen Alveolen bilden sich aus einer Mischung aus abgeschuppten Epithelzellen, fibrinreichen Exsudat und Makrophagen hyaline Membranen aus. Autopsien von Patienten, die im Thoraxbereich bestrahlt wurden, zeigten hyaline Membranen als charakteristischen Befund bei 88 von 215 Patienten (Jennings, 1961). Allerdings ist das Vorhandensein hyaliner Membranen ein unspezifischer Befund, da diese auch bei akuten viralen oder bakteriellen Pneumonien, chemischen Pneumonitiden oder Urämien auftreten. Um die Abschilferungen des Alveolarepithels zu ersetzen, proliferieren die restlichen Zellen (insbesondere Typ II Pneumozyten). Dadurch lassen sich oft Zellatypien wie Organellendegenerationen, vergrößerte hyperchromatische Kerne und mehrkernige Zellen beobachten. Durch die Beschädigung der Typ II Pneumozyten kommt es auch zu einem Mangel von Surfactant. Dies führt zur weiteren alveolären Instabilität und schließlich zum Kollaps der Alveolen. Dadurch kann zusätzliche interstitielle Flüssigkeit in die Alveolen gelangen. Der Gasaustausch wird durch das Ödem und das Exsudat erschwert. Im weiteren Verlauf bilden sich perivaskuläre Fibrosen, die Kapillardichte wird reduziert.

Die intermediäre Phase, die in 2-9 Monaten nach der Bestrahlung erfolgt ist die Phase der organisierten proliferativen Fibrose. Hier wird der Aufbau des intraalveolären Exsudats weiter umstrukturiert. Atypische Zellen verkleiden weiterhin die Alveolen, das Ödem persistiert und die Zahl mononukleärer Zellen steigt an. Die alveolaren Septen sind mit Mastzellen,

Plasmazellen, Fibroblasten, Makrophagen und polymorphkernigen Zellen gefüllt und weisen eine interstitielle Fibrose mit Banden von Kollagenfibrillen auf. Lungenkapillaren werden durch die Fibrose, extensive Kollagenablagerungen und eine erhöhte Anzahl an Pneumozyten Typ II und arteriellen glatten Muskelzellen zerstört. Die Alveolarsepten werden von Fibroblasten infiltriert, sodass histologisch hyperzelluläre Septen mit interstitieller Fibrosis und Kollagenbanden in Erscheinung treten. Zudem treten eine Endotheliale Hyperplasie und eine Sklerosierung der Matrix auf.

Die akute Phase sowie das klinische Bild der strahleninduzierten Pneumonitis können sich bei vollständiger Resorption des Exsudats wieder auflösen und die Lungenfunktion kann wiederhergestellt werden. Kommt es zu keiner kompletten Auflösung, entwickelt sich schrittweise eine Fibrose.

Die späte Phase der chronischen Fibrose findet nach neun Monaten statt. Hierbei sind die hyalinen Membranen und atypischen Parenchymzellen, die die Alveolen ausgekleidet haben nicht mehr vorhanden. Es sind keine Entzündungszellen mehr zu beobachten und die Pneumozyten Typ II sind zu ihrer normalen Anzahl zurückgekehrt, wobei sich auch einige Kapillaren regeneriert haben. Es bildet sich eine einziehende Fibrose. Das Interstitium ist nicht mehr durch ein Ödem verdickt, sondern durch Ablagerungen von fibrösen Gewebe. Dieses wird aufgrund einer erhöhten Fibroblastenproliferation abgelagert, welche aufgrund einer Dysregulation der Wundheilung entsteht. Dadurch sind die Lufträume der Alveolen kollabiert und fast komplett zerstört. Zudem kommt es zum Austritt von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch chronischen Stress oder sich wiederholende kurze Stresssituationen. Dies führt wiederum zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bzw. Reaktiven Stickstoffspezies, die sich zusätzlich gewebsschädigend auswirken.

Dennoch ist nicht nur die alveokapilläre Membran betroffen, sondern auch Arterien, Bronchien und ebenso die Pleura. In der Intima und Media der Arteriolen und Arterien der Lunge entstehen Ödeme, welche zu proliferativen Veränderungen und Hyalinisierung führen. Diese Zerstörung der Gefäße kann zu Ischämien und weiterer Fibrose führen. Das vaskuläre Endothel der Lunge produziert Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), Prostacyclin und Plasminogen-Aktivator (PA). Die Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyms sinkt ab etwa 30 Tagen nach der Bestrahlung kontinuierlich auf 20% der Kontrollwert. Prostacyclin, welches vasodilatierend wirkt und Thrombozyten inhibiert, steigt über Monate hinweg auf das doppelte. Plasminogen-Aktivator, ein Enzym, das Plasminogen in der Fibrinolysekaskade spaltet, weist einen Monat nach der Bestrahlung eine erniedrigte Aktivität auf. Diese verringerte Aktivität korreliert mit

einer verminderten Fibrinolyse in der bestrahlten Lunge im Vergleich zur Kontrolle. So weisen Mausstämme, die zu strahleninduzierter Lungenfibrose neigen, eine signifikant geringere intrinsische PA- und ACE- Aktivität auf als Stämme, die nicht dazu neigen. Dieser Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität des Lungenendothels und der Entwicklung von strahleninduzierter Lungenfibrose steht also im Einklang mit der Hypothese, dass Gefäßschäden eine große Rolle in der Entstehung der Lungenfibrose spielen (Shenoy et al., 2010).

In den Bronchien kommt es zu fokalen Nekrosen der bronchialen Mukosa, einer erhöhten Mukusproduktion, Ablösungen des Zilienepithels und einer Plattenepithelmetaplasie. In der Pleura vakuolisieren die Serosazellen und lösen sich ab, was zur Störung des darunterliegenden elastischen Gewebes führt. Dadurch entstehen Verwachsungen der Pleura (Adhäsionen) und auch die Pleura fibroisiert. Zudem kann es zu akuten Pleuraergüssen kommen (Davis, Yankelevitz, & Henschke, 1992).

2.3.2 Prädisponierende Faktoren

Der Schweregrad der Erkrankung ist direkt vom betroffenen Lungenvolumen abhängig. Eine Lungenfibrose kann asymptomatisch sein, solange die verbleibende Lungenfunktion kompensatorisch ausreicht. Bei höherem Schweregrad kommt es zu einer restriktiven Lungenfunktionsstörung deren Schweregrad direkt vom betroffenen Lungenvolumen abhängig ist. Da die Entstehung der Lungenfibrose ein dynamischer Prozess ist, hängt der Schweregrad von verschiedenen Faktoren ab. Zunächst einmal von der Behandlung, dem Einsatz von Strahlentherapie und dem Bestrahlungsschema. Ein wichtiger prädisponierender Faktor, der die Stärke der Ausprägung der Lungenfibrose bestimmt, ist das bestrahlte Lungenvolumen. Bei einer Bestrahlung von weniger als 25% der Lunge werden nur minimale Symptome erwartet. In der Histologie sind Veränderungen und mögliche Schäden trotzdem sichtbar. Patienten, die mit höheren Dosen (>50 Gy) in kleinen Bestrahlungsfeldern behandelt wurden, zeigen insbesondere bei der Bestrahlung der unteren Lungenlappen stärker ausgeprägte Symptome. Dies liegt an der höheren Anzahl der Funktionsbereiche und größeren Volumina in diesen Lungenabschnitten. Werden 50% oder mehr der Lunge bestrahlt, steigt auch die Inzidenz von symptomatischer Strahlenpneumonitis. Die Bestrahlung beider Lungen mit 30 Gy gilt als tödlich. Jedoch resultieren laut einigen Autoren auch schon 25 Gy in dieser Konstellation in Lungeninsuffizienz und Tod (Movsas, Raffin, Epstein, & Link, 1997). Der Ausprägungsgrad

der Fibrose steigt folglich auch durch eine Hypofraktionierung, bei der durch die geringere Anzahl an Sitzungen pro Sitzung eine höhere Strahlendosis benötigt wird.

Eine zusätzliche Chemotherapie (insbesondere von fibrogenen Chemotherapeutika wie z.B. Bleomycin und Gemcitabin) erhöht unabhängig von der zeitlichen Sequenz zur Radiotherapie das Risiko von Strahlenpneumonitis und Lungenfibrose (Catane R 1979).

Des Weiteren ist die Entstehung der Fibrose abhängig von patienteneigenen Faktoren. In einer Studie aus dem Jahr 1998 wurden diverse Risikofaktoren aufgezeigt, die nach der Bestrahlung zur Entstehung einer Strahlenpneumonitis führen können. Diese birgt wiederum das Risiko der Ausbildung einer Lungenfibrose. Zu den Risikofaktoren zählen neben Bestrahlungsdosis und Volumen ein niedriger Prozentsatz im Karnofsky-Index, vorbestehende Lungenerkrankungen und schlechte Werte in der Lungenfunktionstestung. So weist eine erniedrigte FEV1 (engl. Forced Expiratory Pressure in 1 Second), also die Einsekundenkapazität auf eine restriktive Lungenerkrankung wie die Lungenfibrose hin. Patienten mit einem höheren FEV1 (>2) entwickelten seltener eine Strahlenpneumonitis als Patienten mit einem niedrigen FEV1 (<2). Patienten mit einem FEV1 >3 erlitten keine Strahlenpneumonitis. Die Inzidenz der Strahlenpneumonitis war auch für Patienten die einer kompletten chirurgischen Tumoresektion unterzogen wurden, mit 11% niedriger als bei Patienten die lediglich eine Biopsie erhielten (31%) (Monson JM, 1998).

Unterschiede in der Inzidenz der Strahlenpneumonitis zeigten sich in der Studie auch zwischen aktiven Rauchern (23%) und Nichtrauchern (0%).

Eine aktuelle Raucheranamnese wirkt hingegen protektiv auf die Entwicklung einer strahleninduzierten Lungenfibrose. Die langfristige Exposition der Lunge mit den Chemikalien des Tabakrauchs zerstört das Lungengewebe durch den Ersatz der elastischen Wände durch eine fibrotische Struktur und die Anreicherung von entzündungsfördernden Mediatoren. Die schützende Rolle des Rauchens steht daher wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer verringerten Empfindlichkeit der geschädigten Lunge im Vergleich zu einer gesunden Nichtraucherlunge. Zudem führt die durch Kohlenstoffmonoxid induzierte Hypoxie zu einer geringeren Genese von Reaktiven Sauerstoffspezies nach der Bestrahlung, sodass es zu weniger DNA und Gewebeschäden kommt (Giuranno, Ient, De Ruyscher, and Vooijs 2019).

Aber auch Faktoren wie genetische Prädisposition, Alter, Geschlecht und Komorbiditäten wie kardiovaskuläre Vorerkrankungen, vorbestehende Bindegewebserkrankungen oder Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (rheumatoide Arthritis, systemische

Sklerodermie, Lupus Erythematoses, Marfan Syndrom) können für die Entstehung von strahleninduzierter Lungenfibrose empfänglich machen.

2.3.3 Symptomatik

Häufige erste Symptome sind eine progrediente Belastungsdyspnoe und ein stetiger, trockener Reizhusten. Zusätzlich kommt es zu einer geringeren körperlichen Belastbarkeit, subfebrilen Temperaturen, ein Anstieg der Atemfrequenz sowie Kraftlosigkeit. Im späteren Verlauf kann sich eine chronische Hypoxie entwickeln, die am Erkrankten durch Trommelschlägelfinger und Uhrglasnägel zusätzlich sichtbar werden kann. Uhrglasnägel sind vergrößerte, rundlich geformte Nägel mit starker Wölbung nach außen. Trommelschlägelfinger zeigen sich durch kolbenförmig aufgetriebene Fingerendglieder. Als Ursache dieser Erscheinungen wird die Stimulation von Wachstumsfaktoren durch die Hypoxämie in den distalen Akren vermutet (Dubrey S, 2016).

Bei einer stark ausgeprägten Fibrose kann sich ein Cor pulmonale, also eine rechtsventrikuläre Hypertrophie oder Dilatation entwickeln. Die Ursache hierfür ist die Widerstandserhöhung im Lungenkreislauf. Weitere Spätfolgen sind eine Pleuraverdickung, bronchiale Stenosen und Bronchiektasien. Bei letzteren handelt es sich um irreversible, sackförmige Ausweitungen der großen Bronchien welche zu einer vermehrten Ansammlung von Bronchialsekret führen.

2.3.4 Diagnostik

Sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase nach der Bestrahlung der Lunge fehlen klinische Zeichen oder sind minimal (Davis et al., 1992). Auskultatorisch kann ein beidseitiges inspiratorisches Knisterrasseln auftreten, bei fortgeschrittener Lungenfibrose imponiert hingegen ein lautes „Korkeiben“. Die Lungenfunktion wird evaluiert, indem in verschiedenen Lungenfunktionstests, wie der Spirometrie oder der Ganzkörperplethysmographie bestimmte Parameter bewertet werden. Hierzu gehören das forcierte expiratorische Volumen (FEV), die forcierte Vitalkapazität (FVC), die Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenstoffmonoxid und die Vitalkapazität (VC). Wichtig ist die Verlaufsbeobachtung vor und nach der Bestrahlung (Giuranno et al., 2019). In der Blutgasanalyse wird bei manifester Lungenfibrose ein erniedrigter partieller Sauerstoffgehalt (pO₂) erkennbar. In aufeinanderfolgenden Lungenfunktionsprüfungen zeigt sich eine restriktive Ventilationsstörung, die sich durch ein hochstehendes Zwerchfell und einen

plötzlichen Einatemstopp bei tiefer Inspiration äußert. Die restriktive Ventilationsstörung zeigt sich in der Lungenfunktionsdiagnostik durch eine Abnahme der Compliance, der Vitalkapazität (VC) und des Residualvolumens (RV) und somit zur Abnahme der totalen Lungkapazität (TLC, Summe aus VC und RV).

Diese Veränderungen sind in den Lungenfunktionsprüfungen erstmals nach 2-3 Monaten messbar. Ihr Maximum wird nach 4-6 Monaten erreicht. Nach 8 Monaten normalisieren sich diese jedoch wieder. Nach 5 Monaten sinkt die expiratorische Einsekundenkapazität (FEV_1), während der Tiffeneau-Index unverändert bleibt. Nach 8 Monaten steigt die FEV_1 wieder an. Nach 12 Monaten gibt es kleinere Defizite der totalen Lungkapazität und der inspiratorischen Kapazität, die die bereits eingetretene Fibrosierung der Lunge widerspiegeln. Der beste prädiktive Wert der Lungenfunktionsprüfung nach Strahlentherapie ist allerdings die Messung der CO Diffusionskapazität, die das Risiko des strahleninduzierten Lungenleidens prognostizieren kann. Die Diffusionskapazität fällt um 20-60% in den ersten 3-5 Monaten nach der Bestrahlung. Dies ist durch die Verlängerung der alveokapillären Diffusionsstrecke bedingt. Zudem korreliert die Veränderung der Diffusionskapazität mit dem Volumenverlust von Gewebe, das am Gasaustausch beteiligt ist. Fokale Veränderungen in der Lunge können die Ergebnisse eines Lungenfunktionstest allerdings nicht widerspiegeln. Bei Patienten mit Bronchialkarzinom kann sich die Lungenfunktion nach einer Strahlentherapie des Primärtumors verbessern (Van den Brenk, 1971).

Auch der maximale Sauerstoffverbrauch sinkt bei einigen Patienten signifikant. In Langzeit-Follow-up-Studien von über 12 Monaten zeigten 12 von 50 Patienten (24%) ein höheres max. Sauerstoffverbrauchsdefizit (Movsas et al., 1997).

Lange Zeit war die Thoraxsummationsaufnahme im planaren Röntgen die übliche Methode, strahleninduzierte Veränderungen in der Lunge auf pathologische Veränderungen zu untersuchen. Erste radiologische Veränderungen der akuten Bestrahlungspneumonitis zeigen sich 4-8 Wochen nach der Strahlentherapie und können sehr subtil sein. Diese können sich durch eine leichte Unschärfe um Gefäße, hochstehende Hemidiaphragmen, eine schwache milchglasartige Trübung (als Ausdruck des interstitiellen Ödems) oder in stärkerer Ausprägung mit fleckiger oder homogener Zusammenballung der Alveolen zeigen (Sigmund, Slanina, & Hinkelbein, 1993). In der proliferativen Phase werden eine verstärkte, unscharfe interstitielle Zeichnung sowie fleckförmige, teilweise konfluierende Infiltrate sichtbar. Bei der akuten Strahlenpneumonitis kann sich auf der bestrahlten Seite auch ein Pleuraerguss entwickeln.

Obwohl sich auch die radiologischen Befunde komplett auflösen können, tritt bei schwerwiegenden Veränderungen gewöhnlich eine Progression zur Fibrose auf. 9-12 Monate nach abgeschlossener Behandlung bildet sich die strahleninduzierte Lungenfibrose aus. Die Fibrose wird sichtbar durch weitere streifige Trübungen im Sinne einer retikulären Zeichnungsvermehrung, Volumenverlust der Lunge, Bronchiektasien oder Pleuraverdickung auf der betroffenen Seite. Wenn die Parenchymtrübungen minimal sind, können narbige Veränderungen das einzige Zeichen einer Fibrose sein. Die chronischen fibrösen Kontraktionen, die durch die narbigen Veränderungen ausgelöst werden, können jedoch zu Atelektasen, einer mediastinalen Verschiebung, pleuro- bzw. perikardialen Adhäsionen oder einer Vernarbung des Zwerchfells führen. Wie bei anderen fibrosierenden Lungenerkrankungen können auch weitere Komplikationen wie ein Spontanpneumothorax, Pneumonien oder Aspergillome auftreten und radiologisch sichtbar werden. Sowohl akute als auch chronische Veränderungen im Röntgen-Thorax sind typischerweise, wenn auch nicht immer, beschränkt auf das Bestrahlungsfeld, ohne dass anatomische Grenzen dabei beachtet werden.

Die Computertomographie ist jedoch sensitiver als das Röntgen und zeigt das Verteilungsmuster der fibrotischen Veränderungen präziser (Park et al., 2000). Im CT zeigen sich irreguläre Verdickungen interlobulärer Septen, Waben, eine Verdickung der Pleura, Bronchiektasien und ein Volumenverlust. Im Verlauf von Monaten bis Jahren zeichnen sich die Infiltrate durch fibrotische Schrumpfungsprozesse streifenförmig-retikulär aus. Die Lungenstrukturen werden durch narbige Veränderungen verzogen, was zur Verlagerung von Gefäßen, Fissuren und bei ausgeprägter Fibrose zu einer Verlagerung der Mediastinalorgane führen kann. Die akut auftretende Pneumonitis kann von anderen interstitiellen pulmonalen Erkrankungen durch die typische Lokalisation im Bestrahlungsfeld und den zeitlichen Zusammenhang zur Radiotherapie differenziert werden. Die Diagnose mittels Computertomographie ist wegen ihrer hohen Sensitivität das Verfahren der Wahl (Davis et al., 1992).

Form und Verteilung der strahleninduzierten Veränderungen hängen darüber hinaus von der Bestrahlungsmethode ab. Diese sollte bei der Diagnosestellung bekannt sein, um eine weitere Differenzierung zu erleichtern. Das radiologische Bild und der klinische Befund korrelieren nur gering, weil die Symptomatik v.a. durch das betroffene Lungenvolumen und die Funktion des verbleibenden Lungenvolumens bestimmt wird. Die radiologisch sichtbare Pneumonitis stützt die klinische Diagnose, sollte aber nicht mit ihr gleichgesetzt werden. Als weitere Diagnostik stehen auch die Bronchioalvöläre Lavage oder die transbronchiale Biopsie zur Verfügung.

2.3.5 Epidemiologie

10% aller Patienten mit Bestrahlung aufgrund eines Mammakarzinoms sind von einer klinisch manifesten Pneumonitis betroffen, während radiologische Veränderungen bei bis zu 40% aller Behandlungsfälle beobachtet werden können. Trotz des zunehmenden Einsatzes hochpräziser Bestrahlungstechniken erleiden bis zu 15% der Patienten nach Brustbestrahlung eine klinisch manifeste Pneumonitis und konsekutiv eine Lungenfibrose. In bis zu 66% aller Fälle können radiologische Veränderungen beobachtet werden. Bei Bestrahlungen des Mediastinums ist kaum mit der Entwicklung einer klinisch manifesten Pneumonitis zu rechnen, obwohl sehr oft radiologische Veränderungen zu beobachten sind. Insgesamt ist seltener mit einer Entwicklung einer strahleninduzierten Lungenfibrose als mit einer strahleninduzierten Pneumonitis zu rechnen.

Als Schätzwert für das Risiko der Entwicklung einer strahleninduzierten Lungenschädigung kann das prozentuale Lungenvolumen, das eine Strahlendosis von mehr als 20 Gy erhält (V20), herangezogen werden. Beträgt dieser Anteil weniger als 20% des gesamten Lungenvolumens, ist in der Regel keine Pneumonitis zu beobachten. Beträgt der V 20-Anteil 22-31%, ist bei 8% aller Patienten mit der Entwicklung einer Pneumonitis zu rechnen. Bei einem V20-Anteil von mehr als 35% ist bereits mit fatalen Fällen zu rechnen. Dieser Wert sollte daher nicht überschritten werden (Matthys, 2008).

2.3.6 Klassifikation

Zur Klassifikation und Dokumentation des Schweregrades der Lungenfibrose werden mehrere Klassifikationen eingesetzt. Entsprechend eines internationalen Konsens soll die Klassifikation der (sub-)akuten und späten Lungenreaktion nach den Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE v3) erfolgen (Trotti et al., 2003).

Grad 1	Milde Hypoxämie; radiologische Lungenfibrose < 25% des Lungenvolumens
Grad 2	Moderate Hypoxämie; Evidenz von pulmonaler Hypertonie; radiologische Lungenfibrose 25-50%
Grad 3	Schwere Hypoxämie; Evidenz von Rechtsherzinsuffizienz; radiologische Lungenfibrose 50-75%
Grad 4	Lebensbedrohliche Folgen; Intubation mit Ventilationsupport notwendig; radiologische Lungenfibrose > 75% mit schwerem Honeycombing
Grad 5	Tod

Tabelle 1: Lungenfibrose - CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) Version 3 - Kriterien des Thoraxbereichs

Das Late Morbidity Scoring Schema wurde in den 1980er Jahren von Mitgliedern der Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) und Ärzten entwickelt. Hierbei wurden Kriterien festgelegt, welche die Bewertung von möglichen Spätfolgen der Strahlentherapie ermöglichen sollten (Cox, 1995).

Grad 0	Keine Symptome
Grad 1	Asymptomatisch oder milde Symptome (trockener Husten), wenige Auffälligkeiten in der Bildgebung
Grad 2	Moderate symptomatische Fibrose oder Pneumonitis (schwerer Husten), niedriggradiges Fieber, fleckige Auffälligkeiten in der Bildgebung
Grad 3	Schwere symptomatische Fibrose oder Pneumonie, dichte Veränderungen in der Bildgebung
Grad 4	Schwere Ateminsuffizienz, kontinuierliche Sauerstoff / Assistierte Beatmung
Grad 5	Tod

Tabelle 2: RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) Late Radiation Morbidity Scoring Schema

2.3.7 Differentialdiagnosen

Von großer differentialdiagnostischer Bedeutung ist die Unterscheidung der akuten und chronischen Strahlenschäden von Rezidiven. Kriterien, die für ein Rezidiv sprechen, sind ein Intervall von über vier Monaten zwischen Strahlentherapie und Diagnose, vorhandene Metastasen, stetige Progression von radiologischen Anomalien und Symptomen, Veränderungen außerhalb des Bestrahlungsfelds, eine Anämie, Hämoptysen und eine vorherige Dokumentation von Tumorwachstum. Hinweise für eine lymphogene Tumorausbreitung und Metastasierung sind Veränderungen in der Lungenbasis, Septumlinien im Röntgenbild, Symptome, die sich schwerwiegender präsentieren als dem Röntgenbefund zufolge zu erwarten wäre, und signifikante Veränderungen in aufeinanderfolgenden Radiographien.

Allerdings müssen differentialdiagnostisch auch nicht-onkologische Diagnosen wie Infektionen ausgeschlossen werden. Kriterien, die für eine infektiöse Genese sprechen, sind positive Kulturen, eine lobäre bzw. anatomische Verteilung der Lungenveränderungen in der Radiographie und ein persistierendes, bzw. hohes Fieber. Neben den typischen viralen und bakteriellen Erregern muss bei immunsupprimierten Patienten zusätzlich an *Pneumocystis carinii* gedacht werden. Möglich ist auch eine durch die Bestrahlung verursachte Reaktivierung einer Tuberkulose. Außerdem kommen auch chemische Noxen als Differentialdiagnose in Frage, so etwa durch Chemotherapeutika oder durch Aspiration oder Inhalation von Toxinen (Movsas et al., 1997).

2.3.8 Therapie

Nach wie vor existieren keine größeren kontrollierten Studien, die die Effektivität eines bestimmten Therapieansatzes bei der strahleninduzierten Lungenfibrose nahelegen. Da die strahleninduzierte Lungenfibrose medikamentös nicht beeinflusst werden kann, stützt sich die Therapie hauptsächlich auf der Einhaltung des Dosis-Volumen-Constraints und auf das Verhindern von aggravierenden Faktoren. Dazu gehört das Vermeiden von Alkoholabusus und Tabakkonsum, eine strikte Diabeteseinstellung, eine strikte Blutdruckkontrolle, zügige antibiotische Behandlung bei Infektionen und die Vermeidung von Chemotherapie und chirurgischem Trauma durch Eingriffe oder Biopsien. Zwar ist bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern eine geringere akute entzündliche Reaktion der Lunge zu beobachten, möglicherweise aufgrund der veränderten Immunantwort. Dennoch wird Nikotinkarenz dringend empfohlen, um die Lungenfunktionsreserve nicht zu beeinträchtigen (Theuws et al., 1999).

80% der Patienten zeigen Wirkung auf die intravenöse Gabe von Corticosteroiden. Hat sich die Fibrose allerdings erst einmal ausgebildet, helfen Corticosteroide nicht mehr. Sie dienen lediglich dazu, die akuten Symptome der vorangehenden Pneumonitis zu erleichtern und helfen, den Todesfall zu verhindern. Dennoch helfen selbst hohe Dosen nicht, die unaufhaltsame Progression zur Fibrose aufzuhalten.

Des Weiteren können Therapieversuche mit Pentoxifyllin oder hyperbarem Sauerstoff durchgeführt werden. Auch Antioxidanzien wie Superoxiddismutase, Tocopherol (Vitamin E) oder eine Kombination von Pentoxifyllin und Vitamin E können zum Einsatz kommen.

Unterstützend wirken zudem Atemgymnastik, allgemeintherapeutische Maßnahmen, die Inhalation von β -Sympathomimetika und die Einnahme von Expektorantien. Bei schweren Verläufen sind die Gabe von Sauerstoff, eine assistierte Beatmung und eine medikamentöse Prophylaxe des Rechtsherzversagens erforderlich.

Zur Behandlung der idiopathischen Lungenfibrose ist aktuell das Medikament Nintedanib zugelassen. Es handelt sich hierbei um einen Tyrosinkinase-Inhibitor und Angiokinasehemmer, der die Rezeptoren für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und den Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) blockiert. Er wirkt anti-fibrotisch und entzündungshemmend. In einer präklinischen Studie aus dem Jahr 2017 wurde die Wirksamkeit von Nintedanib in einem Mausmodell mit partieller Bestrahlung der

Lunge nichtinvasiv bewertet, um einer strahleninduzierten Lungenfibrose vorzubeugen. Es zeigte sich, dass Nintedanib die strahleninduzierte mikroskopische Lungenfibrose reduziert, dies jedoch nicht durch CT-Bildgebung überwacht werden kann (De Ruyscher et al., 2017).

2.4. Bildgebungsprinzipien

2.4.1 Phasenkontrastbildgebung

Bei der gitterbasierten Röntgen-Phasenkontrastbildgebung handelt es sich um eine interferometrische Technik, die Gitter benutzt um einen eindimensionalen Phasengradienten zu bestimmen. Um das Potential der Phasenkontrastbildgebung als vielversprechendes diagnostisches Werkzeug zu zeigen, muss man sie im Zusammenhang mit den bisher benutzten Bildgebungsqualitäten einordnen. Die herkömmliche Computertomographie, die im klinischen Alltag genutzt wird, bietet eine hohe räumliche Auflösung im submillimeter Bereich und ermöglicht eine schnelle Bildgebung innerhalb von Sekunden. Allerdings besitzt sie nur einen niedrigen Weichteilkontrast. Die ebenfalls weit verbreitete Magnetresonanztomographie bietet einen hohen Weichteilkontrast und setzt den Patienten keiner Strahlenbelastung aus. Hier ist jedoch das Problem, dass das MRT keine Möglichkeit zur Dosisberechnung bietet. Das liegt daran, dass das MRT-Bild keine physikalischen Informationen enthält, die für die Dosis relevant sind. Hinzu kommt eine längere Bildgebungsdauer (im Minutenbereich) und deutlich höhere Kosten.

Die gitterbasierte Röntgen-Phasenkontrast-Bildgebung kombiniert die Vorteile der beiden vorher angesprochenen Bildgebungsmodalitäten, wie die hohe räumliche Auflösung des CTs und den hohen Weichteilkontrast des MRTs, indem es die Aufnahme von drei verschiedenen Bildgebungsmodalitäten erlaubt. Allerdings ist hierbei anzumerken, dass die Anwendung der Phasenkontrastbildgebung derzeit noch auf Kleintiere beschränkt ist, da die speziellen Gitter nur bis zu einer Größe von 10cm hergestellt werden können. Mit verschiedenen Aufschlüssen über die Gewebseigenschaft werden mit der gitterbasierten Phasenkontrastbildgebung in nur einem Bildgebungsprozess drei Bildgebungsmodalitäten geliefert.

Ein Absorptionsbild entsteht durch die Messung der Abschwächung und Dämpfung der Röntgenstrahlenintensität. Ein Phasenkontrastbild entsteht durch die Messung der Refraktionswinkel der Röntgenstrahlen. Hier werden der Weichteilkontrast und die Gewebekanten verstärkt dargestellt. Dies führt zu einer guten Darstellung der inneren Organe. Eine weitere Bildgebungsmodalität ist das Dunkelfeldbild, das wir in unserer Studie benutzt

haben. Es basiert auch auf der Refraktion der Röntgenstrahlen, aber die deutlich kleineren Brechungswinkel die den Kontrast im Dunkelfeldbild generieren, werden als Streuung bezeichnet. Das Dunkelfeldbild misst die granuläre Beschaffenheit verschiedener Strukturen, bei denen es durch die vermehrten Gewebsübergänge zu einer verstärkten Streuung kommt. Dadurch eignet es sich sehr gut zur Bildgebung der Lunge, die aus vielen Alveolen besteht und so ein starkes Dunkelfeldsignal erzeugt (Weber et al., 2012).

Da die Refraktionswinkel von Röntgenstrahlen extrem klein sind (im Bereich von Mikrograd), ist die Brechung im konventionellen Röntgen- bzw. CT-Bild nicht sichtbar. Um ebendiese Brechungswinkel zu messen, braucht man einen räumlichen Bezug, um die Brechung zu bestimmen. Dazu muss in dem Bereich ein Referenzmuster benutzt werden. Die lokale Brechung der Röntgenstrahlen im Objekt funktioniert durch eine lokale seitliche Verschiebung dieses Referenzmusters. Ein Gitterinterferometer kann diese lokale seitliche Verschiebung messen. Es benutzt einen Interferenzeffekt, um das Referenzmuster zu bilden, welches durch räumlich kohärente Beleuchtung einer periodischen Gitterstruktur erzeugt wird. Hierbei tritt der Talbot-Selbstabbildungs-Effekt auf. Dieser besagt, dass wenn eine ebene, monochromatische Welle auf ein Gitter fällt, so erzeugt sie in regelmäßigen Abständen Selbstabbildungen des Gitters.

Er basiert auf dem Huygensschem-Prinzip und der Wellenausbreitung im freien Raum. Dieses besagt, dass jeder Punkt einer Wellenfront als Ausgangspunkt einer neuen Welle, der so genannten Elementarwelle, betrachtet werden kann. Die neue Lage der Wellenfront ergibt sich durch Überlagerung (Superposition) sämtlicher Elementarwellen. Wenn die räumliche Frequenz des Referenzmusters ausreichend klein ist, können diese kleinen lateralen Verschiebungen, die durch die Brechung entstehen, genau gemessen werden.

Bei der Phasenkontrastbildgebung wird zudem ein zweites Gitter verwendet, welches die refraktionsinduzierten lokalen Änderungen im Referenzmuster räumlich auflöst. Bei inkohärenter Strahlung (aus konventionellen Röntgenquellen) muss ein drittes Gitter verwendet werden. Dieser Aufbau wird dann Talbot-Lau-Interferometer genannt. Der Aufbau ist wie folgt: Röntgenquelle - Quellengitter (G0) - Probe - Phasengitter (G1) - Analysegitter (G2) – Bildgebungsdetektor (Abbildung 4).

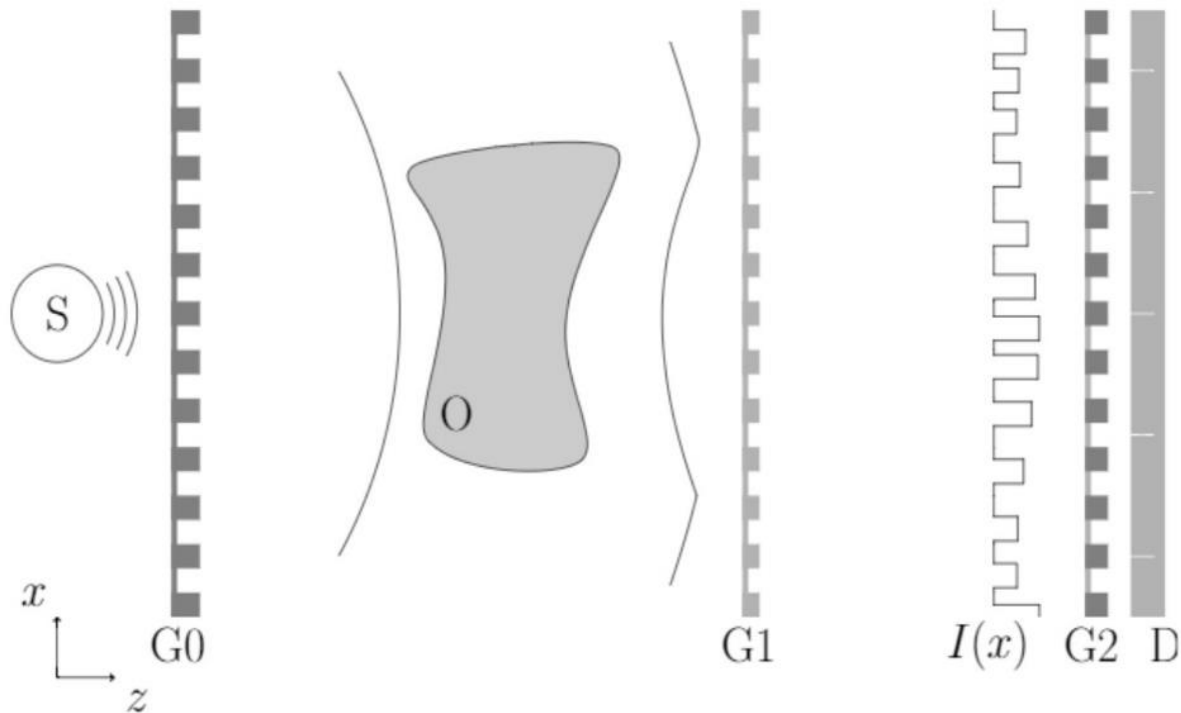


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Talbot-Lau-Interferometers zur Phasenkontrastbildung: Röntgenquelle (S) - Quellgitter (G0) -Probe (O) - Phasengitter (G1) - Analysegitter (G2) - Bildgebungsdetektor (D) (Weber et al., 2012)

Eine geometrische Vergrößerung resultiert aus der Divergenz des Strahls und tritt abhängig von der Entfernung von Quelle, Probe, Gittern und Detektor auf. Daraus kann eine Parallelstrahlengemetrieenanordnung oder Kegelstrahlengemetrieenanordnung resultieren (Tapfer, Bech, & Pfeiffer, 2013).

2.4.2 Skyscan 1190 Phasenkontrast MicroCT

Als Bildgebungsgerät haben wir bei unseren Versuchen einen Prototypen verwendet (SkyScan 1190, Bruker microCT, Kontich, Belgien). Dieses ist zur Röntgen-Phasenkontrastbildung fähig. Es besteht aus dem zuvor beschriebenen Talbot-Lau Interferometer, das an der Gantry des microCT Scanners angebracht ist. Die Gantry mit der Quelle, die Gitter und der Detektor rotieren um das fixe Mausbett.

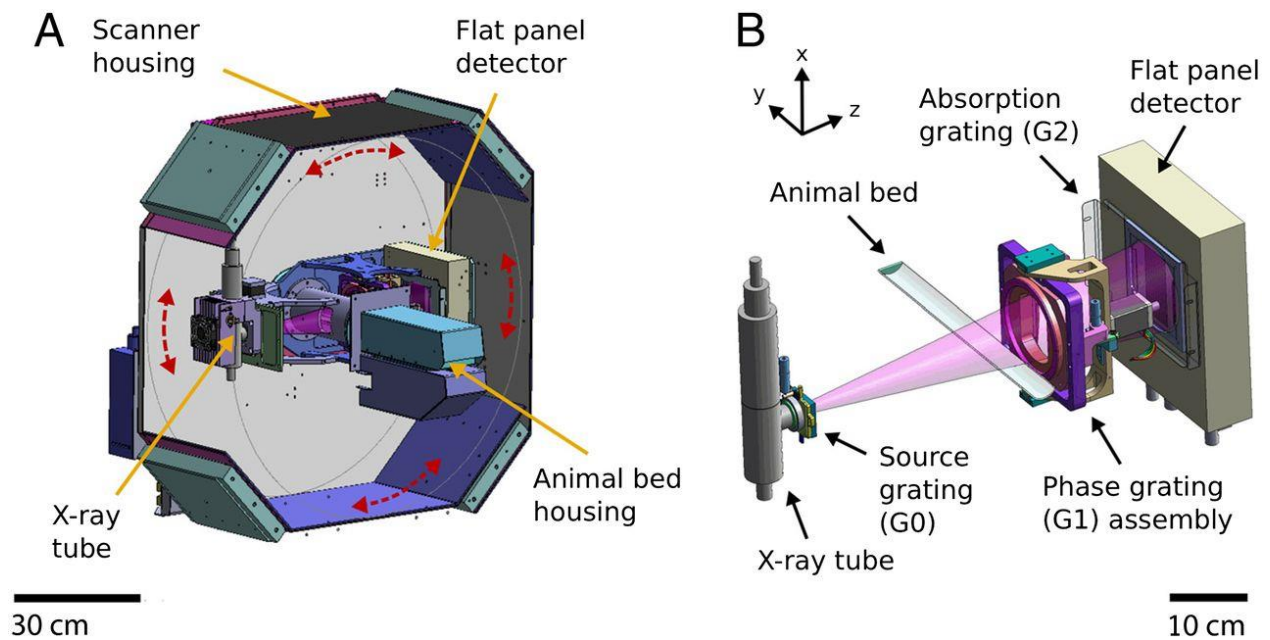


Abbildung 5: a) Scannergehäuse mit rotierender Gantry (Bewegungsausmaß durch rote Pfeile gekennzeichnet). Die Gantry enthält die Röntgenröhre an einem Ende und den Flachbilddetektor am anderen Ende und ist in der angezeigten Ansicht horizontal ausgerichtet. Die Gesamtmaße des Scannergehäuses betragen ca. 95 cm Breite, 100 cm Höhe und 85 cm Tiefe. b) Aufbau des rotierenden Gantries mit Röntgenquelle, Gittern (G0, G1, G2), Mausbett und Detektor. (Tapfer et al. 2012)

Der Scanner ist ein Tischgerät, das mit einer drehbaren mechanischen Gantry und einem stationären Probenstisch in Form eines Tierbettes ausgestattet ist. Das Setup-Design ist einzigartig, da in bestehenden Phasenkontrast-Setups normalerweise die Probe für die tomografische Bildaufnahme gedreht wird. Die rotierende Gantry umfasst einen Flachbilddetektor (Hamamatsu C9312SK-06), bestehend aus einem Gadolinium oxysulfat Szintillator und einer gekühlten 12-bit CCD Kamera mit 2496×2304 Pixeln und $50 \mu\text{m}$ Pixelgröße, eine Röntgenröhrenquelle mit Mini-Fokus (RTW, MCBM 65B-50 W, Neuenhagen, Deutschland) mit einem Wolframtarget und einem Brennfleckdurchmesser von ungefähr $50 \mu\text{m}$ und einem Talbot-Lau-Interferometer. Die drei Gitter des Interferometers, hergestellt von microworks, Karlsruhe, werden durch die folgenden Gitterstabmaterialien, Gitterstabhöhen und Gitterstabperioden beschrieben:

		Material	Gitterhöhe	Gitterperiode
Quellengitter	G0	Gold	$35 \mu\text{m}$	$10 \mu\text{m}$
Phasengitter	G1	Nickel	$4.0 \mu\text{m}$	$3.24 \mu\text{m}$
Analysegitter	G2	Gold	$45 \mu\text{m}$	$4.8 \mu\text{m}$

Tabelle 3: Gitterstabmaterialien, -höhen und -perioden der drei Gitter des Interferometers

Das Quellengitter ist mit einem Piezoschrittmotor ausgestattet und kann bewegt werden, um die Phasenschrittkurve zu erfassen. Das Phasengitter ist motorisiert, um in eine der drei Richtungen bewegt zu werden, und kann auch in zwei Richtungen geneigt und gedreht werden, um eine ordnungsgemäße Ausrichtung der Gitter zu ermöglichen. Die Abstände zwischen der Röntgenquelle und G0, G0 und G1 und G1 und G2 betragen 31 mm, 300 mm bzw. 145 mm. Daher wird das Interferometer im ersten Talbot-Abstand betrieben und für eine Auslegungsenergie von 23 keV eingerichtet. Das Phasengitter ist so ausgelegt, dass Röntgenstrahlen dieser Energie eine Phasenverschiebung von $\pi / 2$ ausgesetzt werden. Quelle und Probe haben einen Abstand von 270 mm, während Probe und Detektor einen Abstand von 200 mm haben. Die Kegelstrahlgeometrie führt zu einer effektiven Pixelgröße der Probe von etwa 30 μm . Der Scanner ermöglicht die Überwachung der Atembewegung, des Herzschlags und der Temperatur per Videoaufzeichnung und ermöglicht so in-vivo-Experimente an kleinen Nagetieren. Ein ebenfalls eingebauter Warmluftventilator kann zur Stabilisierung der Körpertemperatur betäubter Tiere genutzt werden. Die Bilder werden mit der dazugehörigen Skyscan-Steuerungssoftware erfasst, die schrittweise Reihen von Rohprojektionsbildern vom Datentyp TIFF (Tagged Image File Format), einer textbasierten Hauptprotokolldatei mit den zugehörigen Erfassungsparametern des Scans und einer zusätzlichen textbasierten Protokolldatei zur Erfassung der Systemtemperatur im Verlauf des Scans (Bartl, 2010; Velroyen, 2015; Yaroshenko et al., 2015).

Da für die Aufnahme eines In-Vivo CTs die Mäuse in Narkose versetzt werden müssen, beschränkt diese die Aufnahmezeit. Das maximale Zeitlimit für eine Aufnahme beträgt somit etwa vierzig Minuten. Die Zeit T, die für eine Tomographie gebraucht wird, ist zudem durch die folgende Gleichung gegeben: $T=2Nnt_{\text{exp}}$. Die Expositionszeit t_{exp} von 2 Sekunden und das Zeitlimit für T begrenzen jedoch die Menge an Phasenschritten n, die pro Winkel benutzt werden können und die Anzahl der Winkel N selbst.

3. Methoden

3.1 Versuchsplanung und Durchführung

Die Tierversuche wurden nach deutschem Tierschutzgesetz durchgeführt. Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde von der Regierung Oberbayern genehmigt (Tierversuchsnummer 77-2016). 24 Mäuse wurden mit der Strahlendosis von 20 Gy in drei verschiedenen Strahlenfeldern bestrahlt (siehe Abbildung 6). Diese waren: gestamte rechte Lunge, obere rechte Lunge, untere rechte Lunge. Hierbei wurde die linke Lunge von der Bestrahlung ausgespart um im späteren Verlauf des Versuchs gesundes Lungengewebe zum Vergleich zu haben. Hinzu kam eine Kontrollgruppe von unbestrahlten Kontrollmäusen, sodass es vier Versuchsgruppen mit jeweils sechs Mäusen gab.

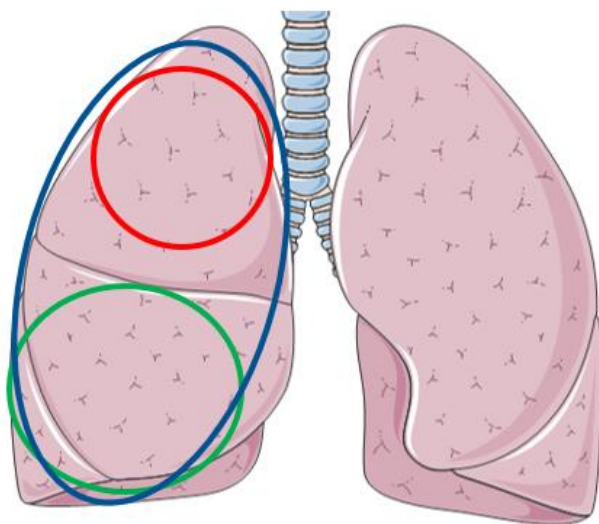


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verschiedenen Bestrahlungsfelder der rechten Lunge: rechte Lunge oben (rot), rechte Lunge unten (grün) und gesamte rechte Lunge (blau).

Vor der Bestrahlung und dem Planungs-CT erfolgte zum Vergleich eine Bildgebung mit Skyscan. Anschließend wurde die Bildgebung mit dem Skyscan in einem Abstand von vier Wochen nach der Bestrahlung kontinuierlich wiederholt.

3.2 Mäuse

Für den Versuch wurden warmblütige Säugetiere benötigt, sodass hierzu Mäuse der Tierart C57BL/6 (www.criver.com) ausgewählt wurden. Bei dieser Art von Mäusen ist bereits bekannt, dass sie besonders strahlenempfindlich sind und eine Bestrahlung des Thorax eine Lungenfibrose hervorruft (Walkin, 2013).

Da Mäuse Gruppentiere sind, wurden sie in speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Maushaltung (Typ- I Superlong; Grundfläche 16 x 37 cm²) gehalten. Hierbei waren bis zu

maximal fünf Mäuse in einem Käfig, was der Anforderung der EU-RL 2010/63 entspricht. Futter (autoklaviertes Mäusefutter, Fortified gepudert, 10 mm Vierkant, pelletiert, Haltungsfutter No. 1324FORT und Zuchtfutter No. 1314FORT, Fa. Altromin) und Wasser (autoklaviertes Trinkwasser bei einmaligem Flaschenwechsel pro Woche) erhielten die Tiere ad libitum. Der Käfig wurde mit speziellem Holzgranulat (Select Fine, Ssniff) ausgelegt und 1-2 Mal pro Woche gewechselt. Den Mäusen wurde ein Maushaus aus rotem Polycarbonat (Bioscape) und zudem Nestbaumaterial als autoklavierter Zellstoff und sog. Nestlets (Bioscape) zur Verfügung gestellt. Die Tierhaltungsräume waren ausgestattet mit einer Klimatisierung, verfügten über eine personenlimitierte Zugangskontrolle und wurden in einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je zwölf Stunden mit Dämmerphase beleuchtet. Des Weiteren wurden für den Versuch nur weibliche Tiere verwendet, um so Rangordnungs- und Revierkämpfe zu vermeiden.

Die Tiere waren zum Lieferzeitpunkt 6-7 Wochen alt und hatten anschließend eine Adaptationszeit von mindestens einer Woche vor Versuchsbeginn. Folglich betrug das Mindestalter der Mäuse bei Versuchsbeginn 8 Wochen. Die Tiere wurden mit einer Ohrmarkierung gekennzeichnet.

Die Anästhesie der Tiere für die Bildgebung mittels Skyscan erfolgte durch vollständig antagonisierbare Anästhesie mit MMF (Medetomidin 0,50 mg/kg, Midazolam 5,0 mg/kg, Fentanyl 0,05mg/kg) als intraperitoneale Injektion. Nach der durchgeführten Bildgebung im Skyscan wurde die MMF Narkose mit AFN (Atipamezol 2,5 mg/kg, Flumazenil 0,5mg/kg, Naloxon 1,2 mg/kg) als subcutane Injektion antagonisiert. Die Anästhesie bei dem CT für die Bestrahlungsplanung und die lokale Bestrahlung der Lunge erfolgte mittels dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (2-3 Volumenprozent), das über eine spezielle Verneblungsanlage für Kleintiere appliziert wurde.

Die Mäuse wurden 1-2 Mal wöchentlich von Tierpflegern begutachtet und gegebenenfalls gewogen, um auf diese Weise die Folgen einer Schädigung nach der Bestrahlung möglichst früh zu erkennen. Außerdem wurden die Mäuse monatlich vor jeder Bildgebung vom Experimentator regulär begutachtet und gewogen. Das mit der Waage ermittelte Gewicht, der Gewichtsverlauf sowie Wohlbefinden, Zustand und Verhalten der Tiere wurden für jede Maus individuell dokumentiert. Die Tierversuche für die Studie wurden gemäß deutschem Tierschutzgesetz (Tierschutzgesetz, Tierschutz-Versuchstierverordnung) durchgeführt. Die Euthanasie der Tiere erfolgte nach der letzten Bildgebung durch Betäubung mit Isofluran und zervikale Dislokation.

3.3 Bestrahlung

Die lokale Strahlentherapie der Lunge und die für die Bestrahlungsplanung nötige Bildgebung wurden am SARRP (Small Animal Radiation Research Platform, xstrahl Ltd, Camberley, Vereinigtes Königreich) durchgeführt.

Das SARRP besteht aus einer Röntgenquelle, die auf einer motorisierten Gantry montiert ist, einem Flachbilddetektor für CT und einem Mausbett auf einer automatisch beweglichen Plattform, sodass das Tier darauf rotiert und positioniert werden kann (Wong et al., 2008).

Die Gantry ist motorisiert und kann automatisch um 360° rotiert werden. Die darauf montierte Röntgenquelle des SARRP ist 35 cm vom Isozentrum entfernt. Sie verwendet zwei Brennflecke, einen von 3,0 mm zur Bildgebung und einen von 0,4 mm zur Bestrahlung, und ist sowohl für die Bildgebung als auch für die Bestrahlung geeignet. Es handelt sich hierbei um eine Varian Röntgenquelle (Varian Medical Systems, Palo Alto, USA) mit 225 kVp. Es handelt sich hierbei um eine Wolfram-Röntgenquelle.

Das Bilderfassungssystem des SARRP ermöglicht die Aufnahme von einem Cone-Beam CT (CBCT). Hierzu wird die Röntgenquelle auf eine Position von 90° gefahren. Der Flachbilddetektor (XRD 0822, Perkin Elmer, Waltham, USA) ist auf der gegenüberliegenden Wand befestigt. Er hat eine Fläche von $20,5 \times 20,5 \text{ cm}^2$ (1024x1024 Pixel) und ist 26 cm vom Isozentrum entfernt, wodurch sich ein Bildvergrößerungsfaktor von 1,3 ergibt. Im Gegensatz zum konventionellen CT Aufbau verwendet man im SARRP eine Geometrie, in der die Maus vertikal rotiert wird, während die Röntgenquelle und der Detektor fixiert sind. Durch das integrierte CT ist eine hoch präzise CT-gesteuerte Bestrahlung möglich (Abbildung 7).

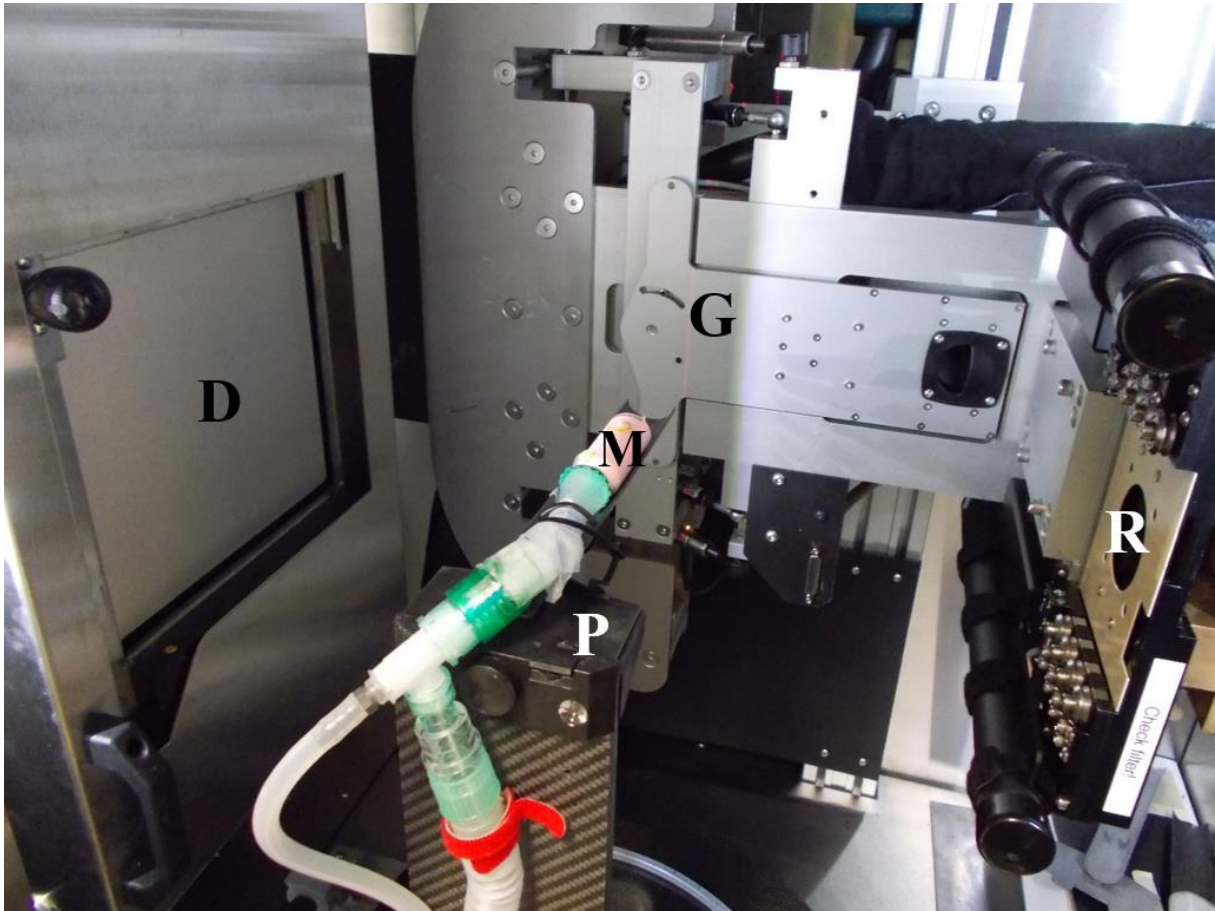


Abbildung 7: Zu sehen ist der Aufbau des SARRP zur Bildgebung einer Maus. Zu erkennen ist die Gantry (G), auf der die Röntgenquelle (R) befestigt ist. Die Maus (M) befindet sich hierbei auf dem Mausbett mit einer Vernebelungsanlage zur Narkose, das auf einer verschiebbaren und rotierbaren Plattform montiert ist. Der Detektor (D) befindet sich gegenüber der Röntgenquelle.

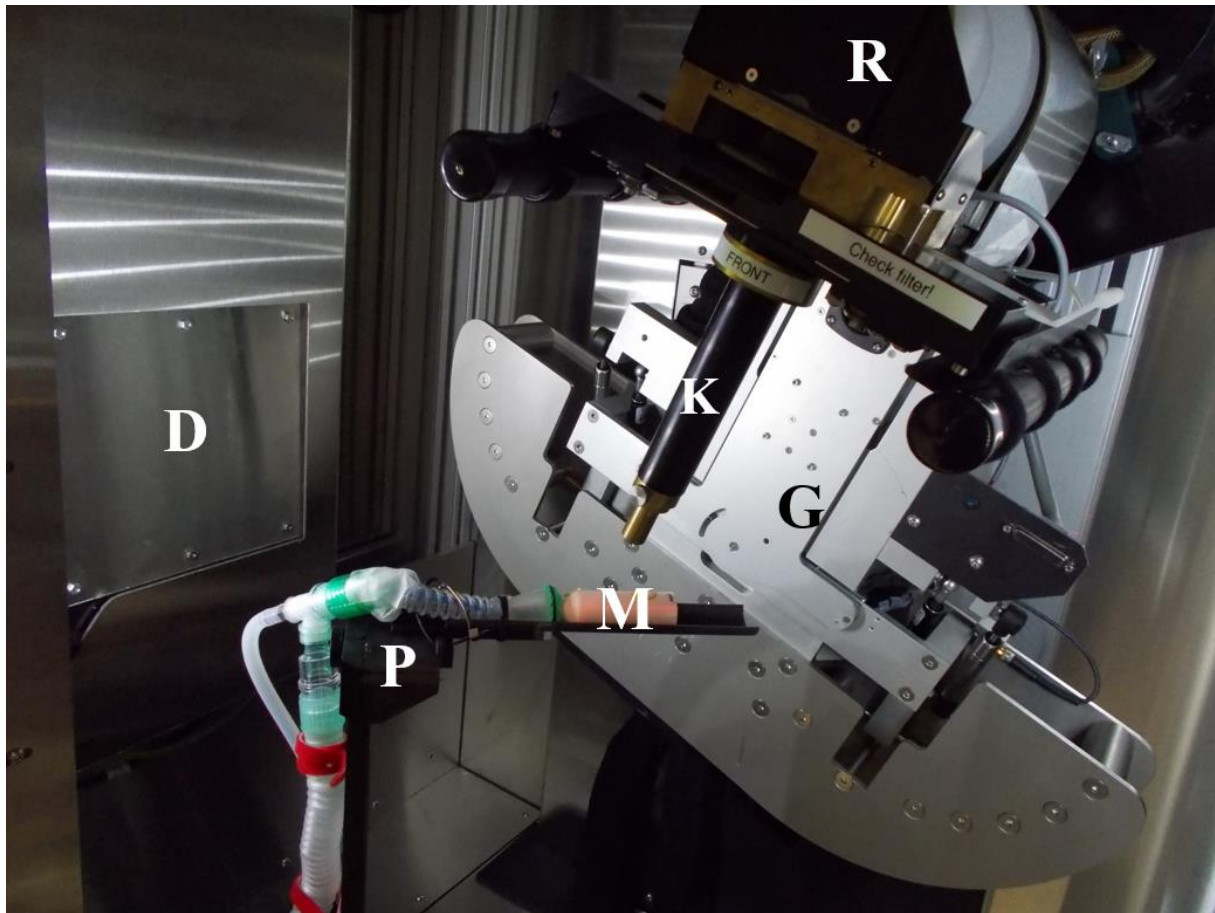


Abbildung 8: Zu sehen ist der Aufbau des SARRP zur Bestrahlung einer Maus. Zu erkennen ist die Gantry (G) und die darauf montierte Röntgenquelle (R), auf der für die Bestrahlung ein Kollimator (K) befestigt ist. Die Maus (M) befindet sich hierbei auf dem Mausbett mit einer Verneblungsanlage zur Narkose, das auf einer verschiebbaren und rotierbaren Plattform montiert ist. Der Detektor (D) wird für die Bestrahlung nicht verwendet und ist hier abgedeckt.

Das gesamte Gerät ist mit Blei abgeschirmt, sodass bei Arbeiten am SARRP keine zusätzliche Strahlenschutzüberwachung benötigt wird. Das betäubte Tier wird auf einem Mausbett platziert an welchem es weiterhin durch eine dort angebrachte Verneblungsanlage im Narkosezustand verbleibt. Das computergesteuerte Plattform mit dem Mausbett hat vier Freiheitsgrade: X, Y, Z für die Verschiebung in den drei Raumrichtungen und θ für die Rotation des Mausbetts. Durch diese Verschiebung und Rotation ist eine genaue und im weiteren Verlauf reproduzierbare Positionierung der Mäuse möglich. An die Röntgenquelle können verschiedene Kollimatoren fixiert werden, um eine präzise Bestrahlung zu ermöglichen (Abbildung 8).

Das CT für die Bestrahlungsplanung wurde unter Verwendung des SARRP mit einem Röhrenstrom von 0,8 mA und einer Beschleunigungsspannung (Peak Voltage) von 60 kV durchgeführt. Die Röntgenstrahlen wurden hierfür mit 1 mm Aluminium gefiltert. Anschließend wurde die Bestrahlungsplanung mit dem dazugehörigen dreidimensionalen

Planungssystem Muriplan erstellt (Abbildung 9-11). Anhand dieser Bestrahlungsplanung wurde ebenfalls mit dem SARRP die Bestrahlung der Mäuse mit 220 kV-Röntgenstrahlen durchgeführt.

Anschließend wurde eine Bestrahlung mit 220 kV-Röntgenstrahlen mit dem SARRP und seinem dreidimensionalen Planungssystem MuriPlan durchgeführt. Die Röntgenstrahlen wurden für die Bestrahlung wurde mit 0,15 mm Kupfer gefiltert. Entsprechend der Einteilung in verschiedene Gruppen, wurde bei sechs Mäusen die gesamte rechte Lunge bestrahlt, bei sechs weiteren der obere Teil der rechten Lunge und bei einer weiteren Gruppe von sechs Mäusen der untere Teil der rechten Lunge. (siehe Abbildung 9-11)

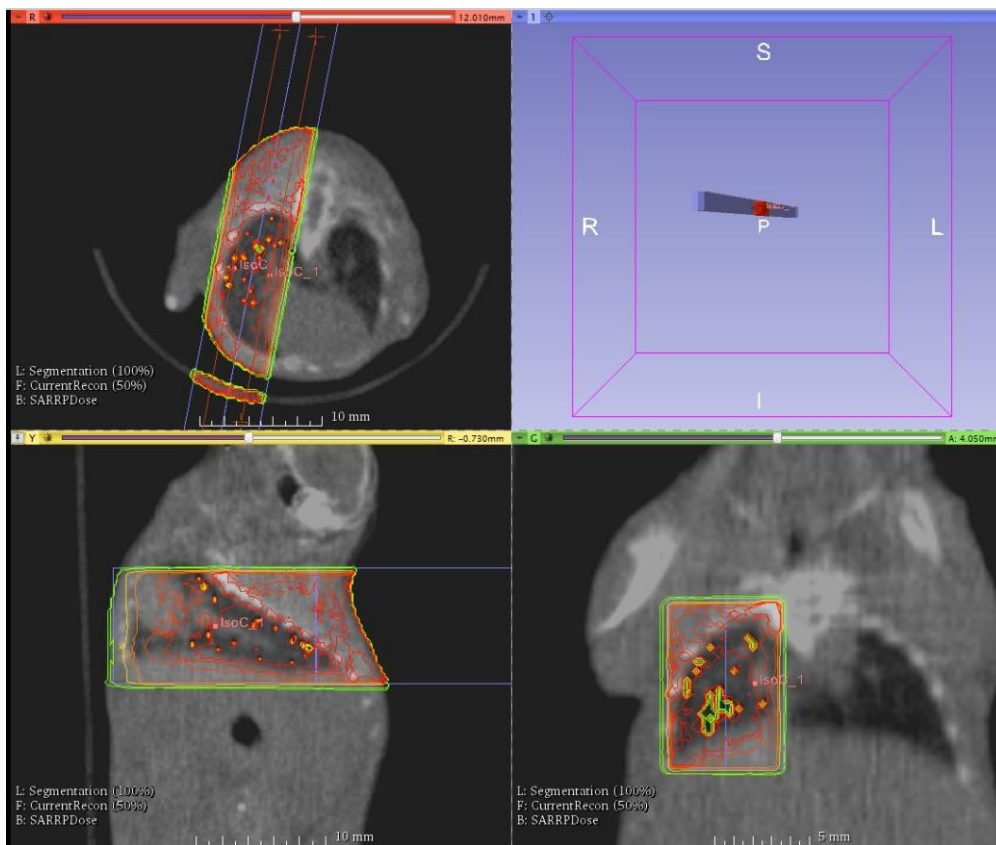


Abbildung 9: Bestrahlungsplanung bei einer an der gesamten rechten Lunge bestrahlten Maus mit dem dreidimensionalen Planungssystem MuriPlan.

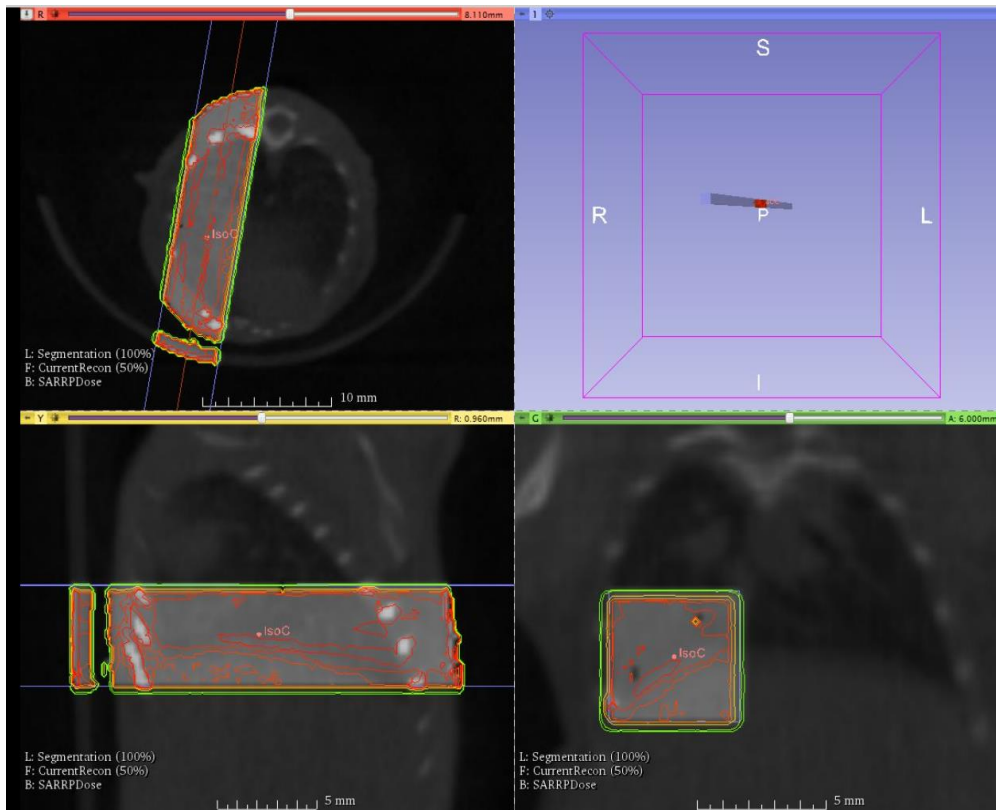


Abbildung 10: Bestrahlungsplanung bei einer an der rechten unteren Lunge bestrahlten Maus mit dem dreidimensionalen Planungssystem MuriPlan.

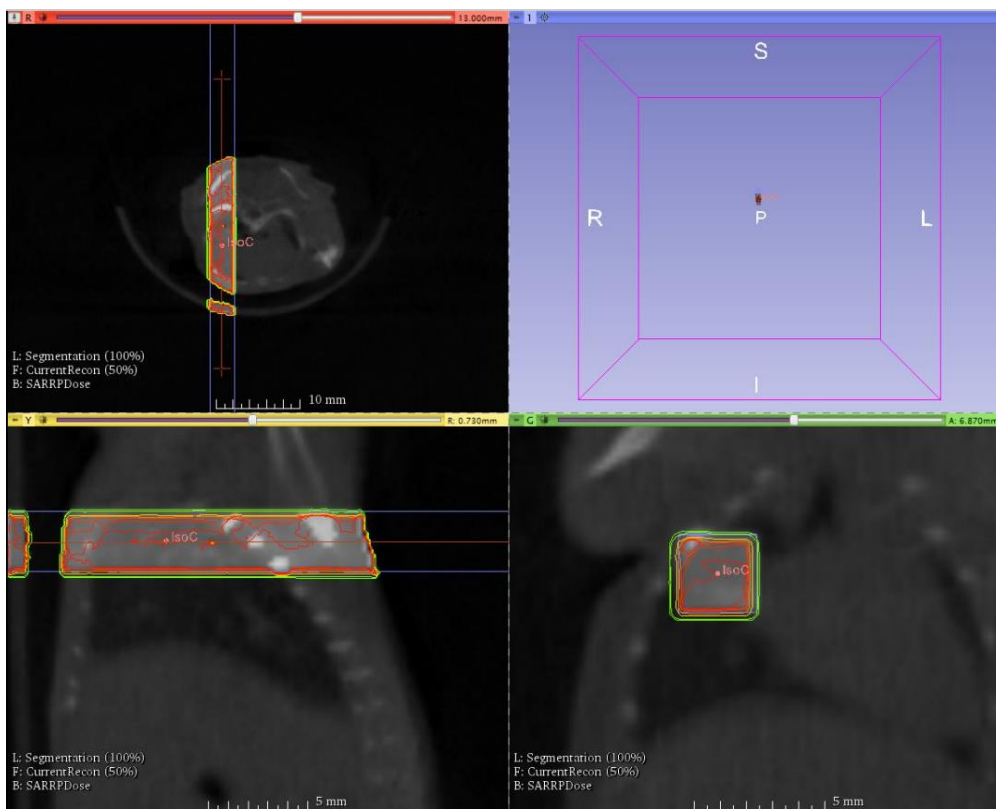


Abbildung 11: Bestrahlungsplanung bei einer an der rechten oberen Lunge bestrahlten Maus mit dem dreidimensionalen Planungssystem MuriPlan.

Um das Herz und das Rückenmark zu schonen, wurden zwei sich zueinander quer gegenüberliegende Bestrahlungsfelder genutzt. Die Abweichung von einer genauen anterior-posterioren Anordnung variierte zwischen 0 und 11 Grad. Die Feldgröße im Isozentrum (in der Mitte der rechten Lunge, mit einem Abstand von 350 mm zur Röntgenquelle) betrug $9 \times 6 \text{ mm}^2$, was durch zwei übereinstimmende Teilfelder unter Verwendung eines festen Kollimators von $9 \times 3 \text{ mm}^2$ realisiert wurde. Die Dosis (Wasserenergiedosis, kommissioniert Verwendung einer kalibrierten Ionisationskammer) betrug im Isozentrum 20 Gy bei einer Dosisrate von ca. 2 Gy / min.

Die linke Lunge der Mäuse wurde nicht bestrahlt um das gesunde Lungengewebe im Verlauf als Referenz anwenden zu können. Die Anästhesie der Mäuse für das zur Bestrahlungsplanung benötigte CT und die anschließende lokale Bestrahlung der Lunge erfolgte mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (2-3 Volumenprozent), das über eine spezielle Verneblungsanlage für Kleintiere appliziert wurde.

3.4 Bildgebung

Die Bildgebung wurde mit dem von der Firma Bruker entwickelten Prototypen, dem Röntgen Bildgebungsgerät SkyScan 1190 Phasenkontrast MicroCT durchgeführt (siehe Abbildung 12). Dieser ist ein Talbot-Lau-interferometer, welches Gitterbasierte Röntgen-Phasenkontrastbildgebung nutzt, um drei Arten an Kontrasten aus einem Scan zu extrahieren: ein Abschwächungsbild (Absorption), ein Phasenkontrastbild und eine Dunkelfeldaufnahme. Für unsere Studie arbeiteten wir mit den Dunkelfeldaufnahmen, die besonders hohe Sensitivität für granuläre Strukturen wie die Alveolen der Lunge aufweist und dem konventionellen absorptionsbasierten Bildgebung, der aus dem Klinikalltag bekannt ist. Somit konnten wir im späteren Verlauf die Bild- und Diagnosequalität der beiden Modalitäten vergleichen.

Der Scanner wurde mit einer Spannung von 37 kV und einer Stromstärke von 665 μA betrieben, wobei die Visibilität des Interferenzmusters 20% betrug. Das spezielle Bildgebungsverfahren des SkyScan erfordert, dass nicht eines, sondern mehrere Bilder aufgenommen werden, aus denen dann die drei Bildgebungsmodalitäten berechnet werden. Jedes der drei Bilder wird nach einem Phasenschritt aufgenommen. Im hier genannten Fall wurden vier Phasenschritte verwendet. Die Expositionszeit betrug 1428 ms pro Phasenschritt. Die Strahlungs-dosis für diesen Prozess wird mit etwa 3mGy angegeben. Referenzbilder zur Prozessierung und

Rekonstruktion der aufgenommenen CTs wurden zuvor ohne einer Maus im Scanner aufgenommen.

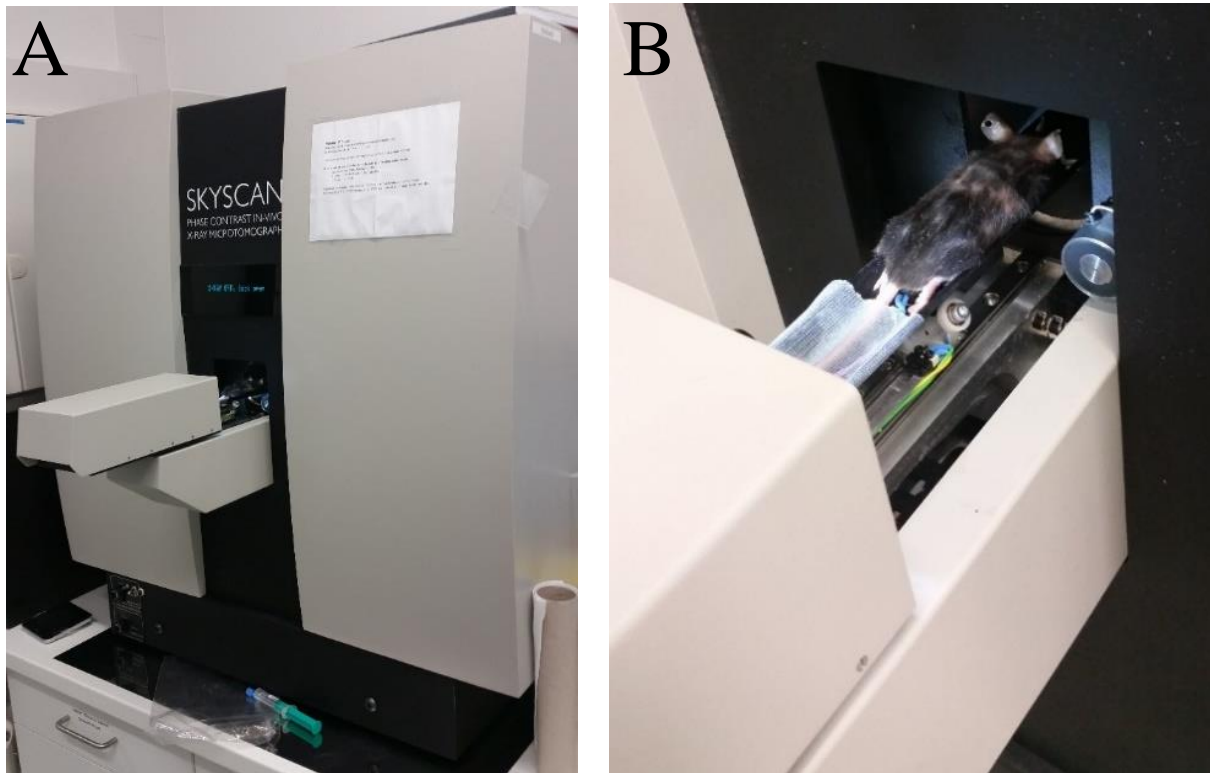


Abbildung 12: Skyscan (a) mit Nahaufnahme des Mausebets (b) mit anästhesiertem Versuchstier.

Die Mäuse wurden vor Durchführung der Bildgebung mit MMF narkotisiert (s.o.) und auf dem Bauch liegend auf dem Mausebett positioniert (siehe Abbildung 12b). Hierbei wurde der Schwanz der Maus mit einem Klebestreifen fixiert, um Zuckungen desselben zu verhindern die beim Nachlassen der Betäubung am Ende der Bildgebung auftreten können. Durch einen eingebauten Heizmechanismus wurden sie vor Auskühlung geschützt. Um das Wohlergehen der Tiere zu garantieren, konnten diese mit einer eingebauten Kamera während des Bildgebungsprozesses beobachtet werden. Hierbei wurde auch die Atembewegung im Rahmen der Thoraxexkursion der Mäuse gemessen (Abbildung 13).

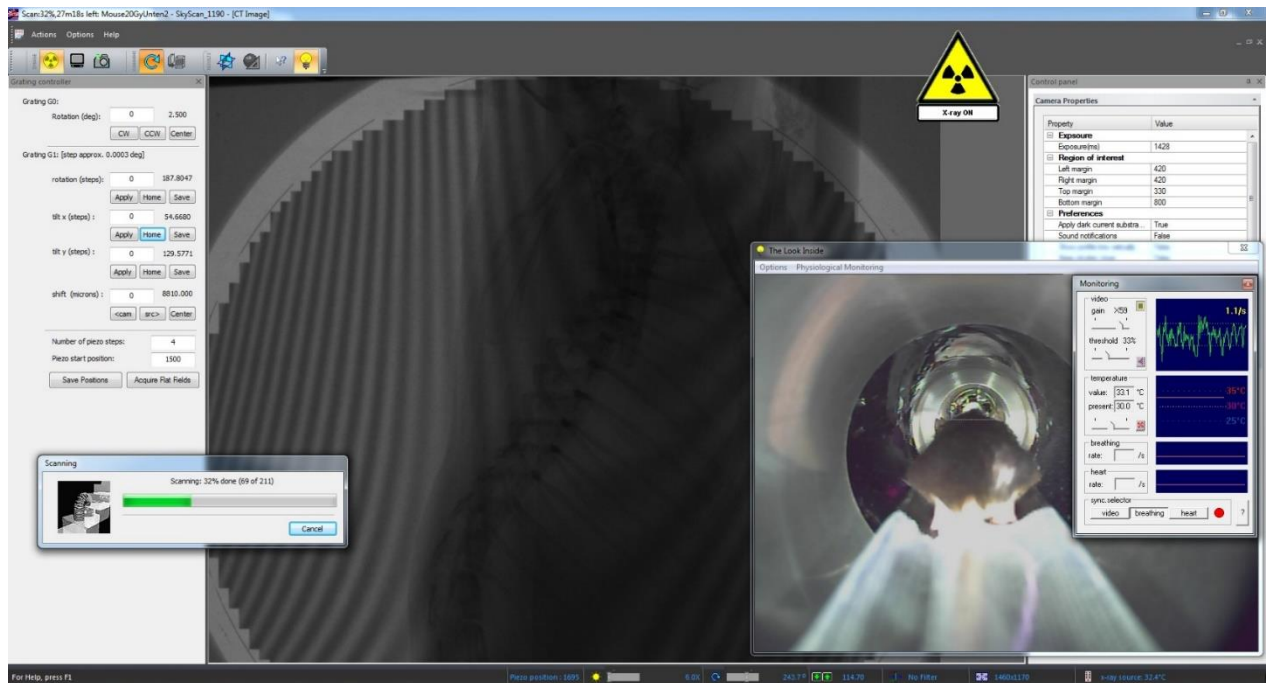


Abbildung 13: Bildschirmansicht der Bildgebungssoftware mit in-vivo Monitoring von Umgebungstemperatur und Atembewegungen der Maus mit einer eingebauten Kamera (rechter Bildrand).

3.5 Prozessierung und Rekonstruktion der SkyScan CTs

In der weiteren Prozessierung werden die drei Bildgebungsmodalitäten aus den zuvor entstandenen Referenzbildern und der aktuellen Bildgebung der Maus berechnet. Diese Bilder entsprechen Projektionen, beziehungsweise Radiographien. Der Algorithmus zur Prozessierung berücksichtigt nicht nur die pixelweisen Messwerte sondern auch deren statistische Verteilung. Diese Verteilung wird für die Rekonstruktion benötigt, um Rauschen zu reduzieren.

In der Rekonstruktion wurde das digitale Volumentomogramms aus den Projektionen, beziehungsweise Radiographien erstellt. Anstelle der konventionellen Methode der gefilterten Rückprojektion (FBP) wurde ein statistisch-iterativer Rekonstruktionsalgorithmus (SIR) verwendet. Dieser berücksichtigt die statistische Verteilung der Messwerte aus den Projektionen, bzw. Radiographien, um das Noise zu reduzieren. Dadurch kann das Bild „homogenisiert“ werden, ohne zu stark räumliche Auflösung einzubüßen. Der Ausgleich zwischen Noise und Auflösung wird über drei Parameter erreicht, die empirisch bestimmt wurden. Für alle Rekonstruktionen wurden dieselben Parameter verwendet.

3.6 Auswertung

3.6.1 Qualitative Auswertung

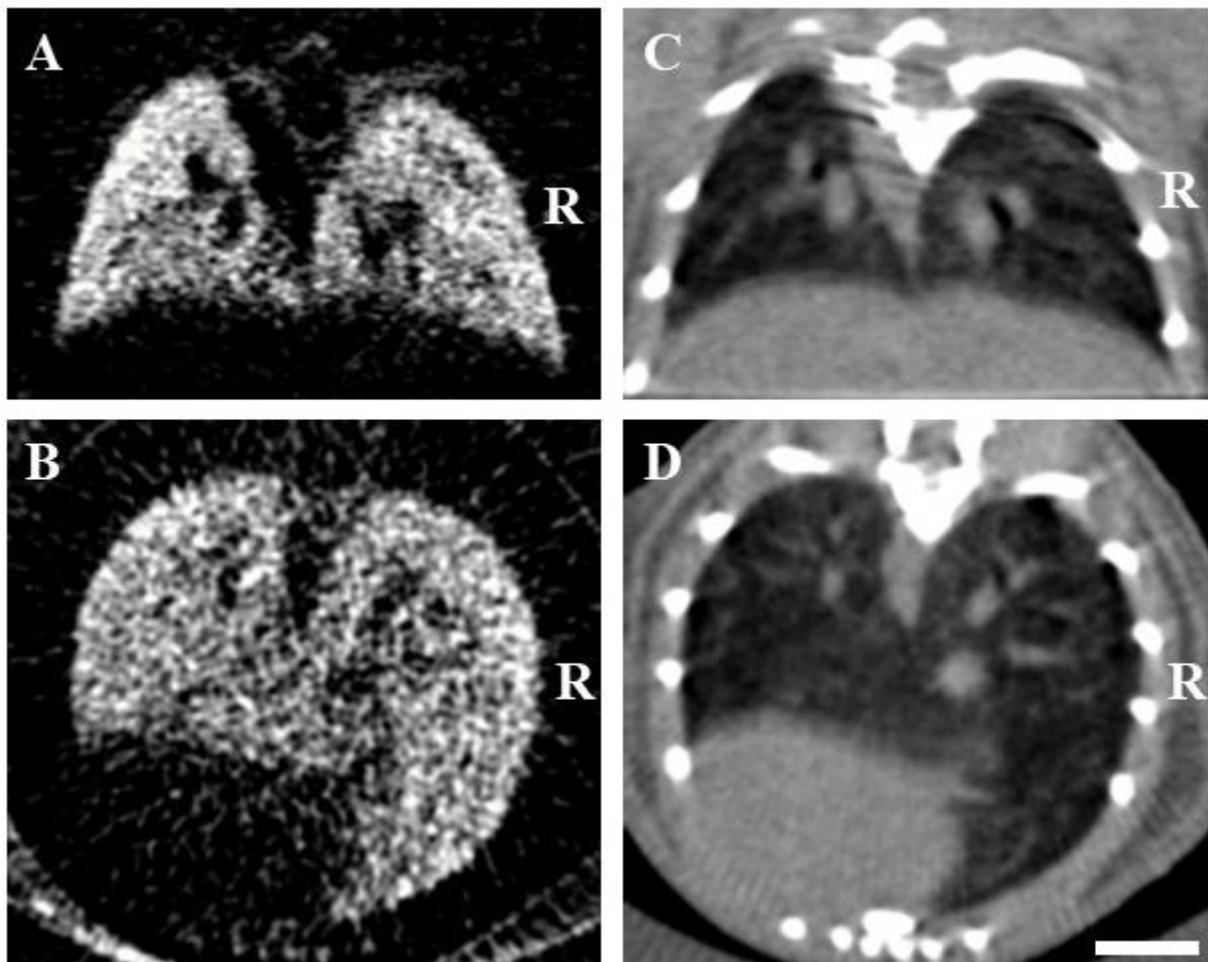


Abbildung 14: Gegenüberstellung beider Bildgebungsmodalitäten in a.-p. (oben) und Transversalschnitt (unten). Die Dunkelfeldaufnahmen (links), zeigen keine Abbrüche des Dunkelfeldsignals der Lunge. Die Absorptionstomographien (rechts) zeigen keine Verschattungen über der Lungenstruktur. Es handelt sich hierbei um gesunde unbestrahlte Lungen der Kontrollgruppe. (Längsbalken: 5mm) *

der Lungenveränderungen der einzelnen Mäuse im Zeitverlauf. Zunächst erfolgte der Vergleich der Vorbefunde separat für beide Bildgebungsmodalitäten. Dabei lag ein besonderer Fokus auf den ersten sichtbaren Veränderungen im Lungengewebe und auf dem Zeitpunkt, an dem diese in der Bildgebung erkennbar waren. Es fand ein visueller Vergleich der unterschiedlich bestrahlten Mäuse in deren Gruppen statt. Hier wurde insbesondere auf Unterschiede in den verschiedenen Bestrahlungsarealen und dem Auftreten von ersten Veränderungen im Lungengewebe geachtet. Im Anschluss wurden auch die absorptionsbasierten Tomographien und die Dunkelfeldtomographien miteinander verglichen, ebenfalls mit Fokus auf erste

*Für eine bessere Anschaulichkeit wurden die Tomographien teilweise gespiegelt. Deshalb finden sich im Bild Markierungen der rechten Lunge.

erkennbare Veränderungen im Lungengewebe. Ziel war es zu beobachten, welche Bildgebungsmodalität die Änderungen deutlicher zeigt.

Dabei zeigt sich eine Lungenfibrose im Dunkelfeld durch eine Signalabschwächung. In der Absorption zeigen sich fibrotische Veränderungen hingegen als Signalverstärkung und eine Verschattung des Lungengewebes. Alle Tomographien (siehe Abbildung 14) wurden gleichermaßen auf den größtmöglichen Kontrast skaliert.

3.6.2 quantitative Auswertung

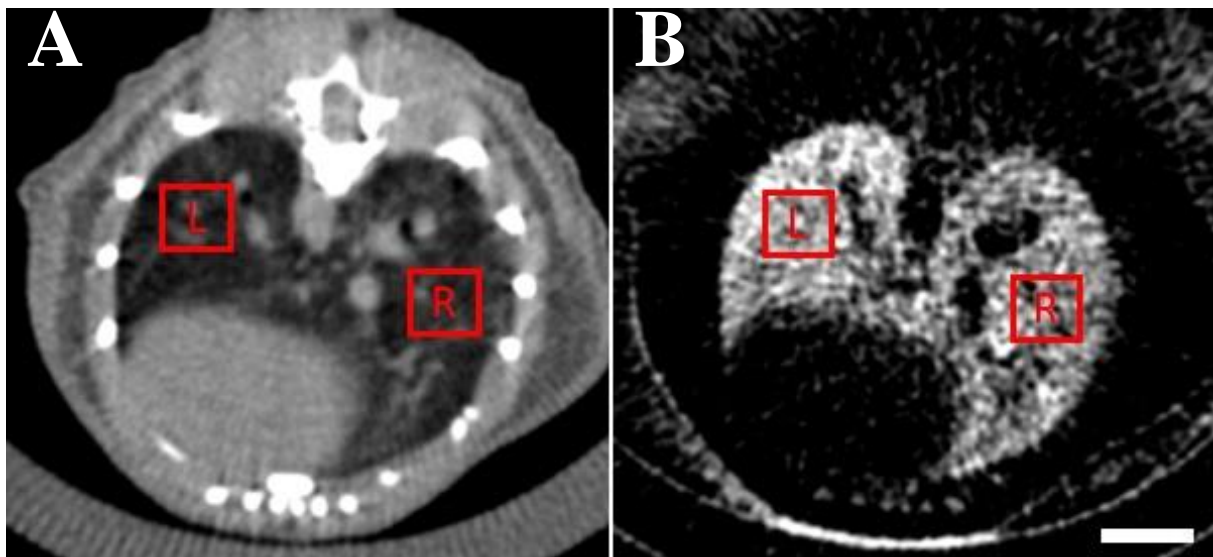


Abbildung 15: Erstversuch einer Bestimmung der Regions Of Interest zur Grauwertbestimmung in der Absorptionsbasierten (a) und Dunkelfeldbasierten (b) Tomographie. In der rechten und linken Lunge wurden in beiden Bildgebungsmodalitäten quadratische ROISs ausgewählt. (Längenbalken: 5mm)

Für die quantitative Analyse der Lungenveränderungen anhand einer Grauwertbestimmung wurde zunächst eine vereinfachte Methode angewandt, um sich dem möglichen Ergebnis anzunähern. Hierzu wurden zwei Felder, sogenannte ROIs (regions of interest), in den Radiographien ausgewählt (siehe Abbildung 15). Beide sind quadratisch und gleich groß. Eines davon liegt in der rechten Lunge und das andere in der linken Lunge. Die Lage wurde so gewählt, dass die ROIs immer ungefähr an derselben Stelle in der Lunge liegen, jedoch ohne große Gefäße zu beinhalten und somit Ergebnisse zu verfälschen. In einer weiteren Annäherung wurde eine genauere Grauwertbestimmung durchgeführt. Hierbei wurden die ROIs über den gesamten Lungen links und rechts ausgewählt, jedoch mit Fokus auf das zentrale Areal beider Lungen (siehe Abbildung 16). Dadurch sollte vermieden werden, mögliche Überlagerungen mit umgebenden Strukturen in die Messung miteinzuschließen und diese dadurch zu verfälschen.

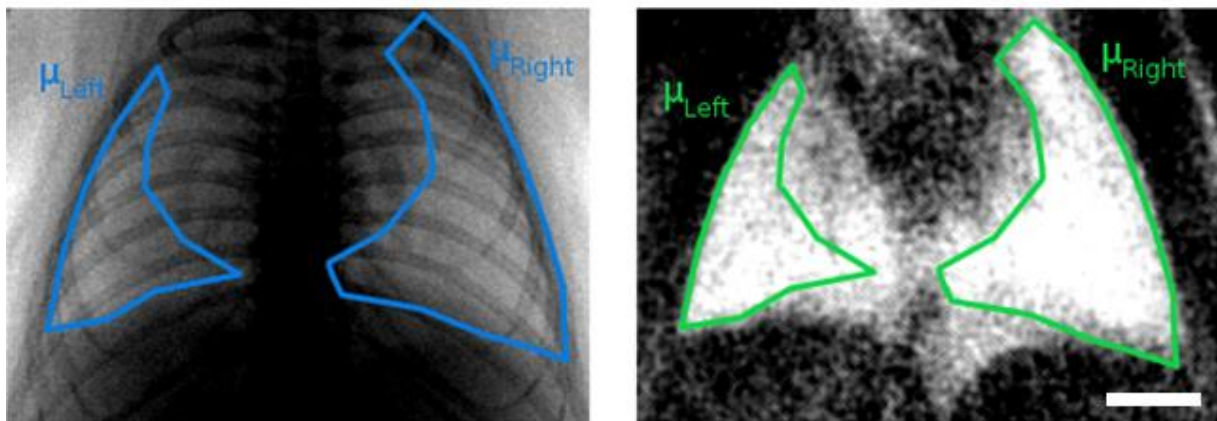


Abbildung 16: Genauere Bestimmung der Regions of interest (ROIs) in der rechten und linken Lunge in der absorptionsbasierten (a) und dunkelfeldbasierten (b) Radiographie. Die ROIs wurden hier über den gesamten Lungen ausgewählt, mit einem Fokus auf das zentrale Areal beider Lungen.

Anschließend wurden in beiden Fällen sowohl für die absorptionsbasierte Bildgebung als auch für die Dunkelfeldradiographie die Mittelwerte μ_{Rechts} und μ_{Links} beider ROIs berechnet. Für jede Bildgebungsmodalität wurden die Mittelwerte der zwei Felder dividiert, um ein Verhältnis $R = \mu_{Rechts}/\mu_{Links}$ zu erhalten.

Anschließend wurde der Mittelwert \bar{R} und die Standardabweichung σ für diese Reihe an Verhältnissen R_i ($i = 1, \dots, 6$ sind die den Mäusen zugeteilten Nummern) für beide Gruppen berechnet. Das führt zu folgender Gleichung:

$$R_{A,DF} = \bar{R}_{A,DF} \pm \sigma_{A,DF}$$

Hierbei stehen die Abkürzungen A und DF jeweils für die absorptionsbasierten Radiographien und die Dunkelfeldbildgebung. Jede Gruppe wird zu jedem Zeitpunkt von zwei Werten dargestellt: R_A für den absorptionsbasierten Kontrast und R_{DF} für den Dunkelfeldkontrast. So lässt sich auch quantitativ eine zeitliche Veränderung darstellen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass eine Veränderung des Durchschnittswerts der Grauwerte kein direkter Beweis für eine manifeste Lungenfibrose ist, sondern lediglich ein Indikator für diese ist.

3.6.3 Histologie

Aus allen vier Gruppen wurden Mäuse für eine weitere histologische Untersuchung, 36 Wochen nach Bestrahlung ausgewählt. Bei diesen wurden beide Lungen entnommen und in Formalin konserviert. Aus den gewonnenen Proben wurden Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Diese wurden von einem erfahrenen Pathologen auf fibrotische

Veränderungen analysiert, um diese nach Möglichkeit den Ergebnissen der vorausgegangenen Bildgebungen zuzuordnen. In der Hämatoxylin und Eosin Färbung werden durch den sauren Farbstoff Eosin insbesondere alle azidophilen, bzw. eosinophilen Strukturen rot gefärbt. Dazu gehört auch das bei der Lungenfibrose vermehrt anfallende Kollagen, wodurch mit dieser Färbung die Fibrose durch eine Rotfärbung der betroffenen Areale indiziert wird.

4. Ergebnisse

4.1 Qualitative Auswertung

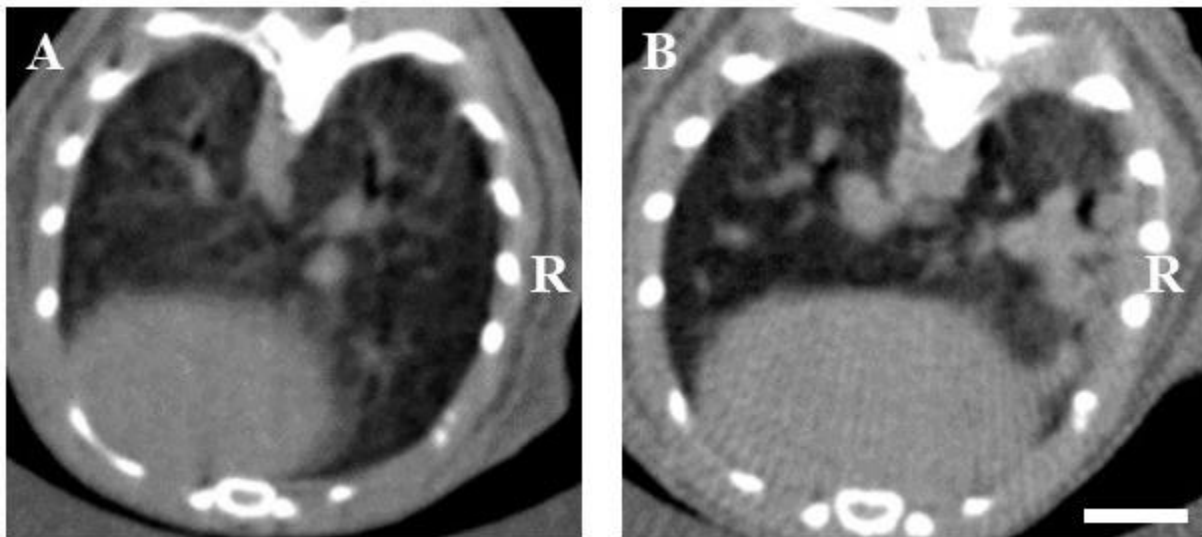


Abbildung 17: Vergleich der absorptionsbasierten Tomographien einer mit 20 Gy auf der gesamten rechten Lunge bestrahlten Maus unmittelbar vor (A) und 24 Wochen nach der Bestrahlung (B). In (A) sind keine strukturellen Veränderungen oder Verschattungen des Lungengewebes zu erkennen. Nach 24 Wochen kann man in Bildteil (B) eine deutliche Verschattung der rechten Lunge erkennen. Die linke Lunge zeigt auch 24 Wochen nach Bestrahlung keine eindeutigen pathologischen Veränderungen. (Längenbalken: 5mm)

In den absorptionsbasierten Tomographien der an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäuse sind in der ersten Aufnahme, welche vor der Bestrahlung durchgeführt wurde (Woche 0), beide Lungen als gesund zu erkennen (Abbildung 17a). Die Struktur der Bronchien ist in dieser Aufnahme in beiden Lungen deutlich zu erkennen. Im Vergleich dazu ist 24 Wochen nach der Bestrahlung hingegen eine deutliche Verschattung im rechten Lungelflügel zu sehen (Abbildung 17b). Insgesamt erscheint in Woche 24 ein Großteil der rechten Lunge trüber als die unbestrahlte linke Lunge. Am lateralen Rand der rechten Lunge ist das Absorptionssignal derart stark, sodass die Veränderung dieser Lunge sich besonders abhebt und somit Hinweise auf eine mögliche Fibrose liefert. Die durch die Fibrose erhöhte Dichte der Lunge erhöht die Absorption der Röntgenstrahlen, sodass die Transmissionrate der rechten Lunge sinkt und zu den sichtbaren Verschattungen in den absorptionsbasierten Tomographien führt.

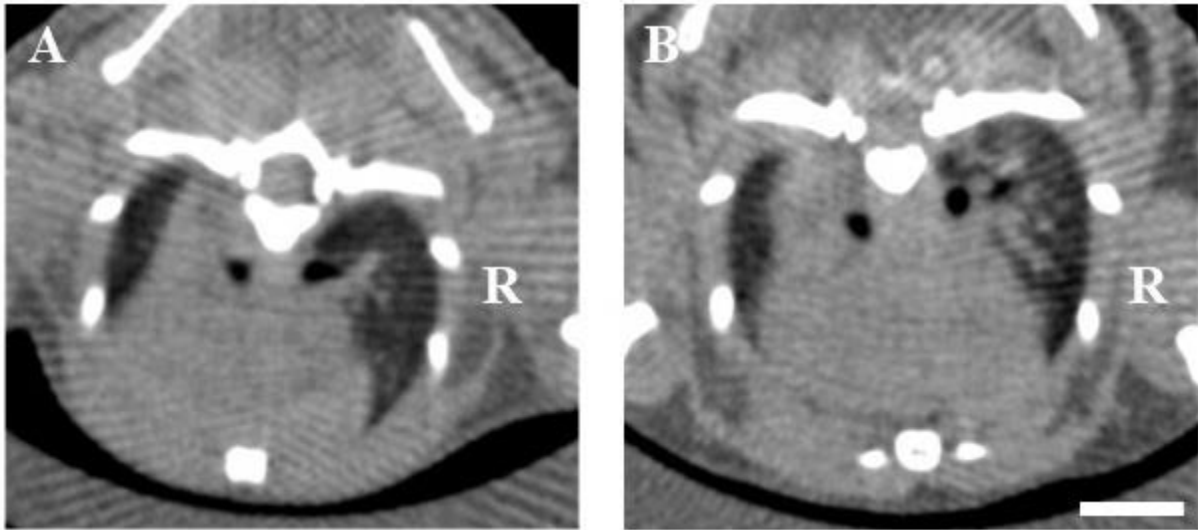


Abbildung 18: Vergleich der absorptionsbasierten Tomographien einer mit 20 Gy auf der oberen rechten Lunge bestrahlten Maus unmittelbar vor (A) und 24 Wochen nach (B) der Bestrahlung. Die Aufnahmen vor der Bestrahlung zeigen in linker und rechter Lunge keine Veränderungen des Lungengewebes (A). 24 Wochen nach der Bestrahlung ist in der rechten Lunge dorsal eine Trübung der Lunge erkennbar (B). In der linken Lunge lässt es sich auch nach 24 Wochen nicht auf pathologische Veränderungen schließen. (Längsbalken: 5mm)

Beim Vergleich der absorptionsbasierten Tomographien der mit 20 Gy auf der oberen rechten Lunge bestrahlten Mäuse ist, wie zuvor erwartet insbesondere in den oberen Segmenten der rechten Lunge eine Veränderung zu beobachten (Abbildung 18). In den vor der Bestrahlung erstellten Aufnahmen sind beide Lungen auf dieser Höhe von vergleichbarer Röntgendichte und zeigen (z.B. in der rechten Lunge) teilweise Abschnitte der Bronchien. Pathologische Veränderungen, wie Trübungen oder Verschattungen des Lungengewebes, sind dabei nicht erkennbar. Nach 24 Wochen erscheint die rechte Lunge am dorsalen Rand in der Tomographien etwas getrübt und im Vergleich mit der Aufnahme vor der Bestrahlung mit einer leichten Aufhellung. Letzteres kann auch auf die Entstehung einer Fibrose hinweisen. Die linke Lunge zeigt auch 24 Wochen nach der Bestrahlung keine Veränderungen des Lungengewebes in den Tomographien. Auch die Lungenbasis der rechten Lunge lässt zu diesem Zeitpunkt keine pathologischen Veränderungen erkennen. Insgesamt sind die Veränderungen im Lungengewebe bei den an der oberen rechten Lunge bestrahlten Mäusen etwas diskreter als bei den an der gesamten rechten Lunge bestrahlten Mäusen.

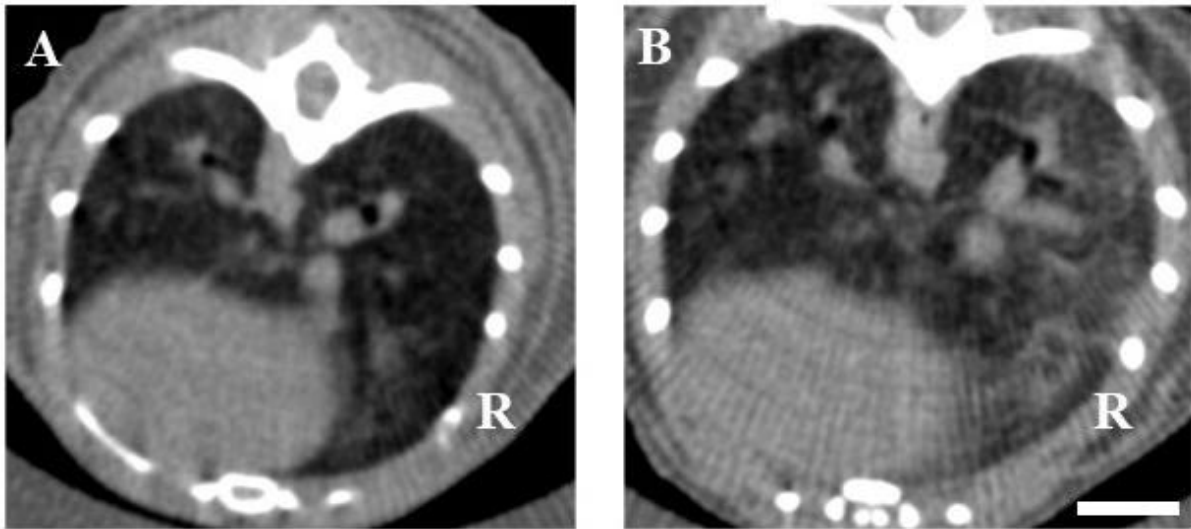


Abbildung 19: Vergleich der absorptionsbasierten Tomographien einer mit 20 Gy auf der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus unmittelbar vor (A) und 24 Wochen nach der Bestrahlung (B). Die vor der Bestrahlung durchgeführten Tomographien zeigen beide Lungenflügel ohne pathologische Veränderungen (A). 24 Wochen nach der Bestrahlung wird am lateralen Rand der rechten Lunge eine deutliche Verschattung deutlich (B). Die linke Lunge zeigt sich hingegen auch nach 24 Wochen ohne pathologische Veränderungen. (Längsbalken: 5mm)

Beim Vergleich der absorptionsbasierten Tomographien der an der unteren rechten Lunge bestrahlten Mäuse sind ebenfalls deutliche Veränderungen zu erkennen. Vor der Bestrahlung (Abbildung 19a) sind rechte und linke Lunge von ähnlicher Röntgendichte. Nach 24 Wochen hingegen zeichnet sich in der Basis der rechten Lunge eine deutliche Veränderung der Struktur ab (Abbildung 19b). Die gesamte rechte Lunge erscheint hier im Vergleich zur linken Lunge an ihrer Basis mit einer deutlichen Verschattung. Besonders am lateralen Rand ist eine Aufhellung der Lungenstruktur erkennbar. Auch diese Veränderungen könnten sich einer Lungenfibrose zuordnen lassen. In der linken Lunge und der rechten Lungenspitze wurden in den Tomographien der an der unteren rechten Lunge bestrahlten Mäuse keine fibrotischen Veränderungen der Lunge sichtbar.

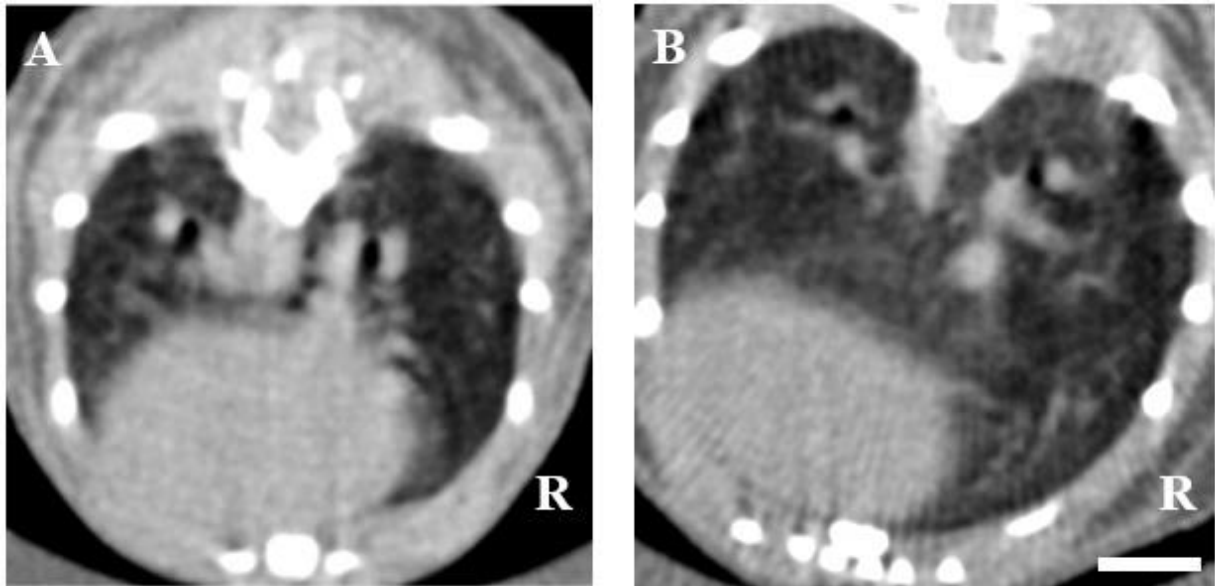


Abbildung 20: Vergleich der absorptionsbasierten Tomographien einer unbestrahlten Maus in Woche 0 (A) und Woche 24 (B). In der vor der Bestrahlung durchgeführten Aufnahme sind keine pathologischen Veränderungen der Lungenstruktur zu sehen (A). Auch nach 24 Wochen zeigen sich beide Lungen mit gleichmäßiger Struktur und ohne Verschattungen (B). (Längensbalken: 5mm)

Im Vergleich der absorptionsbasierten Tomographien der Wochen 0 und 24 der Mäuse der Kontrollgruppe fallen entsprechend den Erwartungen keine Veränderungen in den Lungen auf (Abbildung 20). Auch nach 24 Wochen ist die reguläre Struktur der Lunge erhalten. Die Bronchien sind in der Abbildung gut erkennbar. Eine Verschattung oder Trübung wie vergleichsweise in den vorherigen Aufnahmen ist in keinem Bereich der Lunge zu beobachten.

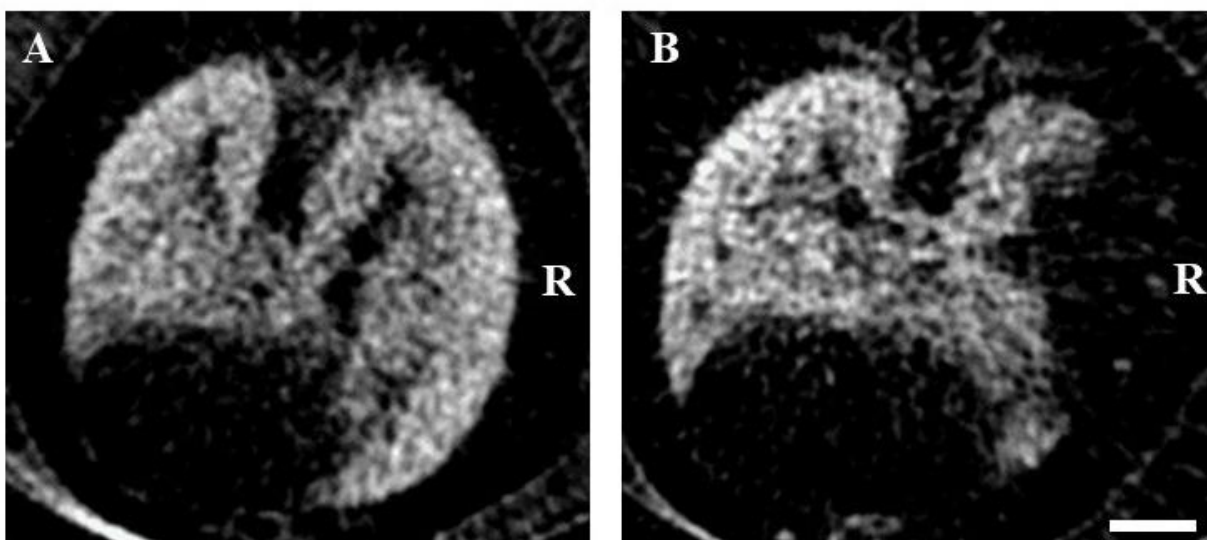


Abbildung 21: Vergleich der Dunkelfeldtomographien einer mit 20 Gy an der gesamten rechten Lunge bestrahlten Maus unmittelbar vor (A) und 24 Wochen nach (B) der Bestrahlung. In der vor der Bestrahlung durchgeführten Tomographie sind keine Veränderungen der Lungenstruktur zu erkennen.

Beide Lungen zeigen sich mit gleichmäßiger Struktur, also mit einem Dunkelfeldsignal von gleichmäßiger Stärke ohne Signalabbrüche. 24 Wochen nach der Bestrahlung wird am lateralen Rand der rechten Lunge ein erheblicher Signalabbruch deutlich. Die linke Lunge zeigt sich auch 24 Wochen nach der Bestrahlung ohne pathologische Veränderungen. (Längensbalken: 5mm)

Zwischen den Dunkelfeldtomographien unmittelbar vor und 24 Wochen nach der Bestrahlung der mit 20 Gy auf der gesamten rechten Lunge bestrahlten Maus sind deutliche Veränderungen zu erkennen. In Abbildung 21a sind beide Lungen intakt und haben die bekannte Struktur einer Dunkelfeldaufnahme der Lunge mit einer gleichmäßigen Signalstärke in allen Arealen. Der Verlauf der Bronchien ist ausschnittsweise als Signalabbruch zu erkennen. In Abbildung 21b), welche dieselbe Lunge 24 Wochen nach der Bestrahlung darstellt, ist ein Großteil der lateralen rechten Lunge nicht identifizierbar. Das Dunkelfeldsignal ist hier komplett abgebrochen und im umliegenden Lungengewebe deutlich abgeschwächt. Dies zeigt die Zerstörung der Struktur der Alveolen und Bronchien der Lunge und kann ein Hinweis auf eine Fibrose dieses Areals sein. Die linke Lunge weist auch nach 24 Wochen ein gleichmäßiges Dunkelfeldsignal, ohne strukturelle Veränderungen auf, was auf eine gesunde Lunge hinweist.

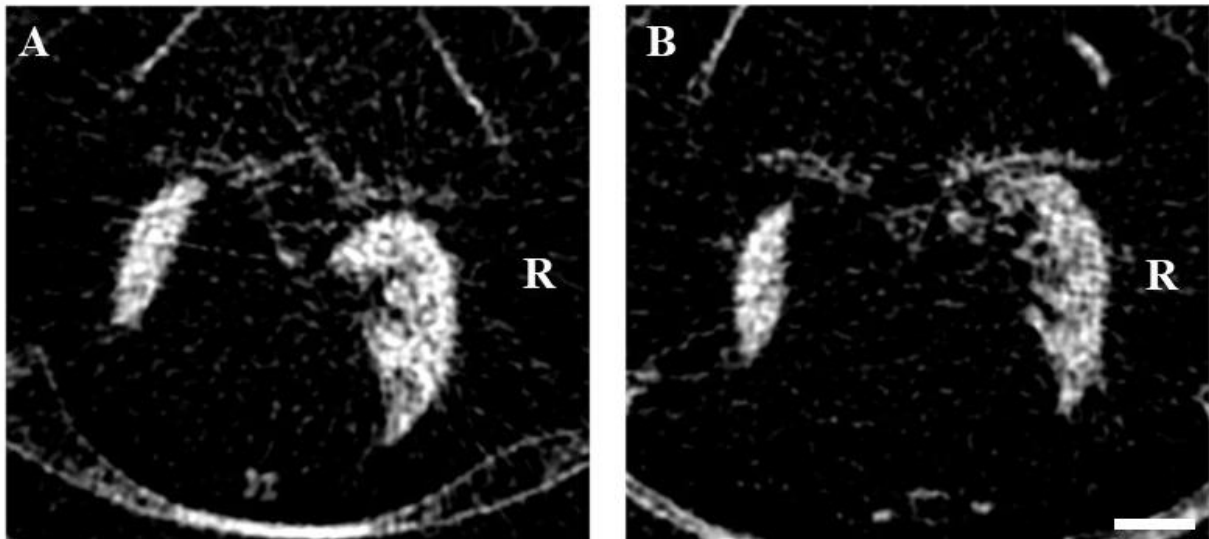


Abbildung 22: Vergleich der Dunkelfeldtomographien einer mit 20 Gy an der oberen rechten Lunge bestrahlten Maus unmittelbar vor (A) und 24 Wochen nach (B) der Bestrahlung. In Woche 0 sind in beiden Lungen keine strukturellen Veränderungen zu erkennen. 24 Wochen nach der Bestrahlung zeigt sich am dorsalen Rand der rechten Lunge ein diskreter Signalabbruch. Insgesamt stellt sich die rechte Lunge hier mit einem abgeschwächten Dunkelfeldsignal dar. Die linke Lunge zeigt sich hingegen mit einer unveränderten Signalintensität im Vergleich zu Woche 0. (Längensbalken: 5mm)

Beim Vergleich der Dunkelfeldtomographien einer mit 20 Gy an der oberen rechten Lunge bestrahlten Maus in den Wochen 0 und 24 sind Veränderungen schwach sichtbar. In Abbildung

22a) haben beide Lungen eine ähnliche Dichte und erscheinen gleich hell in der Tomographie. Daraus lässt sich auf beidseits gesunde Lungen schließen. In Abbildung 22b) sind dorsal feine Veränderungen im oberen rechten Lungflügel zu erkennen. Die ganze Lunge erscheint auf dieser Höhe mit einem leicht abgeschwächten Signal und insbesondere am postero-lateralen Rand ist die Körnung deutlich gröber. Wie durch den volumetrischen Effekt zu erwarten, ist die Fibrose in diesem Fall weniger stark ausgeprägt als bei den an der gesamten rechten Lunge (bzw. unteren rechten Lunge) bestrahlten Mäusen. In der linken Lunge und rechten Lungenbasis zeigen sich in den Tomographien keine Veränderungen der Lungenstruktur.

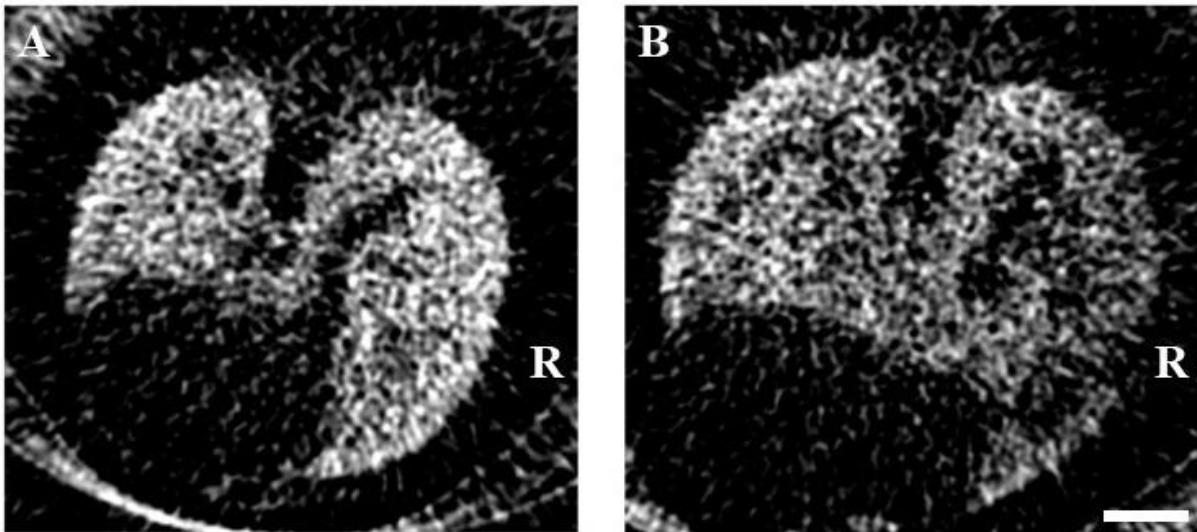


Abbildung 23: Vergleich der Dunkelfeldtomographien einer mit 20 Gy an der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus unmittelbar vor (A) und 24 Wochen nach (B) der Bestrahlung. Die vor der Bestrahlung durchgeführte Tomographie zeigt beide Lungen mit einem Dunkelfeldsignal von gleichmäßiger Stärke ohne Signalabbrüche. Nach 24 Wochen ist am lateralen Rand der rechten Lunge ein deutlicher Signalabbruch erkennbar. Auch die gesamte rechte Lunge stellt sich im Vergleich mit der linken Lunge mit einer herabgesetzten Signalstärke dar. (Längensbalken: 5mm)

Im Vergleich der Dunkelfeldtomographien aus Woche 0 und 24 einer mit 20 Gy an der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus, sind auch hier 24 Wochen nach Bestrahlung Veränderungen in der Lunge zu erkennen. Vor der Bestrahlung haben beide Lungen in der Tomographie (Abbildung 23a) eine gleichmäßige Struktur und Körnung, woraus man auf beidseits gesunde Lungen schließen kann. Nach 24 Wochen ist die durch Streuung verursachte Körnung der rechten Lunge deutlich gröber und bricht am lateralen Rand teilweise sogar ganz ab (Abbildung 23b). Dies kann auf die Fibrose der Lungenbasis hinweisen. In der linken Lunge und der rechten

Lungenspitze zeigen sich in den Tomographien keine Veränderungen der Lungenstruktur.

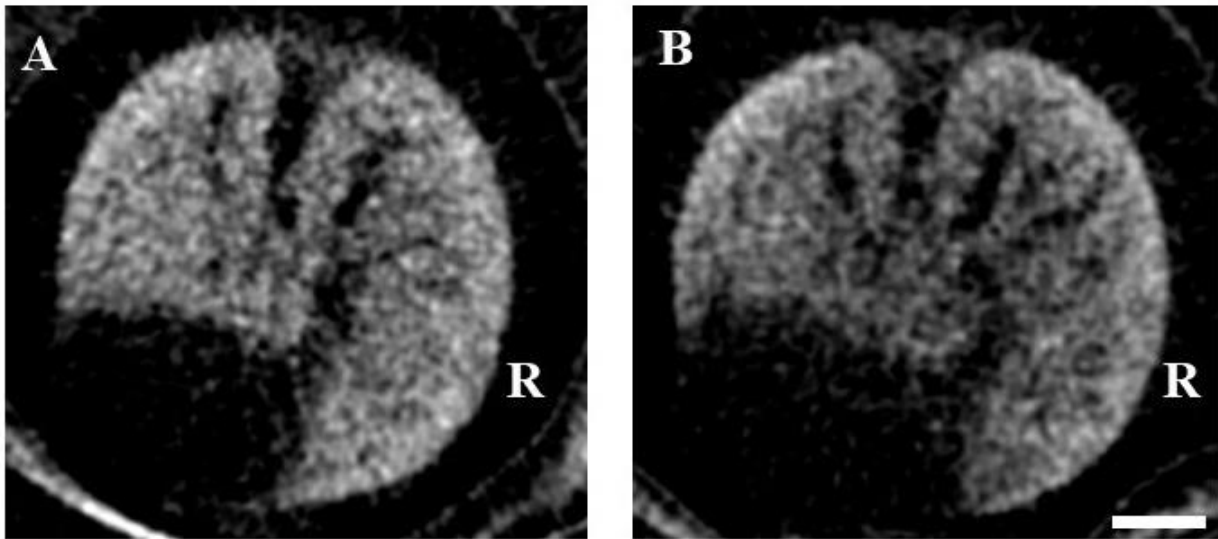


Abbildung 24: Vergleich der Dunkelfeldtomographien einer unbestrahlten Maus in Woche 0 (A) und Woche 24 (B). In der vor der Bestrahlung erstellten Tomographie sind keine Veränderungen der Lungenstruktur zu erkennen. Auch 24 Wochen nach Bestrahlung lassen sich an beiden Lungen keine strukturellen Veränderungen erkennen. (Längsbalken: 5mm)

Im Vergleich der Dunkelfeldtomographien der Kontrollgruppe in den Wochen 0 und 24 fallen wie auch zu erwarten, keine Veränderungen in der Lungenstruktur auf. Das Dunkelfeldsignal ist in beiden Tomographien durchgehend gleichmäßig stark ausgeprägt (Abbildung 24). Auch in allen anderen Ebenen sind keine Signalabbrüche zu erkennen. Daraus lässt sich zu beiden Zeitpunkten auf beidseits gesunde Lungen schließen.

Aus diesen Bildern ist klar abzuleiten, dass sich die Struktur der rechten Lunge signifikant verändert, was zu einer Verzerrung des Dunkelfeldsignals führt. In den Dunkelfeldtomographien kann man im Bestrahlungsfeld in der rechten Lunge einen auffälligen Abbruch des Dunkelfeldsignals erkennen (Abbildung 21b). Bei den unbestrahlten Mäusen der Kontrollgruppe ist hingegen auch nach 24 Wochen kein Unterschied in der Lungenstruktur zu erkennen. Das Dunkelfeldsignal stellt die Lungenstruktur gleichmäßig stark ausgeprägt dar, ohne dass ein Abbruch des Signals (in Form von einem schwarzen Feld) zu erkennen ist. Die Veränderung des Dunkelfeldsignals (und somit die in den Tomographien sichtbare Veränderung der Lungenstruktur) lässt sich durch die Entwicklung einer Fibrose gut erklären. In der durch die Bestrahlung geschädigten Lungen kommt es zu Entzündungsprozessen die schließlich zur Fibrose führen. Diese zeigt sich in einer Zerstörung der Struktur der Alveolen, sodass folglich auch die Anzahl der Luft-Gewebe-Grenzen in der rechten Lunge sinkt. Diese Luft-Gewebe-Grenzen stellen allerdings die Basis für den Dunkelfeldkontrast dar. Sinkt die

Anzahl dieser Oberflächengrenzen durch die Lungenfibrose, wird auch das Dunkelfeldsignal schwächer.

	Woche 0	Woche 4	Woche 8	Woche 12	Woche 16	Woche 20	Woche 24	Woche 28
Lunge rechts	0	0	1	2	4	6	6	6
Oben rechts	0	0	0	0	1	3	5	5
Unten rechts	0	0	0	1	1	5	5	5
Kontrollgruppe	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4: Absolute Häufigkeiten der Mäuse mit ersten sichtbaren Lungenveränderungen in der Bildgebung in der visuellen Auswertung aller vier Studiengruppen

Abschließend lassen sich die visuell beurteilbaren Veränderungen der Lungenstruktur in den Tomographien beider Bildgebungsmodalitäten tabellarisch zusammenfassen. (Tabelle 4) Hierbei fällt auf, dass in der Gruppe mit ganzer Bestrahlung der rechten Lunge erste Veränderungen bereits in der 8. Woche sichtbar werden. Anschließend zeigen sich auch Veränderungen in der an der rechten Lungenbasis bestrahlten Gruppe in Woche 12 und in der an der Lungenspitze bestrahlten Gruppe in Woche 16. Die Kontrollgruppe zeigt während des gesamten Verlaufs der Studie keine sichtbaren Veränderungen der Lungenstruktur. In der an der gesamten rechten Lunge bestrahlten Gruppe entwickeln alle 6 Mäuse nach 20 Wochen visuell manifeste Lungenveränderungen. Die Tomographien der jeweils Unten oder Oben bestrahlten Gruppen zeigen erst ab Woche 20, bzw. 24 eine veränderte Lungenstruktur bei der Mehrheit der Mäuse.

Im weiteren Teil der qualitativen Auswertung wurden die Dunkelfeldaufnahmen den absorptionsbasierten Aufnahmen gegenübergestellt. Zunächst wurden die Tomographien beider Bildgebungsmodalitäten der an der gesamten rechten Lunge bestrahlten Mäuse miteinander verglichen. Abbildung 25 zeigt die Entwicklung der Lungenveränderungen im Zeitverlauf in beiden Bildgebungsmodalitäten bei einer mit 20 Gy auf der ganzen rechten Lunge bestrahlten Maus. In beiden vor der Bestrahlung entstandenen Tomographien (Woche 0) ist zu sehen, wie eine gesunde Lunge in beiden Kontrastformen aussieht. Sowohl die Dunkelfeldtomographien als auch die absorptionsbasierten Tomographien zeigen keine Veränderungen der Lungenstruktur. Die Veränderungen der Lunge werden in beiden Bildmodalitäten etwa ab Woche 8 zu sehen. Hier ist insbesondere in der Dunkelfeldtomographien ein deutlicher Signalabbruch zu beobachten. In den

absorptionsbasierten Tomographien imponieren die Veränderungen hingegen mit einer hellen Verschattung des betroffenen rechten Lungenrands.

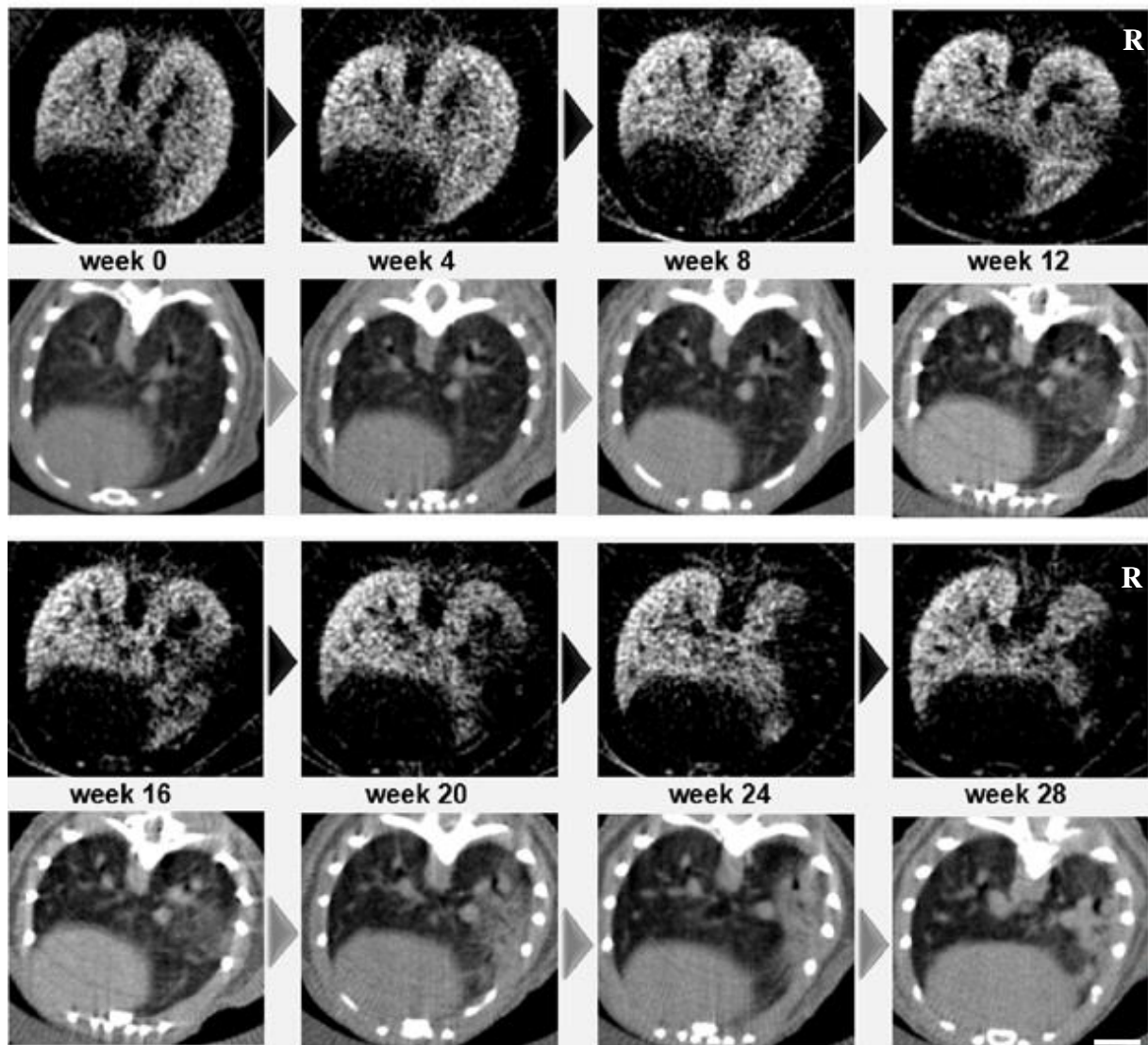


Abbildung 25: Vergleich des Verlaufs der Lungenveränderungen zwischen Dunkelfeldtomographien (obere Zeilen) und Absorptionsbasierten Tomographien (untere Zeile) einer mit 20 Gy an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Maus. Erste Veränderungen der Lungenstruktur zeigen sich in beiden Bildgebungsmodalitäten ab Woche 8. Hier ist in der lateralen rechten Lunge im Dunkelfeld eine diskrete Signalabschwächung zu sehen. In der Absorption wird an dieser Stelle eine leichte Verschattung des Lungengewebes deutlich. Im weiteren Zeitverlauf wird diese Veränderung der rechten Lunge wesentlich deutlicher. Die linke Lunge zeigt über die Zeit keine pathologischen Veränderungen. (Längsbalken: 5mm)

Beim Vergleich der Tomographien der anderen Mäuse ist zu beobachten, dass nach 24 Wochen verschiedene Schweregrade der Lungenveränderungen erreicht wurden, obwohl jede Maus die

gleiche Strahlendosis erhielt. Diese Unterschiede können jedoch lediglich anhand der Dunkelfeldtomographien festgestellt werden, da die absorptionsbasierten Tomographien keinen besonders klaren Unterschied beim Vergleich von fibrotischen und gesunden Lungen zeigen. Es lässt sich insbesondere in den Dunkelfeldtomographien ein volumetrischer Effekt beobachten, der eine Korrelation zwischen dem Bestrahlungsfeld und dem Ausmaß der Fibrose herstellt. Im Folgenden sind als Beispiel die Tomographien beider Bildgebungsmodalitäten von zwei ausgewählten Mäusen mit nur teilweise bestrahlten Lungen dargestellt.

Abbildung 26 zeigt Ausschnitte aus Tomographien beider Bildgebungsmodalitäten einer an der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus. Hierbei sind Absorption und Dunkelfeld im Zeitverlauf gegenübergestellt. Es sind bereits in der 12. Woche nach Bestrahlung Veränderungen der rechten Lunge zu erkennen. Am lateralen Rand der rechten Lunge ist ein Signalabbruch zu sehen. Auch weitere Teile der rechten Lunge zeigen sich mit einer Signalabschwächung im Dunkelfeld. Der Ausschnitt aus der Tomographie in der Absorptionsbildgebung legt in der 12. Woche noch keine eindeutigen Veränderungen dar. Im Falle der Absorption sind eindeutige strukturelle Veränderungen der Lunge erst ab Woche 20 zu erkennen. Hier zeigt sich im entsprechenden Ausschnitt der Tomographie eine Dichtezunahme mit Verschattung an der rechten unteren Lunge. Frühe strahlenbedingte Veränderungen können demnach etwas eindeutiger mit der Dunkelfeldbildgebung dargestellt werden.

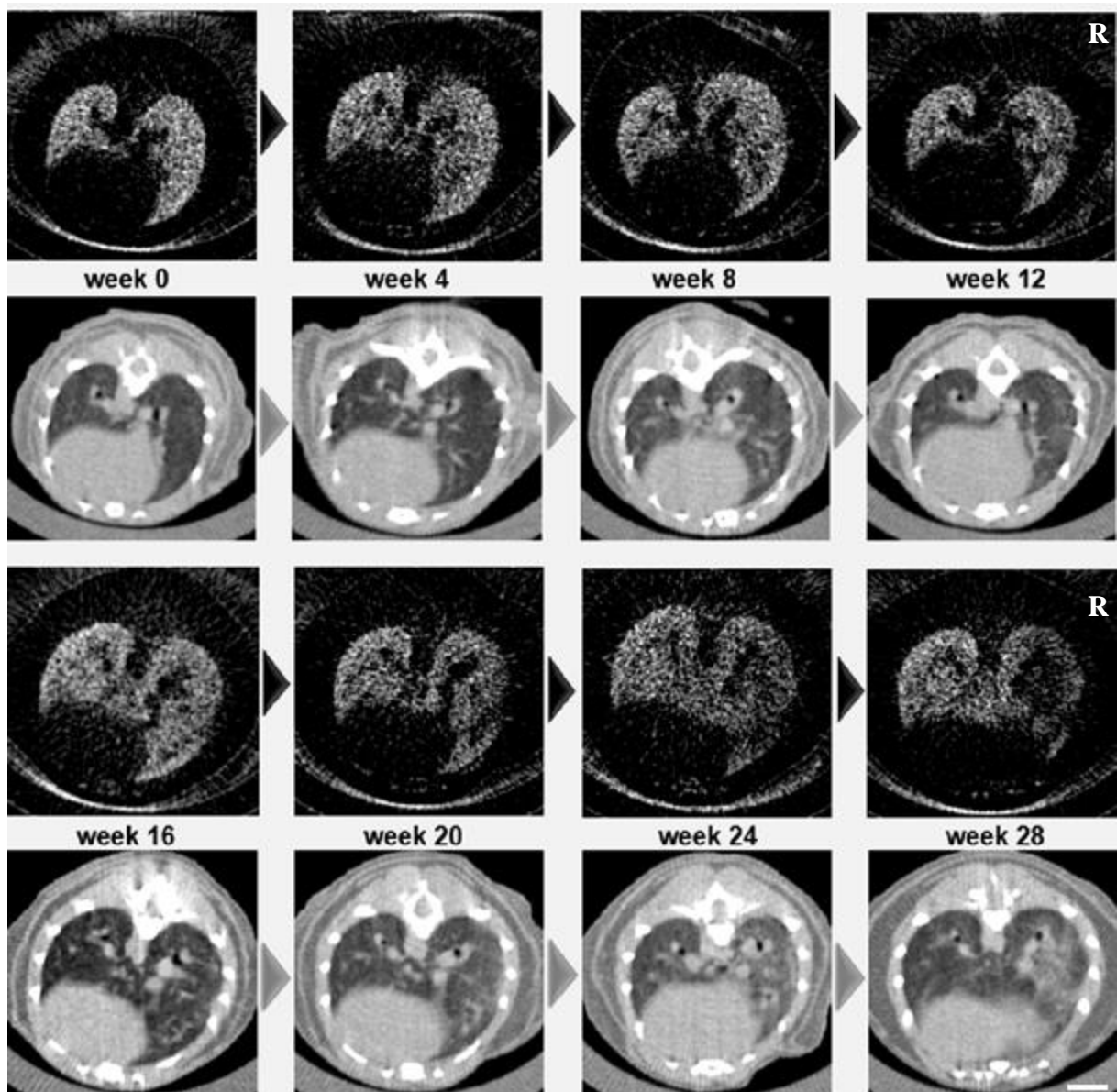


Abbildung 26: Vergleich des Verlaufs der Lungenveränderungen zwischen Dunkelfeldtomographien (obere Zeilen) und absorptionsbasierten Tomographien (untere Zeile) einer mit 20 Gy an der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus. Erste Veränderungen der Lungenstruktur zeigen sich in beiden Bildgebungsmodalitäten ab Woche 20. Hier ist in der lateralen rechten Lunge im Dunkelfeld ein Signalabbruch zu sehen. In der Absorption ist an dieser Stelle eine diskrete Verschattung des Lungengewebes sichtbar. Die linke Lunge indiziert über die Zeit keine pathologischen Veränderungen. (Längenbalken: 5mm)

Abbildung 27 stellt axiale Schnitte aus Tomographien beider Bildgebungsmodalitäten einer an der oberen rechten Lunge bestrahlten Maus dar. Hierbei sind Absorption und Dunkelfeld im Zeitverlauf gegenübergestellt. Im Gegensatz zu den anderen bestrahlten Mausgruppen, zeigten die an der oberen rechten Lunge bestrahlten Mäuse etwas diskretere Lungenveränderungen nach der Bestrahlung. Erste strukturelle Veränderungen des Lungengewebes sind in den

Dunkelfeldaufnahmen ab der 24. Woche erkennbar. Diese zeigen sich mit einer leichten Signalabschwächung an der rechten Lunge. Entsprechende strahlenbedingte Veränderungen fallen auch in der Absorptionsbildgebung erst ab der 24. Woche auf. Hier kam es zu einer leichten Verschattung über der rechten Lunge. Die linke Lunge der Maus zeigt im Zeitverlauf keine pathologischen Veränderungen in beiden Bildgebungsmodalitäten. Insgesamt sind diese in der Absorptionsbildgebung schwieriger zu erfassen als in der Dunkelfeldbildgebung. Zudem erfordert die Analyse der Absorptionsaufnahmen auch eine Begutachtung der dazugehörigen Voraufnahmen.

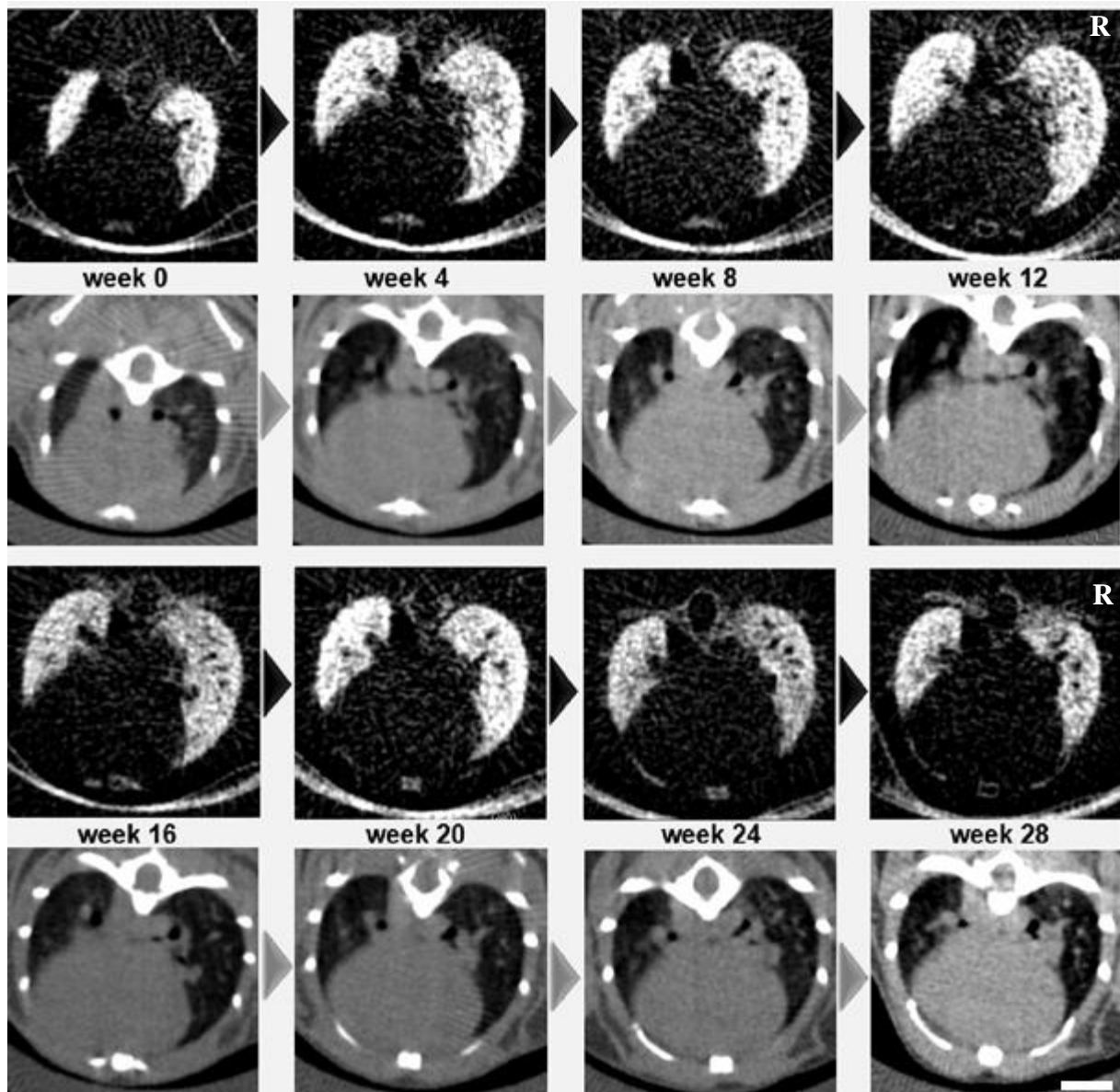


Abbildung 27: Vergleich des Verlaufs der Lungenveränderungen zwischen Dunkelfeldtomographien (obere Zeilen) und Absorptionsbasierten Tomographien (untere Zeile) einer mit 20 Gy an der oberen rechten Lunge bestrahlten Maus. Die strahleninduzierten Veränderungen der Lungenstruktur sind bei dieser Maus sehr diskret. Erst in Woche 24 zeigt sich im Dunkelfeld zunächst eine leichte

Signalabschwächung in der dorsalen rechten Lunge, welche in Woche 28 etwas deutlicher wird. In der Absorption kann in Woche 24 dorsal in der rechten Lunge eine Verschattung des Lungengewebes erkannt werden, welche ebenfalls in Woche 28 etwas deutlicher wird. Die linke Lunge zeigt über die Zeit keine pathologischen Veränderungen. (Längsbalken: 5mm)

Abbildung 28 zeigt axiale Schnitte einer Maus der Kontrollgruppe mit einer Gegenüberstellung beider Bildgebungsmodalitäten. Sowohl in der Absorption als auch im Dunkelfeld sind über den Verlauf der Versuchsdauer keine Veränderungen sichtbar. In der Absorption treten in den Tomographien von Woche 0 bis Woche 28 keine Verschattungen beider Lungen auf. Auch im Dunkelfeld sind in dieser Zeit keine Signalabbrüche oder eine Signalabschwächung der Lungenstruktur sichtbar. Beide Lungen zeigen sich im Dunkelfeld in allen durchgeführten Tomographien mit einer vergleichbaren Signalstärke. Dies entspricht den Erwartungen, da die Kontrollgruppe nicht bestrahlt wurde und demnach von keinem strahleninduzierten Lungenschaden auszugehen ist. Die gesunden Lungen der Mäuse zeigen auch im Zeitverlauf keine pathologischen Veränderungen.

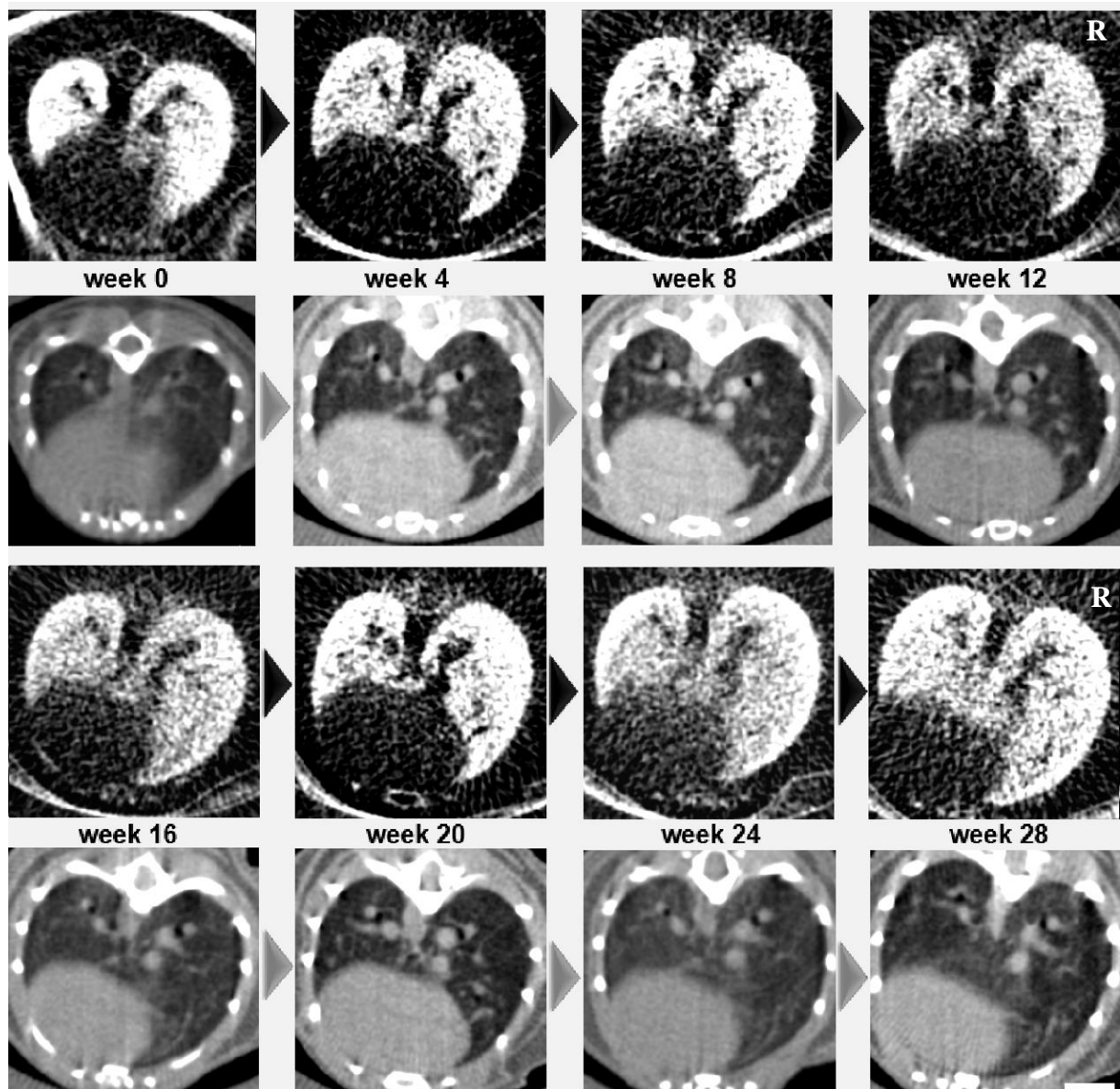


Abbildung 28: Vergleich des Verlaufs der Lungenveränderungen zwischen Dunkelfeldtomographien (obere Zeilen) und Absorptionsbasierten Tomographien (untere Zeile) einer nicht bestrahlten Maus aus der Kontrollgruppe. Über den Verlauf von Woche 0 bis Woche 28 sind keine Veränderungen des Lungengewebes erkennbar. Es handelt sich hierbei um gesunde Mauslungen. (Längenbalken: 5mm)

4.2 Quantitative Auswertung

In der quantitativen Auswertung der Grauwerte über einer ROI wurden zunächst zwei gleichgroße, quadratische ROIs in beiden Lungen ausgewählt. Die Veränderungen der Grauwerte in der vereinfachten ROI Darstellung zeigt einen eindeutigen Verlauf in den Dunkelfeldbildern. In der Absorptionsbildgebung ist die Veränderung der Grauwerte und deren Verlauf weniger markant (siehe Abbildung 29). Eine eindeutige Veränderung der Grauwerte wird lediglich in einer einzelnen an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Maus deutlich. Hier erkennt man im Zeitraum zwischen 8 und 12 Wochen einen deutlichen Anstieg der Grauwerte für die Absorption.

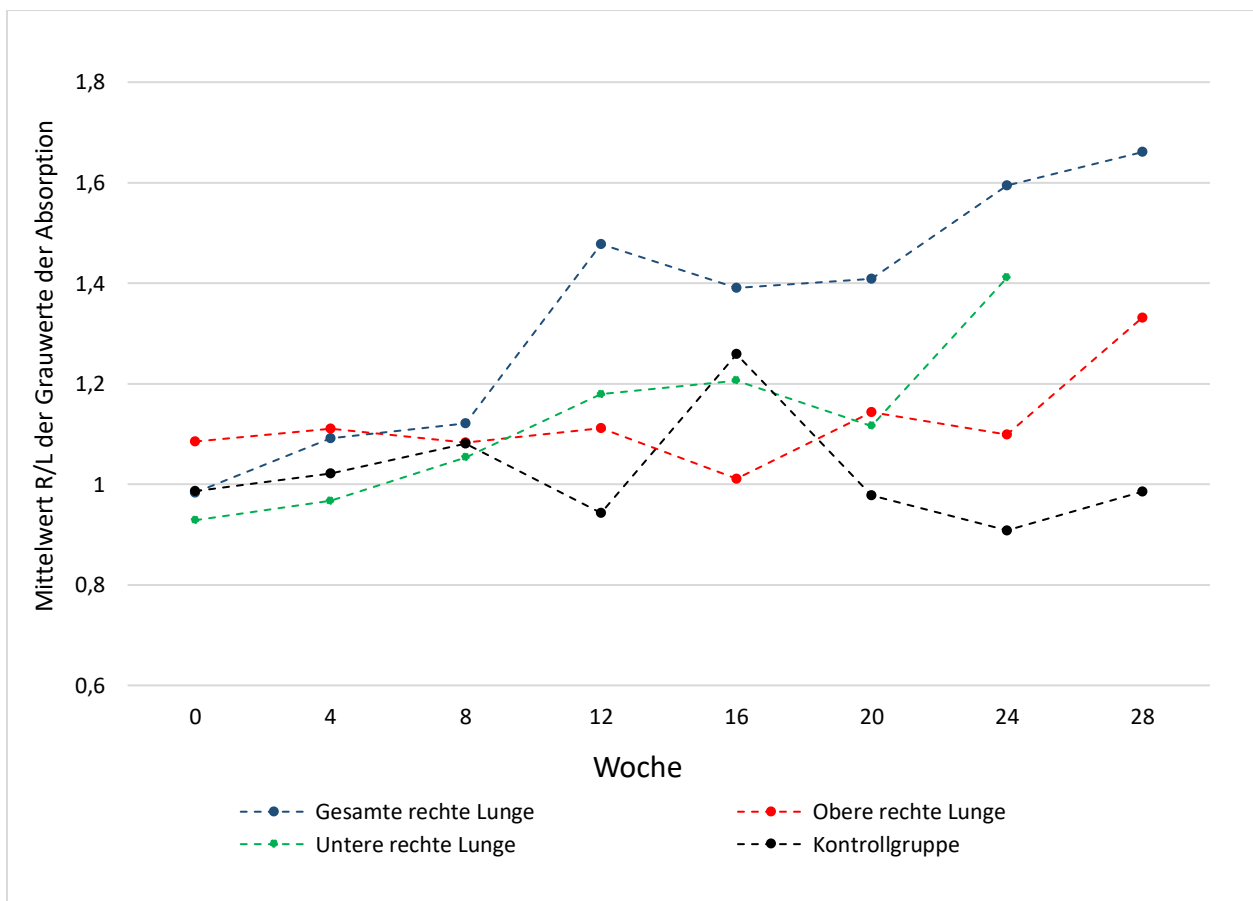


Abbildung 29: Entwicklung der Grauwerte in der Absorptionsbildgebung für ausgewählte Mäuse aller vier Gruppen. Bis auf eine an der ganzen rechten Lunge bestrahlte Maus, zeigt sich in der Absorption

eine geringe Tendenz der mittleren Grauwerte über die Zeit. In der Kontrollgruppe fallen keine Veränderungen der Grauwerte auf.

Mit derselben vereinfachten Analyseverfahren lassen sich bei der Dunkelfeldbildung eindeutige Veränderungen der Grauwerte im Zeitverlauf aufzeigen (Abbildung 30). Diese zeigen sich besonders ausgeprägt in der an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Gruppe. Hier lässt sich für beide Mäuse eine Veränderung der Grauwerte von etwa 0,8 im Vergleich von Woche 0 und Woche 28 beobachten. Eine besonders starke Veränderung der Grauwerte zeigt sich bei diesen Mäusen insbesondere zwischen den Wochen 16 und 20, mit einem Unterschied der Grauwerte von etwa 0,3. Die an der unteren rechten Lunge (Abweichung von etwa 0,5) und an der oberen rechten Lunge (Abweichung von etwa 0,2) bestrahlten Mäuse zeigen schwächer ausgeprägte Veränderungen. Diese sind dennoch deutlich von der Kontrollgruppe abzugrenzen. Diese zeigt sich mit um 1 schwankenden Werten, ohne signifikante Veränderungen.

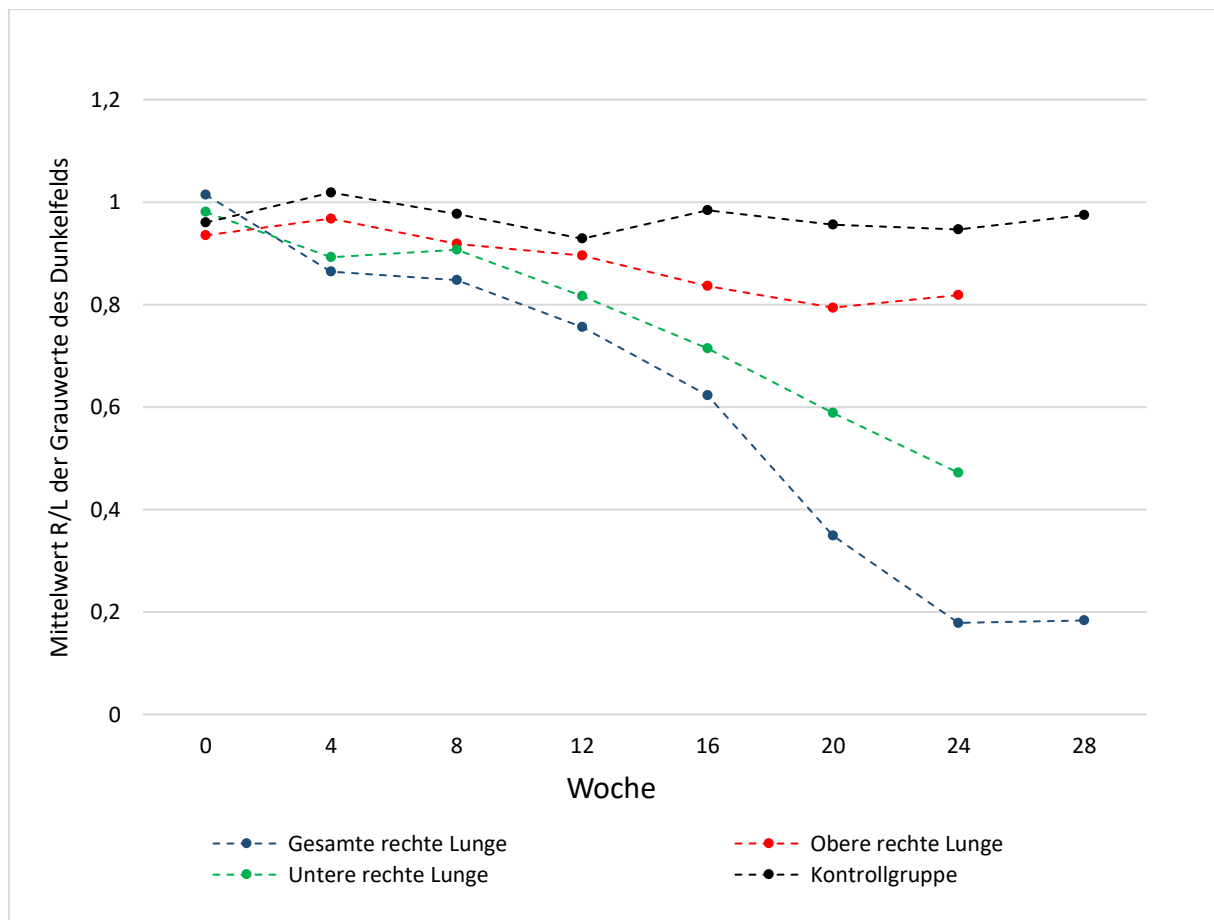


Abbildung 10: Entwicklung der Grauwerte in der Dunkelfeldbildung für ausgewählte Mäuse aller vier Gruppen. Im Dunkelfeld zeigt sich eine deutliche Tendenz der mittleren Grauwerte der bestrahlten Mäuse über die Zeit. In der Kontrollgruppe fallen keine Veränderungen der Grauwerte auf.

In der weiteren Grauwertbestimmung mit in den Radiographien als ROI komplett umrandeten Lungen zeigten sich auch bei genaueren Analysemethoden ähnliche Ergebnisse. Abbildung 31 stellt die Entwicklung der Ratio R_A für alle vier Versuchsgruppen im Zeitverlauf bei den Absorptionsradiographien dar. In der Kontrollgruppe kommt es zu keiner Veränderung von R_A im Laufe der Zeit. Dies war zu erwarten, da bei der unbestrahlten Gruppe kein Bestrahlungsschaden vorkommen sollte. Die restlichen Gruppen der bestrahlten Mäuse zeigen jedoch keine klare Tendenz von R_A .

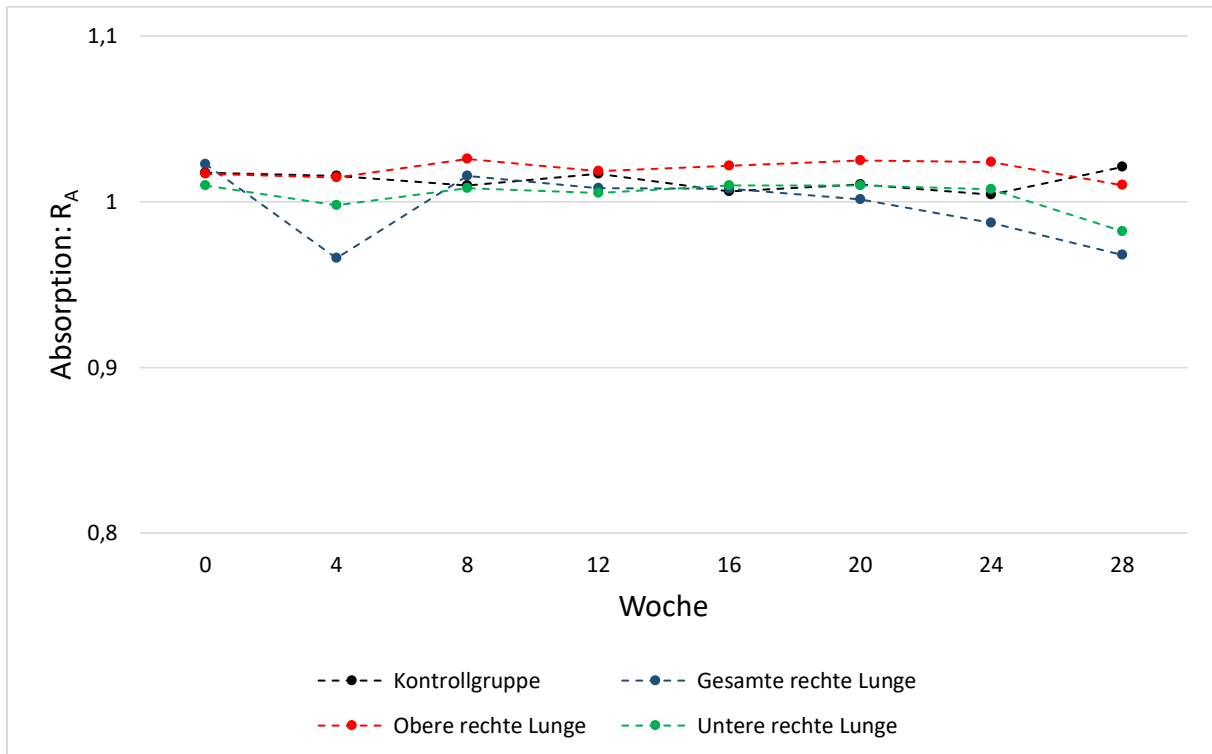


Abbildung 31: Entwicklung von R_A in den absorptionsbasierten Radiographien im Zeitverlauf. Eine klare Tendenz der Grauwerte über den Zeitverlauf ist nicht festzustellen. Ein Volumeneffekt ist nicht detektierbar.

Abbildung 32 zeigt denselben Graphen für die Dunkelfeldradiographien. Die Kontrollgruppe zeigt abermals keine signifikante Veränderung von R_{DF} . Bei den komplett bestrahlten Lungen hingegen ist die Veränderung von R_{DF} am deutlichsten sichtbar. R_{DF} ist im Zeitverlauf stärker in den unten rechts bestrahlten Lungen gesunken, als in den oben rechts bestrahlten Lungen. Auch dies spricht für einen Volumeneffekt, denn die Bestrahlungsfelder bei den an den unteren rechten Lungen bestrahlten Mäusen waren größer. Mit dieser sichtbaren Abstufung von der stärksten Veränderung in der komplett bestrahlten rechten Lunge, über die unten rechts bestrahlte Lunge bis zur oben rechts bestrahlten Lunge lässt sich der Volumeneffekt klar erkennen.

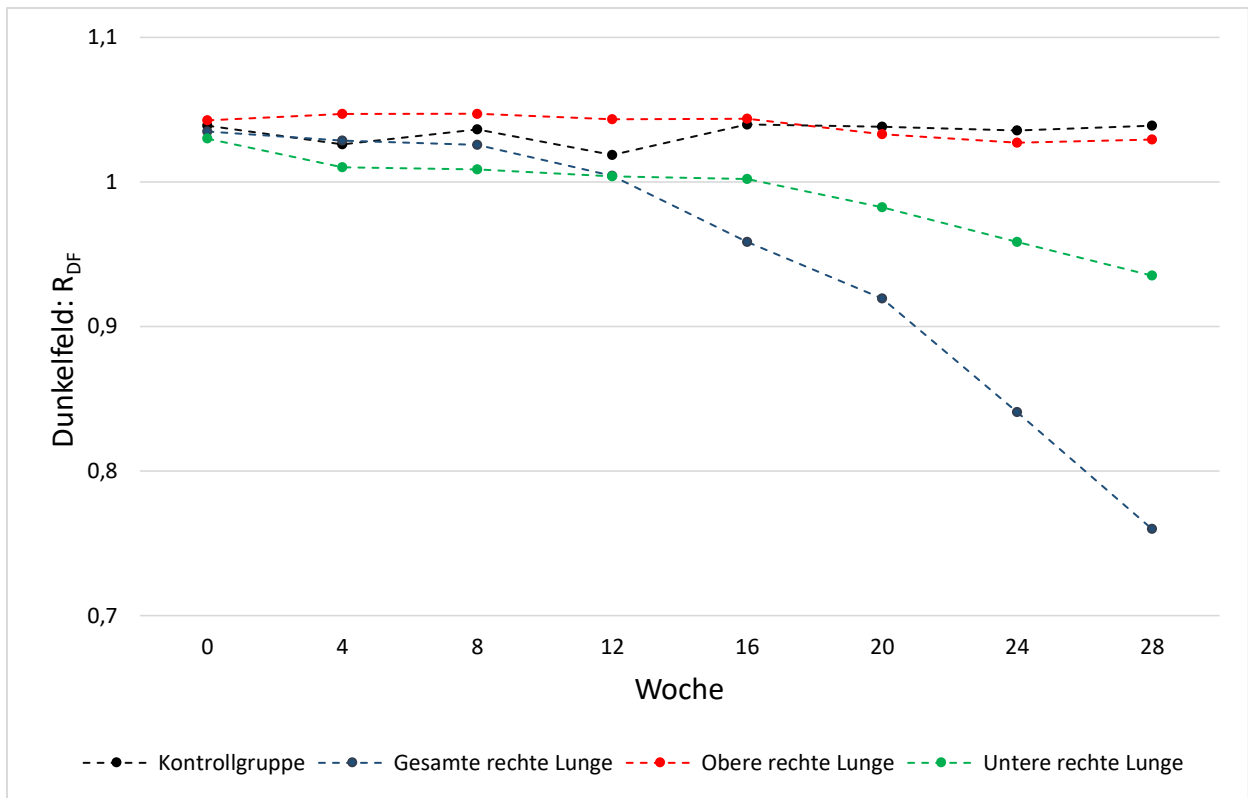


Abbildung 32: Entwicklung von R_{DF} in den Dunkelfeldradiographien in Zeitverlauf. Es zeigt sich eine klare Entwicklung der mittleren Grauwerte der bestrahlten Mäuse. Ein Volumeneffekt ist deutlich zu sehen. Die Grauwerte bleiben in der Kontrollgruppe unverändert.

Um einen Vorteil des Dunkelfelds gegenüber der Absorption zu verdeutlichen, lassen sich die in quantitativen Analyse erfassten Werte zudem in einem Säulendiagramm jeweils für beide Bildgebungsmodalitäten gegenüberstellen. Hier wurden die Werte der an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäuse vor der Bestrahlung (Woche 0) und 24 Wochen nach der Bestrahlung verglichen. Als Referenz wurde dieselbe Darstellung mit den Mäusen der Kontrollgruppe erstellt.

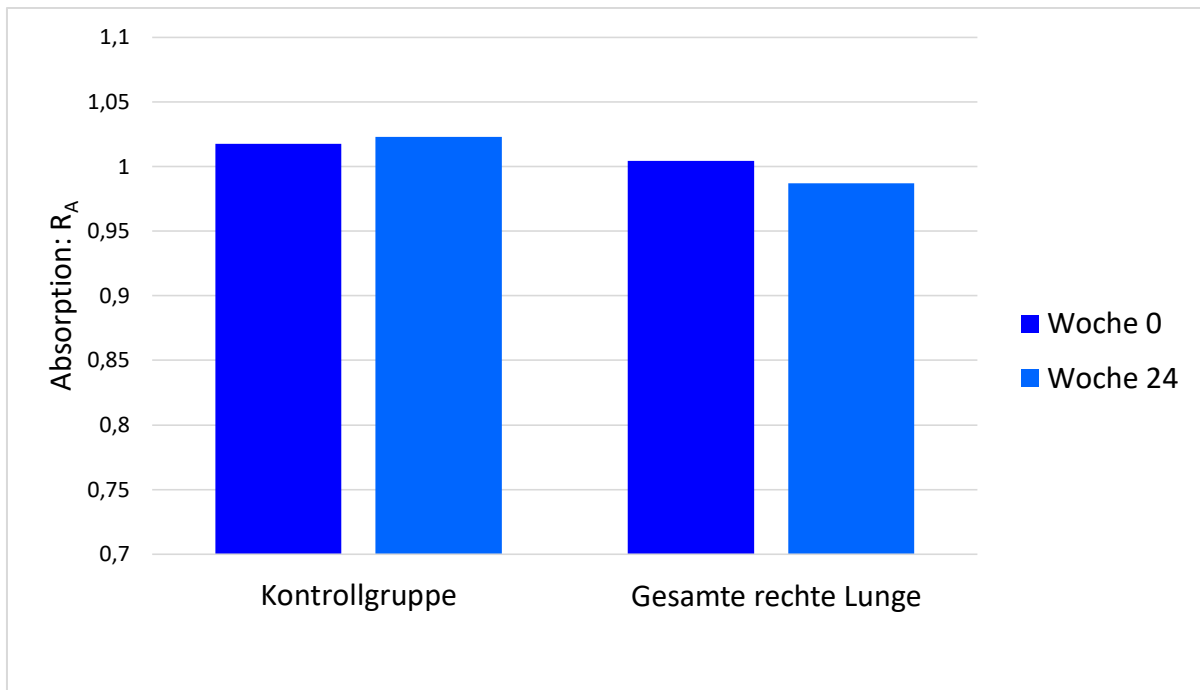


Abbildung 33: Entwicklung von R_A in den Wochen 0 und 24 in der Kontrollgruppe und den komplett an der rechten Lunge bestrahlten Mäusen.

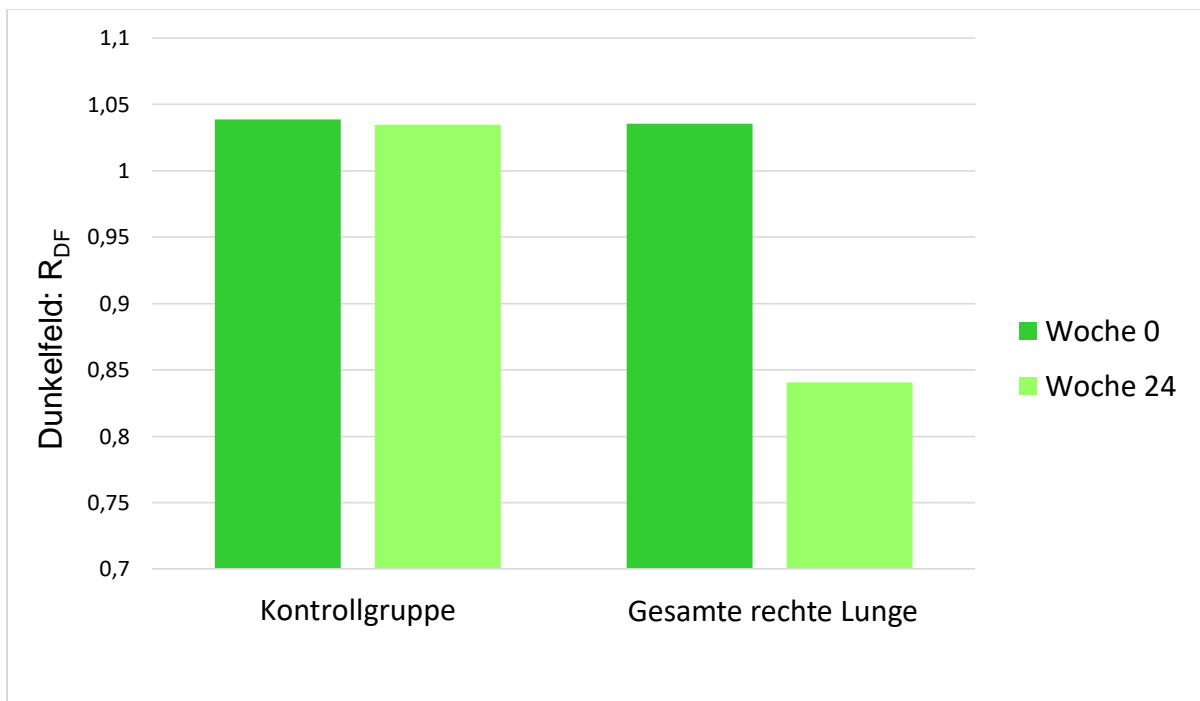


Abbildung 34: Entwicklung von R_{DF} in den Wochen 0 und 24 in der Kontrollgruppe und den komplett an der rechten Lunge bestrahlten Mäusen.

Auf der linken Seite von Abbildung 33 kann das Verhältnis R_A für beide Gruppen vor und 24 Wochen nach der Bestrahlung sehen. In der Kontrollgruppe wurde kein Unterschied von R_A vor und nach der 24 Wochen beobachtet, was zu erwarten war, da es hierbei zu keinem Schaden

durch Bestrahlung gekommen ist. Die Gruppe der bestrahlten Mäuse zeigt eine kleine Verringerung von R_A nach 24 Wochen, was allerdings nicht signifikant ist. Das Verhältnis von R_A verändert sich von (1.03 ± 0.02) zu (1.00 ± 0.02) . Auf der rechten Seite von Abbildung 34 kann man denselben Vergleich für die Dunkelfeldradiographien sehen. Auch hier präsentiert die Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung des Verhältnisses R_{DF} von vor und 24 Wochen nach der Bestrahlung. Eine signifikante Veränderung kann allerdings in der bestrahlten Gruppe beobachtet werden. Das Verhältnis sinkt von (1.02 ± 0.03) zu (0.81 ± 0.09) . Die größeren Standardfehler der Mittelwerte im Dunkelfeld sind darauf zurückzuführen, dass die Veränderungen nach 24 Wochen bereits zu verschiedenen Schweregraden fortgeschritten sind. Das Dunkelfeld zeigte demnach eine erhöhte Sensitivität in Bezug auf frühe Veränderungen des Lungengewebes, welche zur selben Zeit in der Absorption noch nicht detektiert werden können. Diese Ergebnisse entsprechen den physikalischen Erwartungen. Als Folge der Bestrahlung kommt es zu einer lokalen Entzündung in der Lunge, gefolgt von einem Lungenödem. Zuletzt kann sich eine Lungenfibrose entwickeln. Fibrotisches Gewebe entspricht Narbengewebe, sodass die alveoläre Struktur der Lunge dichter wird. Die erhöhte Dichte des Gewebes steigert auch die Absorption von Röntgenstrahlen, was wiederum die gemessene Absorption senkt (und ebendiese ist das, was eigentlich in Abbildung 31 und 33 als absorptionsbasierte Radiographie dargestellt wird)

Der Mittelwert der Absorption der rechten Lunge μ_{Right} ist herabgesetzt, was zu einer Reduktion des Verhältnisses R_A führt. Die erhöhte Dichte führt auch zu einer Reduktion der Luft-Gewebe Grenzen in der Lunge. Diese Luft-Gewebe Grenzen sind die Grundlage der Dunkelfeldbildgebung. Und da Anzahl dieser Grenzflächen durch die Vernarbung des Lungengewebes reduziert ist, ist auch das Signal des Dunkelfelds reduziert. Auch hier sinkt μ_{Right} im Verhältnis zu μ_{Left} , was zu einer Senkung von R_{DF} führt. Der Vergleich der Säulendiagramme in den Abbildungen 33 und 34 legen demnach nahe, dass die Dunkelfeldbildgebung sensitiver für Veränderungen der Alveolarstruktur der Lunge ist als die absorptionsbasierte Radiographie.

4.3 Histologie

Zusätzlich zur Bildgebung wurden die Mäuselungen nach Abschluss der Bildgebungsreihe in Woche 36 auch histologisch analysiert. Hierbei können die in beiden Bildgebungsmodalitäten sichtbaren Veränderungen, manifesten fibrotischen Veränderungen, die in der HE Färbung

sichtbar sind zugeordnet werden (Abbildung 35). In der betroffenen Lunge ist eine Verdickung der Alveolarsepten zu beobachten. Der fibrotische Prozess ist durch die Rotfärbung der betroffenen Gebiete sichtbar. Das rotfärbende Eosin deutet auf dort entstandene Kollagenablagerungen hin. Zudem ist eine Zerstörung der Alveolarstruktur im betroffenen Areal sichtbar. Dies zeigt sich durch eine Gewebeerdichtung und zusammengefallene Alveolarsepten. Im histologischen Präparat ist das fibrotische Areal am Rande der Lungen zu sehen. Auch dies entspricht unseren Beobachtungen aus den Bildgebungen. In den Präparaten der Lungen aus der Kontrollgruppe konnten keine entsprechenden Veränderungen entdeckt werden, woraus zu schließen ist, dass die Lungen gesund blieben (Abbildung 36).

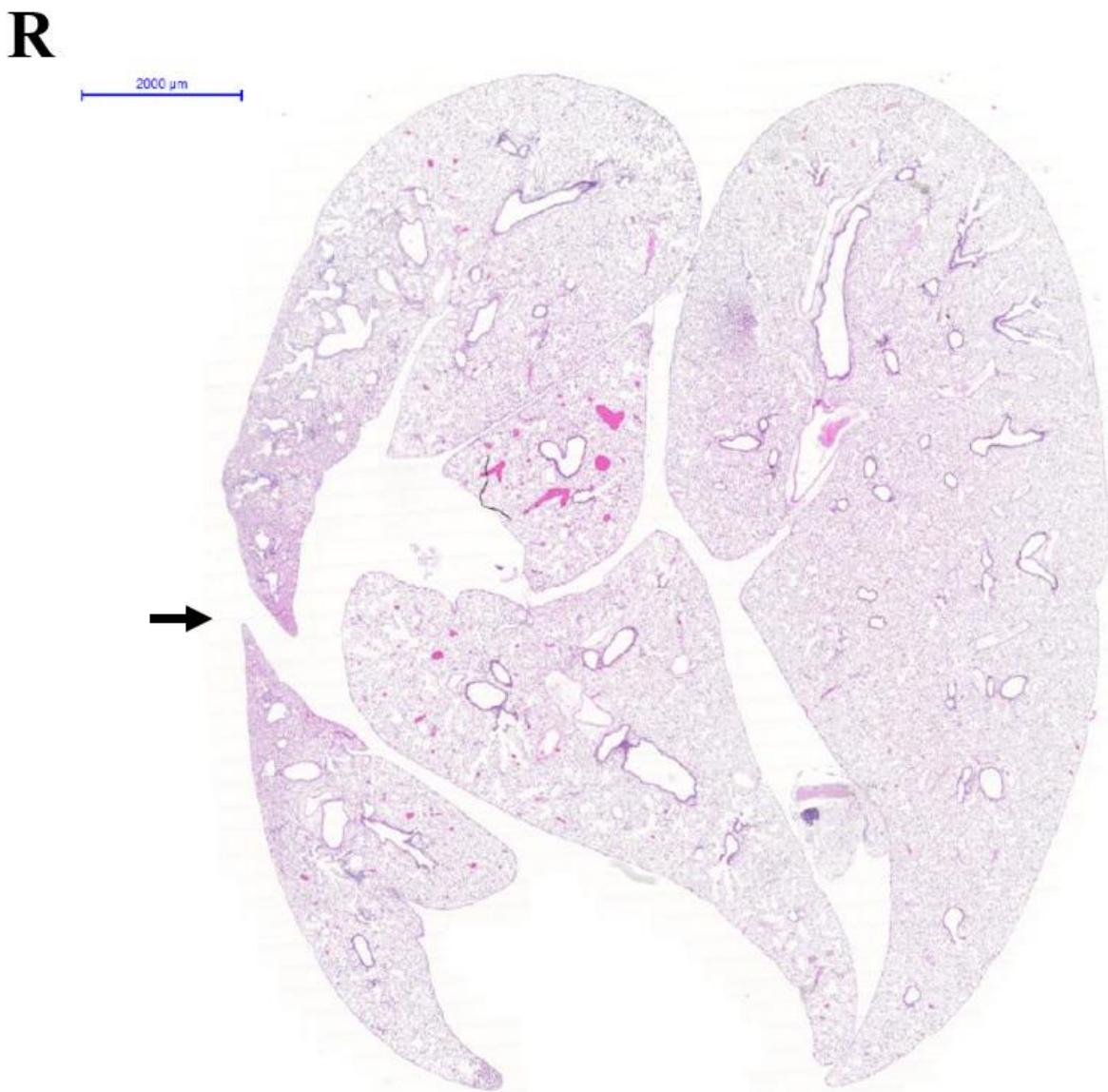


Abbildung 35: Histologisches Präparat der ganzseitig bestrahlten rechten Lunge in HE Färbung. (Maus 20 Gy 1) In der rechten Lunge ist der fibrotische Umbau des Gewebes als Rotfärbung der

Kollagenablagerungen deutlich sichtbar (Pfeil). Die linke Lunge zeigt sich mit einer physiologischen Struktur mit gesunden Alveolen. (Längensbalken: 2000 μm)

R



Abbildung 36: Histologisches Präparat der unbestrahlten Lunge in HE Färbung (Maus 0 Gy 1). Es sind keine Veränderungen der Lungenstruktur sichtbar. Die Alveolen beider Lungen sind intakt. Es sind keine vermehrten Kollagenablagerungen sichtbar. (Längensbalken: 2000 μm)

Bei den histologischen Präparaten der an der unteren rechten Lunge bestrahlten Mäuse ist in einem von drei Fällen eine Lungenfibrose feststellbar (Abbildung 37-39). Im Präparat der Lunge ist hier fibrotisches Gewebe sichtbar. Dieses zeigt sich wie auch bei den an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäusen ebenfalls am Rand der Lunge (Abbildung 37). Auch hier manifestiert sich die Fibrose mit einer deutlichen Rotfärbung des veränderten Gewebes und einer Zerstörung der Alveolarstruktur. Die Tatsache, dass nicht alle Mäuse der nur an der unteren rechten Lunge bestrahlten Gruppe eine manifeste Fibrose aufweisen, deutet auf die

unterschiedliche Entwicklung der Lungenfibrose in den verschiedenen Mäusen hin (Abbildung 38+39). Andererseits kann das ein Hinweis auf den volumetrischen Effekt sein. So entwickelt sich bei den nur teilweise bestrahlten Lungen nicht zwingend bei allen Mäusen eine Lungenfibrose bzw. die Zeit bis zur kompletten Ausprägung der Fibrose ist deutlich länger als bei den komplett bestrahlten rechten Lungen. Wie auch bei den komplett bestrahlten rechten Lungen zeigen sich auch hier die fibrotischen Veränderungen eher in den lateralen (bzw. hier basalen) Arealen. Dies entspricht also den Ergebnissen der Tomographien, in denen insbesondere in den lateralen Arealen der rechten Lunge die Fibrose besonders stark ausgeprägt zu sein schien.

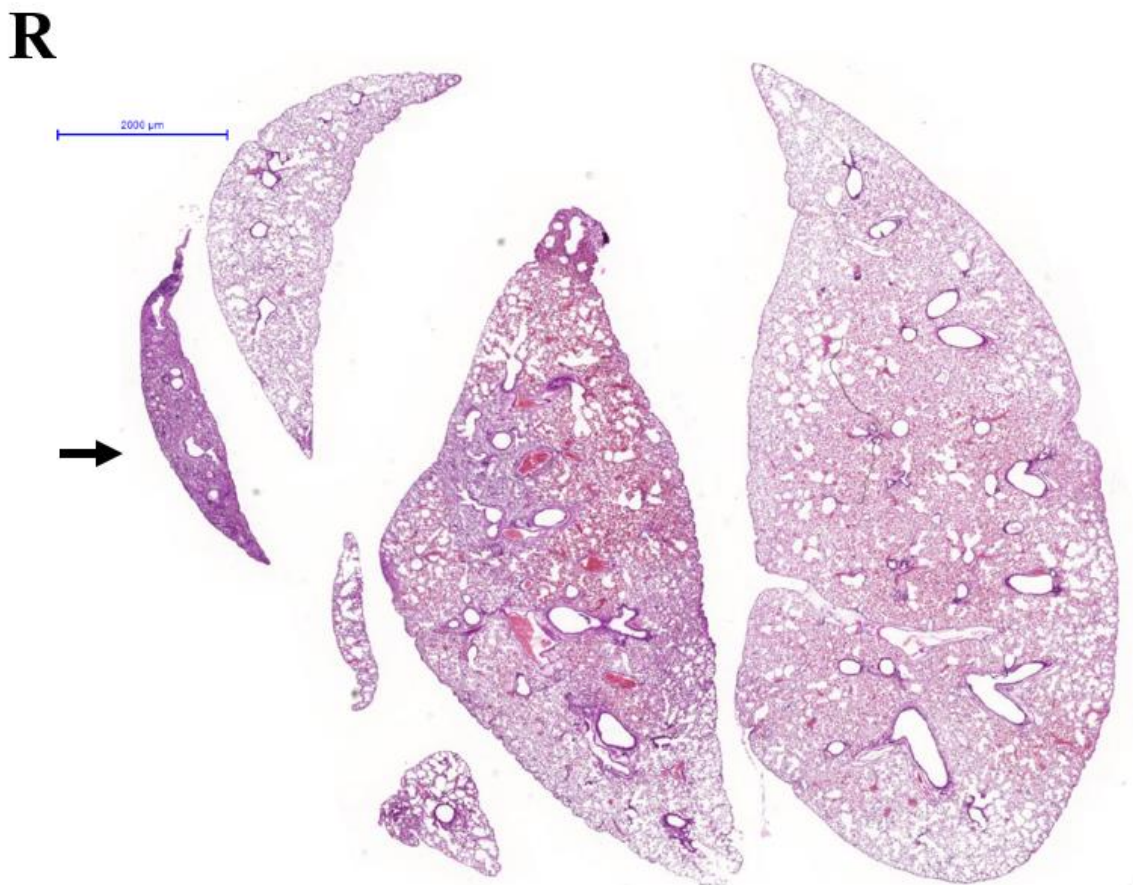


Abbildung 37: Histologisches Präparat einer mit 20 Gy an der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus (Maus 20 Gy Unten 1). Am Rand der rechten Lunge ist fibrotisches Lungengewebe als deutliche Rotfärbung zu erkennen (siehe Pfeil). Die Struktur der Alveolen ist hier aufgehoben. Der linke Lungenflügel zeigt keine vermehrten Kollagenablagerungen. Die Struktur der Alveolen ist hier intakt. (Längsbalken: 2000 µm)

R

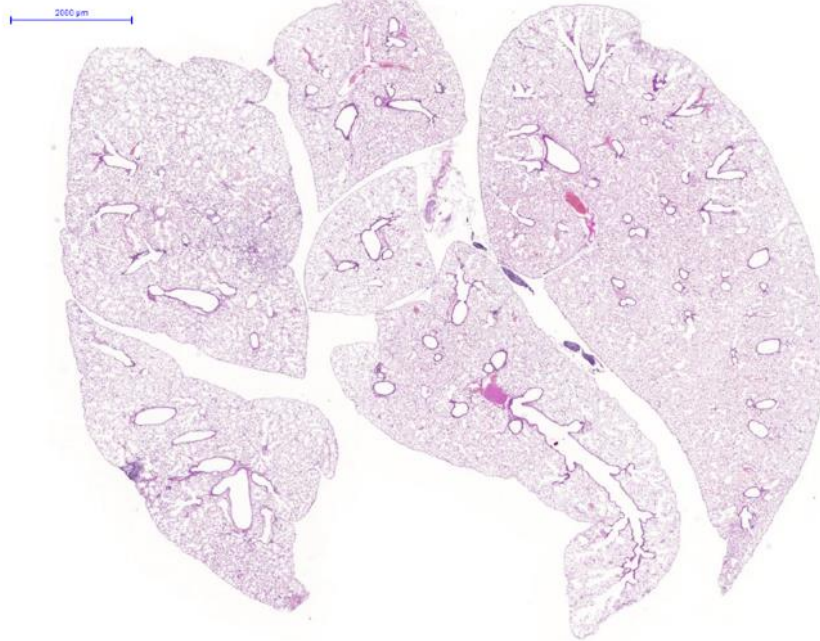


Abbildung 38: Histologisches Präparat einer mit 20 Gy an der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus (Maus 20 Gy Unten 3). Es sind keine vermehrten Kollagenablagerungen im Rahmen von fibrotischen Lungenveränderungen erkennbar. Die Alveolarstruktur ist in beiden Lungen intakt. (Längenbalken: 2000 μm)

R

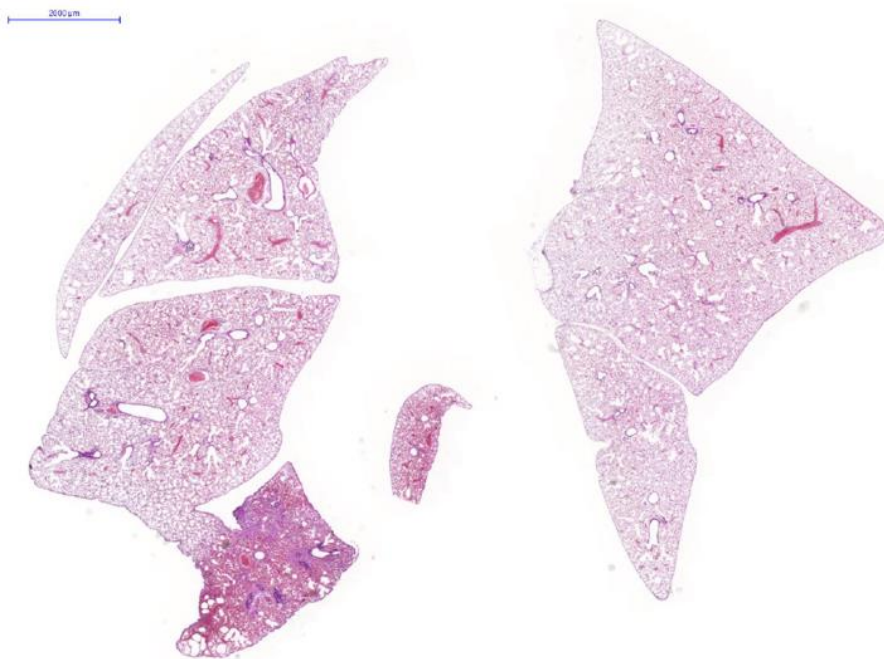


Abbildung 39: Histologisches Präparat einer mit 20 Gy an der unteren rechten Lunge bestrahlten Maus (Maus 20 Gy Unten 6). Es sind keine vermehrten Kollagenablagerungen im Rahmen von fibrotischen

Lungenveränderungen erkennbar. Die Alveolarstruktur ist in beiden Lungen intakt. (Längenbalken: 2000 μm)

Die an der oberen rechten Lunge bestrahlten Mäuse zeigten im histologischen Präparat der Lunge keine offensichtlichen fibrotischen Veränderungen (Abbildung 40). In einem Präparat ist jedoch ein kardial bedingtes Ödem zu beobachten (siehe Abbildung 41). Dieses kann auch ein Hinweis auf vorhandene Schädigungen der Lunge sein, wie etwa eine Strahlenpneumonitis oder gar eine Lungenfibrose. Diese könnten über einen erhöhten pulmonalen Widerstand zu einem Vor- und Rückwärtsversagen des Herzens geführt haben. Die daraus möglicherweise resultierende Links- bzw. Globalherzinsuffizienz kann wiederum zu einer Entwicklung von Lungenödemem führen.

Möglich wäre auch ein direkter Strahlenschaden des Herzens (obwohl dies durch eine herzschonende Bestrahlung vermieden werden sollte). Auch dieser kann über strahlenbedingt Herzmuskelveränderungen zu einer Herzinsuffizienz und konsekutiv zu Lungenödemem führen.

R

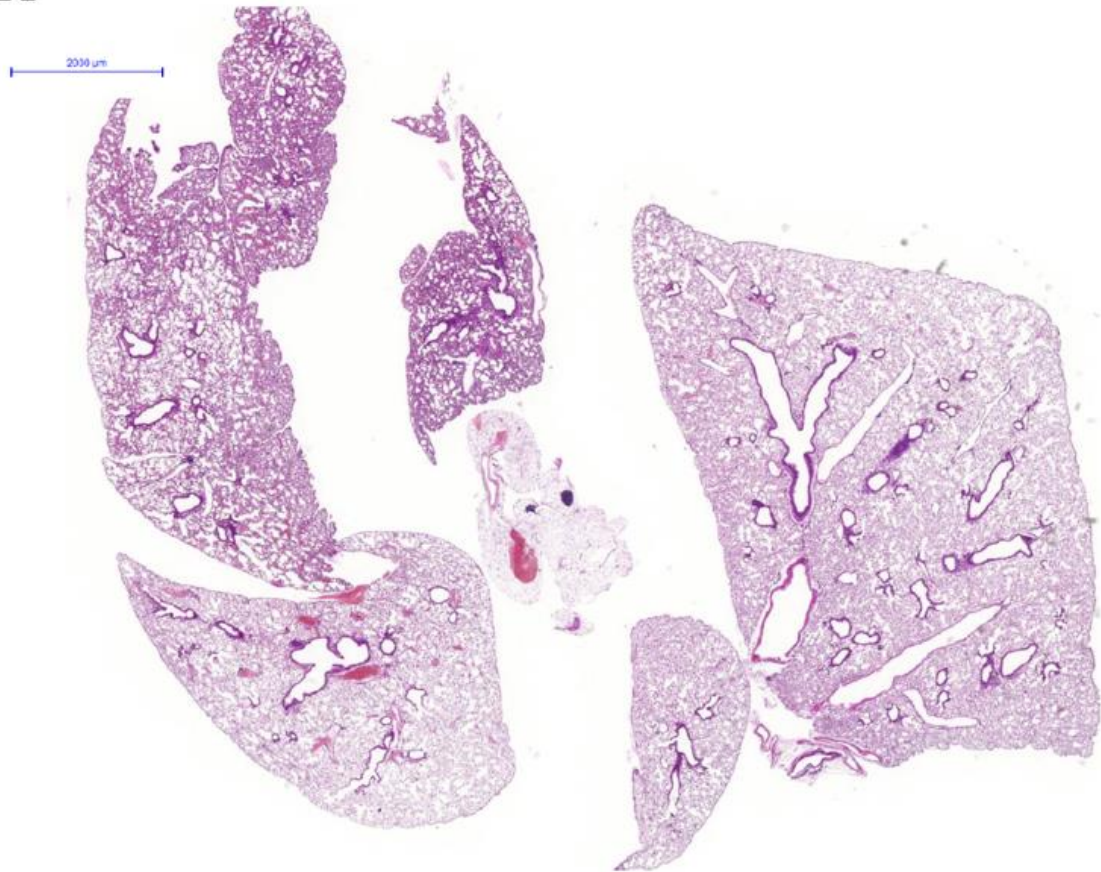


Abbildung 40: Histologisches Präparat einer mit 20 Gy an der oberen rechten Lunge bestrahlten Maus (Maus 20 Gy Oben 6). Es sind keine vermehrten Kollagenablagerungen im Rahmen von fibrotischen Lungenveränderungen erkennbar. Die Alveolarstruktur ist in beiden Lungen intakt. (Längsbalken: 2000 μm)

R

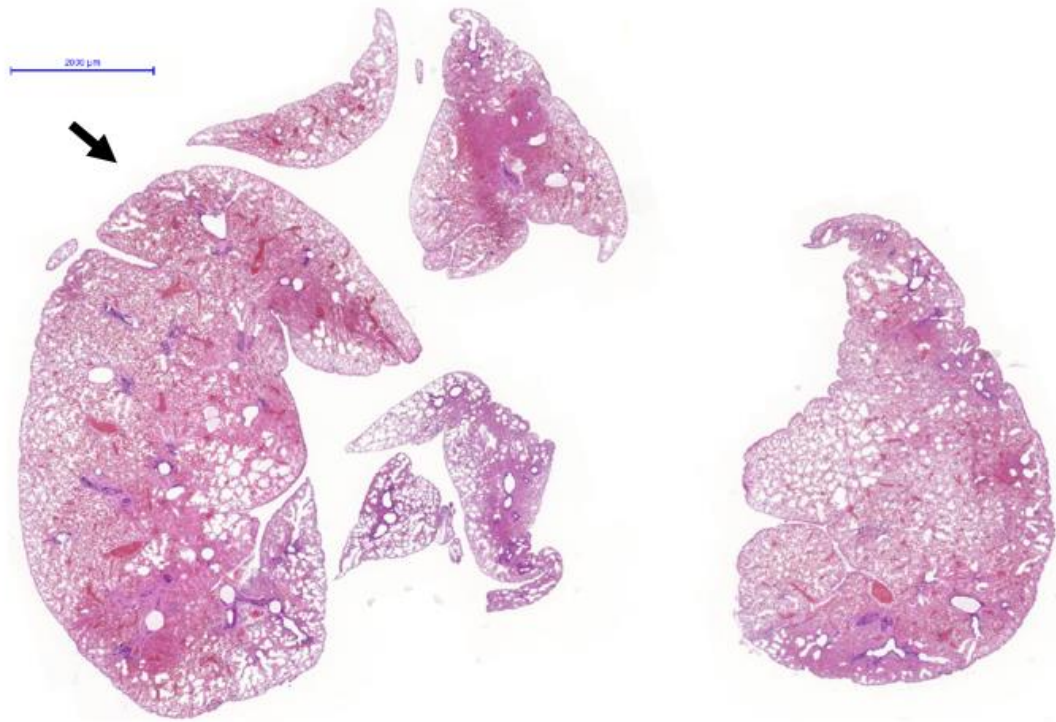


Abbildung 41: Histologisches Präparat einer mit 20 Gy an der oberen rechten Lunge bestrahlten Maus (Maus 20 Gy Oben 1). Es sind keine fibrotischen Lungenveränderungen erkennbar. Feststellbar ist jedoch ein kardial bedingtes Ödem. (Längenbalken: 2000 µm)

5. Diskussion

In unserer Studie untersuchten wir die Vorteile der Dunkelfeldbildgebung gegenüber der konventionellen Absorptionsbildgebung zur Detektion von strahleninduzierter Lungenfibrose bei 24 Mäusen der Tierart C57BL/6. Diese wurden in vier Gruppen mit verschiedenen Bestrahlungsarealen aufgeteilt: Ganze rechte Lunge, obere rechte Lunge, untere rechte Lunge und die unbestrahlte Kontrollgruppe. Entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit wurden sie mit 20 Gy am ausgewählten Areal bestrahlt. Jeweils nach der Bestrahlung wurde in monatlichen Abständen für 28 Wochen eine Bildgebung mit dem Röntgen Bildgebungsgerät SkyScan 1190 Phasenkontrast MicroCT durchgeführt. Dieses kann neben der Dunkelfeldbildgebung auch absorptionsbasierte Tomographien in derselben Sitzung durchführen, sodass beide Modalitäten miteinander verglichen werden können.

Durch die Darstellung der Streuung an Gewebeübergängen zeichnet die Dunkelfeldbildgebung die alveolären Strukturen der Lunge besonders gut ab. Bei Zerstörung der Lungenarchitektur mit Verlust der Alveolen zeigt sich an dieser Stelle eine Signalabschwächung die im Dunkelfeld als schwarzes Areal gut sichtbar wird. In der Absorptionsbildgebung manifestiert sich die Lungenfibrose durch die Dichtezunahme des Lungengewebes und die daraus resultierende Abnahme der Transmission durch eine Verschattung.

Die strahleninduzierten Veränderungen der Lungenstruktur waren bei allen bestrahlten Mäusen in beiden Bildgebungsmodalitäten sichtbar. Im Dunkelfeld wurden diese Veränderungen jedoch in frühen Stadien etwas deutlicher sichtbar als in der Absorptionsbildgebung. Diese Veränderungen ließen sich nach Beendigung der Bildgebungsstudie durch die histologische Analyse ausgewählter Mäuse einer Lungenfibrose zuordnen.

5.1 Vergleich mit Fachliteratur

Im Vergleich zu anderen Studien führte unser Modell mit ionisierender Strahlung zu einer verzögerten Fibrogenese, die bis zu zwanzig Wochen dauerte. Hierbei ist hervorzuheben, dass bei Mäusen die Strahlensensibilität abhängig vom Stamm ist (Walkin, 2013). Die von uns verwendeten C57BL/6 Mäuse zeichnen sich durch eine stärkere Strahlensensibilität und eine dadurch bedingte Neigung zur Ausbildung einer Lungenfibrose aus. In vergleichbaren Studien wurde eine Lungenfibrose nach 24 (Dadrich et al., 2016) oder 30 Wochen (Bickelhaupt et al., 2017) erkennbar. Dabei wurde allerdings der gesamte Thorax mit 20 Gy bestrahlt. Es sind

Dosen von über 12 Gy erforderlich, damit nach 36 Wochen signifikante Mengen an Kollagenfasern produziert und bildgebungstechnisch detektiert werden können. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass bei Einzeldosen zwischen 12 Gy und 15 Gy, die an den gesamten Körper abgegeben werden, 20 Wochen nach der Bestrahlung eine Lungenfibrose auftreten kann (Rubin et al., 1995).

Die verzögerte Ausbildung der Lungenfibrose ließe sich demnach durch das kleinere Bestrahlungsfeld in unserem Versuch erklären. So wurden die Mäuse nur auf einer Lunge, beziehungsweise nur einem Teil einer Lunge bestrahlt, wohingegen in anderen Versuchen beide Lungen oder gar der gesamte Thoraxraum der Tiere bestrahlt wurden (Bickelhaupt et al., 2017; Dadrich et al., 2016; Rubin et al., 1995). Dies könnte das langsamere Fortschreiten des fibrotischen Umbaus des Lungengewebes bei den Mäusen in unserer Studie erklären. Zusätzlich muss hinzugefügt werden, dass der Beginn und das Fortschreiten der Fibrose für jede Maus individuell sind.

Bei vorherigen Studien zur Detektion der Lungenfibrose anhand von Dunkelfeldbildgebung wurde diese meist durch das Chemotherapeutikum Bleomycin induziert (K. Hellbach et al., 2017; Yaroshenko et al., 2015). Die Instillation von Bleomycin beschleunigt den fibrotischen Umbau des Lungengewebes deutlich, sodass schon nach nur zwei Wochen eine Schädigung der Lunge zu beobachten ist. Allerdings unterscheidet sich dieser Fibrosierungsprozess auf molekularer Ebene von der sich langsam entwickelnden strahleninduzierten Fibrose, die unser Forschungsschwerpunkt ist. Die Bleomycin-induzierte Fibrose bei Mäusen ist aus verschiedenen Gründen kein gutes Modell für die humane Fibrose. Zum einen erholen sich junge Mäuse häufig spontan von der durch Bleomycin verursachten Verletzung, während Menschen dies nicht tun (Tashiro et al., 2017). Außerdem ist das Verletzungsmuster bei Mäusen eher lokalisiert und beim Menschen diffus. So sollten in unserer Studie insbesondere die diskreten, frühen Veränderungen im Lungengewebe detektiert und untersucht werden, um die diagnostische Kapazität der Dunkelfeldbildgebung im Zeitverlauf zu untersuchen. So konnte unser Modell einer strahleninduzierten Lungenfibrose genauer nachstellen, was in der menschlichen Lunge nach der Bestrahlung vorgeht und kam auf diese Weise der Erkrankung beim Menschen näher (Jackson et al., 2012).

Weitere aktuelle Studien verwenden zum Nachweis einer Lungenfibrose bei Kleintieren Mikro-CT-Setups zur Bildgebungsdiagnostik. In diesen Studien wurde bestätigt, dass der Beginn strahleninduzierter Lungenveränderungen von der Dosis und der Größe des bestrahlten Volumens abhängt. Der Beginn einer fibrotischen Veränderung kann bei einem CT-Scan als

Abweichung der HU von einem Referenzwert einer Voraufnahme gemessen werden (Froese et al., 2007; Saito et al., 2012). Die Überprüfung von Lungenveränderungen kann neben der zuvor genannten quantitativen Bestätigung auch visuell durch den Untersucher, oder beispielsweise in Zusammenarbeit mit einem Radiologen durchgeführt werden (Scherer et al., 2017).

Weitere Bestätigungsmethoden von Veränderungen des Lungengewebes können Messungen der Atemfunktionen, die Histologie und die visuelle Bestätigung von Lungenveränderungen mit weiteren Bildgebungstechniken sein (Artaechevarria et al., 2011; Moore et al., 2008; Postnov et al., 2005; Saito et al., 2012). Eine Lungenfunktionsdiagnostik ist allerdings unspezifisch und erlaubt keine genauere Detektion der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Gewebeschäden. Die histologische Betrachtung eignet sich nur zur finalen Bestätigung bei Versuchsende, da sie wiederholte und longitudinale Messungen des Krankheitsverlaufs verhindert (Ruscitti et al., 2017). Auch eine diagnostische Biopsie mit histologischer Sicherung ist in unserem Fall zu diagnostischen Zwecken nicht praktikabel.

5.2 Studienergebnisse

In der qualitativen Analyse der Daten aus beiden Bildgebungsmodalitäten zeigten sich erste strukturelle Veränderungen bereits nach 8-12 Wochen. Diese konnten visuell bei den an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäusen bestätigt werden. Bei der Mehrheit der bestrahlten Mäuse traten diese Veränderungen entsprechend nach 20 Wochen auf. Diese sind in beiden Bildgebungsmodalitäten sichtbar. Im Dunkelfeld hingegen sind frühe Veränderungen in kleinen Lungenarealen viel leichter zu erkennen als in der Absorption. Außerdem haben überlagernde Strukturen nur einen geringen Einfluss und das Signal der Streuung der Lunge dominiert die Thoraxaufnahme. So kann zunächst darauf geschlossen werden, dass es in den Mäusen zu einer strahlenbedingten Lungenveränderung gekommen ist. Ob es sich hierbei auch schon in den frühen Aufnahmen der 8-12 Woche um eine Lungenfibrose handelt, kann nicht sicher bestätigt werden. Dennoch können ebendiese Veränderungen in der qualitativen und quantitativen Auswertung der Radiographien, bzw. Tomographien analysiert werden.

Bei der qualitativen Auswertung der Tomographien beider Bildgebungsmodalitäten bezüglich dem Auftreten von ersten Veränderungen in der Lunge, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Größe des Bestrahlungsfelds und dem Auftreten der Lungenveränderungen. So ließen sich die frühesten strukturellen Veränderungen im Lungengewebe bei den an der gesamten rechten Lunge bestrahlten Mäusen detektieren. Später traten sie dann auch bei den

nur an der unteren rechten Lunge und bei den an der oberen rechten Lunge bestrahlten Mäusen auf.

Dies weist auf einen volumetrischen Effekt hin, weil auch die Größe des von den Umbauprozessen betroffenen Areals im Zusammenhang mit der Größe des Bestrahlungsfeldes steht. Die strahlenbedingten Veränderungen der Lunge waren bei den an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäusen besonders stark ausgeprägt. Die an der oberen und unteren rechten Lunge bestrahlten Mäuse zeigten hingegen weniger ausgeprägte fibrotische Areale. Dieser volumetrische Effekt stimmt mit den Ergebnissen bisheriger Studien überein.

In der Absorption sind Veränderungen im Lungengewebe durch Verschattungen zu erkennen. Fibrotische Umbauprozesse erhöhen die Dichte der Lunge, die die Absorption der Röntgenstrahlen erhöht, sodass die Transmissionrate der rechten Lunge sinkt und zu den sichtbaren Verschattungen in den absorptionsbasierten Tomographien führt. Die in der Absorption als Verschattung sichtbaren Veränderungen des Lungengewebes sind allerdings weniger deutlich als in den entsprechenden Dunkelfeldaufnahmen. Das Erfassen einer Veränderung in der Absorption erfordert vom Betrachter ein geübtes Auge und einen Vergleich mit Voraufnahmen des Tieres. Etwaige Veränderungen im Dunkelfeld können in diesem Entwicklungsstadium schon ohne Betrachtung vorheriger Aufnahmen bestimmt werden und zeigen sich in einer eindeutigeren Ausprägung.

Da die histologische Untersuchung erst nach 28 Wochen durchgeführt wurde, kann nicht sicher bestätigt werden, dass es sich bei den sichtbaren Veränderungen zu früheren Zeitpunkten definitiv um eine Lungenfibrose handelt. Dennoch konnten solche frühen Veränderungen der Lungenstruktur detektiert werden. Das Dunkelfeld reagiert also empfindlich auf die morphologischen Veränderungen, die das Lungengewebe nach der Bestrahlung durchläuft.

5.3 Vergleich beider Bildgebungsmodalitäten

Im Dunkelfeld lässt sich der fibrosebedingte Verlust von Alveolarstrukturen durch eine Signalabschwächung und einen deutlichen Signalabbruch erkennen, der als dunkles Areal sichtbar wird. Aus den Dunkelfeldtomographien ist ersichtlich, dass sich die Struktur der rechten Lunge signifikant ändert, was zu einer Verzerrung des Dunkelfeldsignals führt. Beim Vergleich der Dunkelfeldtomographien der mit Bestrahlungsfeldern verschiedener Größe behandelten Mäuse konnten wir beobachten, dass nach 24 Wochen verschiedene Schweregrade der Lungenveränderungen erreicht wurden. Diese frühen Unterschiede können jedoch lediglich

anhand der Dunkelfeldtomographien festgestellt werden, da die absorptionsbasierten Tomographien keinen besonders klaren Unterschied beim Vergleich von fibrotischen und gesunden Lungen erlauben. Gerade bei kleinen Fibrosearealen mit diskreten Veränderungen erlaubt das Dunkelfeld eine bessere Erkennung der Veränderungen der Lunge und deren Verlauf über die Zeit. Aus der qualitativen Analyse mit visueller Auswertung ist demnach zu schließen, dass sich das Dunkelfeld etwas besser zur Detektion der Veränderungen eignet.

Die Absorptionsbildgebung erlaubt zwar eine gute visuelle Detektion von fibrotischen Lungenveränderungen, allerdings sind diese insbesondere in den frühen Stadien nicht eindeutig zu erfassen. Hierbei ist das Dunkelfeld vorteilhaft, da es frühe Veränderungen der Lungenstruktur besser darstellt. Die fortgeschrittenen Stadien der Lungenfibrose lassen sich in beiden Bildgebungsmodalitäten gut feststellen, sodass das Dunkelfeld hier keinen besonderen Vorteil zeigt. Die sich vom Menschen unterscheidende Anatomie der Maus stellt in beiden Bildgebungsmodalitäten einen Faktor dar, der die Diagnostik beeinflusst. Es ist jedoch anzumerken, dass die Dunkelfeldaufnahmen bei der Einstufung der diagnostischen Kapazität etwas im Nachteil liegen könnten, da die meisten Untersucher die klassischen absorptionsbasierten Röntgenbilder aus dem klinischen Alltag gewohnt sind. So könnte man schlussfolgern, dass bei weiteren Studien und mehr Erfahrung mit der Dunkelfeldbildgebung, diese sich zunehmend als vorteilhaft bei der Detektion von strahleninduzierter Lungenfibrose zeigen könnte.

In der zuerst durchgeführten qualitativen Analyse erfolgte lediglich eine visuelle Detektion und Einschätzung der Lungenveränderungen. Dadurch ist diese stark untersucherabhängig und kann in den Ergebnissen Ungenauigkeiten und Schwankungen aufweisen. Insbesondere eine ungeübte Person mit geringer radiologischer Vorerfahrung kann bei der Detektion von frühen Lungenveränderungen Probleme haben, da sich diese oft in geringen Veränderungen der Grautöne in den Tomographien zeigen. Zusätzlich sind auch die neuartigen Aufnahmen des Dunkelfelds ein erschwerender Faktor für Untersucher, welche zuvor noch nie mit dieser Technik gearbeitet haben. Beim Dunkelfeld dienen andere anatomische Leitstrukturen zur Orientierung der Untersucher, als bei herkömmlichen Absorptionstomographien.

Bei der quantitativen Analyse der Bilder beider Bildgebungsmodalitäten wurde die Auswahl der ROIs zunehmend an das optimale Untersuchungsareal angenähert. In einem ersten Versuch wurden zwei gleichgroße, quadratische Areale als ROIs in beiden Lungen ausgewählt (siehe Abb. 15). Durch die subjektive Auswahl des Untersuchers kann sich hier trotz bester Bemühungen ein starker Untersucher Bias zeigen. Die anschließend ausgewählten ROIs mit

komplett umrandeten Lungen erlauben jedoch, ein Maximum an in den Radiographien sichtbarem Lungengewebe in die Auswertung einzuschließen. Dadurch wird verhindert, dass mit der Wahl der ROIs durch den Untersucher Veränderungen der Lunge nicht in die Messung eingeschlossen werden.

Dadurch unterscheidet sich unsere quantitative Analyse von der, die in früheren Veröffentlichungen durchgeführt wurde. Frühere Untersuchungen der Dunkelfeldbildgebung verwendeten quadratische Areale als ROIs (Meinel, 2014; Andre Yaroshenko et al., 2013), wie etwa in unserer ersten Annäherung (Abbildung 15). In unserer finalen Wahl der ROIs, waren diese jedoch wie in einer Studie aus 2015 an Größe und Form der Lunge angepasst (Yaroshenko et al., 2015). In vorherigen Studien (Meinel, 2014; Andre Yaroshenko et al., 2013) war zudem die gesamte Lunge von einer Fibrose betroffen. Daher wurde in diesen Studien der Durchschnittswert der Absorption bzw. des Dunkelfelds nicht mit gleichzeitig vorhandenem, gesundem Gewebe verglichen. In unserer Studie haben wir die linke Lunge nicht bestrahlt und konnten sie daher als Referenz für gesundes Lungengewebe in jeder Röntgenaufnahme verwenden. Diese Methode lieferte für die Kontrollgruppe einen über den gesamten Studienverlauf stabilen Vergleichswert, mit dem gesunde und geschädigte Lungen unterschieden werden konnten. Darüber hinaus konnten wir den Vorteil der Zeit der Detektion mit der Dunkelfeldbildgebung quantifizieren.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse entsprechen den histologischen Befunden und den zugrundeliegenden physikalischen Grundprinzipien. Sie stimmen auch mit den bisherigen CT-Studien überein, die messbare Abweichungen der HU 12 bis 20 Wochen nach der Bestrahlung zeigen.

Wie zuvor beschrieben, folgen nach der Bestrahlung inflammatorische Veränderungen des Lungengewebes, aus welchen sich anschließend eine Fibrose entwickeln kann. Innerhalb von 6 Monaten nach Bestrahlung mit über 8 Gy kann sich eine akute Strahlenpneumonie entwickeln, die beim Menschen anschließend zur Entwicklung einer Lungenfibrose führen kann (Coggle, 1986).

Das fibrotische Lungengewebe zeigt sich mit einer Gewebeverdichtung der klassischen Alveolarstruktur. Während des Fibrosierungsprozesses wird Kollagen akkumuliert, welches als Indikator für die Lungenfibrose dient (Coggle, 1986).

Im fibrotischen Gewebe ist die Alveolarstruktur der Lunge dichter, da die Grenzflächen zwischen Luft und Gewebe reduziert sind. Die gesteigerte Dichte erhöht die Absorption von

Röntgenstrahlen, wodurch die gemessene Transmission verringert wird. Somit nimmt der durchschnittliche Wert der Absorption der rechten Lunge zu, wodurch dies zu einer Abnahme des Mittelwerts $\langle R \rangle$ führt. Die zahlreichen Luft-Gewebe-Übergänge der Alveolen und die dadurch verursachte Streuung sind hingegen die Basis für den Dunkelfeldkontrast. Wenn ihre Menge durch die voranschreitende Fibrose verringert wird, nehmen die Streuung und auch das Dunkelfeldsignal konsekutiv ab. Auch hier nimmt M_{rechts} im Vergleich zu M_{links} ab, was zu einer Abnahme von $\langle R \rangle$ führt.

Bereits in der vereinfachten quantitativen Auswertung mit quadratischen ROIs wurde ein deutlicher Unterschied in der Entwicklung der Grauwerte zwischen Absorptions- und Dunkelfeldradiographien deutlich. Lediglich die an der gesamten rechten Lunge bestrahlte Maus zeigte einen markanten Verlauf mit einem Anstieg des Mittelwerts von rechter und linker Lunge um 0,5 zwischen der 8. und 12. Woche (Abbildung 29). Dies entspricht auch den Ergebnissen der qualitativen Analyse, bei der sich die Veränderungen der an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäuse besonders deutlich zeigten. Ähnlich wie in der qualitativen Analyse verhält es sich auch mit den nur an einem Teil der Lunge bestrahlten Mäusen. In der quantitativen Auswertung mit quadratischen ROIs zeigen sie keine eindeutigen Veränderungen der Mittelwerte und nur eine geringe Abweichung von der Kontrollgruppe.

In der Dunkelfeldbildgebung zeigen sich in der quantitativen Analyse deutliche Veränderungen der Mittelwerte von rechter und linker Lunge für die Mäuse aller bestrahlter Gruppen. Die stärkste Veränderung der mittleren Grauwerte erreichen die an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäuse. Dies verhält sich analog zu den Ergebnissen der Absorption. Weniger ausgeprägte Veränderungen sind bei den an der unteren rechten Lunge bestrahlten Mäusen zu sehen, gefolgt von den an der oberen rechten Lunge bestrahlten Mäusen. Hierin zeigt sich bereits der erwartete volumetrische Effekt. Die mit zwar ebenfalls 20 Gy, jedoch an einer größeren Fläche bestrahlten Mäuse zeigen nicht nur deutlichere Veränderungen der Lungenstruktur, sondern auch einen früheren Eintritt der Veränderungen.

In der weiteren, präziseren Grauwertbestimmung der Radiographien mit ROIs, die den umrandeten Lungen entsprechen, lieferte Ergebnisse, die der vorherigen Auswertung der quadratischen ROIs entsprechen. Auch hier lässt sich in den Absorptionsradiographien keine klare Tendenz der Mittelwerte der Grauwerte über den Zeitverlauf der Studie feststellen. Das Dunkelfeld wiederum wies hier ebenfalls eine deutliche Veränderung der Mittelwerte der bestrahlten Mäuse nach.

Zudem konnte auch in diesem Fall im Vergleich der an der ganzen rechten Lunge und der nur an einem Teil der rechten Lunge bestrahlten Mäuse ein volumetrischer Effekt beobachtet

werden. Während sich in der Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung von R_{DF} zeigte, war bei den komplett bestrahlten Lungen die Veränderung von R_{DF} am deutlichsten sichtbar. (Abb. 18) Im Verlauf der Studie ist R_{DF} stärker in den unten rechts bestrahlten Lungen gesunken, als in den oben rechts bestrahlten Lungen. Auch dies spricht für einen möglichen Volumeneffekt, denn die Bestrahlungsfelder bei den an den unteren rechten Lungen bestrahlten Mäusen waren größer. Mit dieser sichtbaren Abstufung von der stärksten Veränderung in der komplett bestrahlten rechten Lunge, über die unten rechts bestrahlte Lunge bis zur oben rechts bestrahlten Lunge ist es möglich, den Volumeneffekt zu determinieren. Dies bestätigt die zuvor aufgestellten Vermutungen, in denen das Ausmaß der Fibrose von der Größe des Bestrahlungsfelds abhängig ist.

Auch bei Betrachtung der Säulendiagramme der Absorption und das Dunkelfelds der an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäuse lassen sich die Vorteile der Dunkelfeldbildung erschließen (Abbildung 33+34). Hier lässt sich in der Absorption im Vergleich von Woche 0 und Woche 24 kein signifikanter Unterschied des Mittelwerts R_A ermitteln, während im Dunkelfeld zwischen diesen beiden Zeitpunkten eine signifikante Veränderung deutlich wird. Weiterhin ist erkennbar, dass die Entwicklung einer Lungenfibrose für jede Maus individuell ist. Dies konnte bereits in der quantitativen Auswertung beobachtet werden. Hier veranschaulicht Abbildung 34 eine Verbreiterung der Fehlerbalken, die für das Dunkelfeld ausgeprägter ist als für die Absorption. Die größeren Fehlerbalken im Dunkelfeld sind darauf zurückzuführen, dass die Veränderungen nach 24 Wochen bereits zu verschiedenen Schweregraden fortgeschritten sind. In den frühen Stadien können diese Unterscheidungen durch das Dunkelfeld viel deutlicher gemacht werden, weil die absorptionsbasierten Röntgenbilder beim Vergleich von gesunder und bestrahlter (und demnach strukturell veränderter) Lunge kaum Unterschiede aufweisen. So lässt sich auch für die quantitative Analyse der Radiographien begründen, dass die Dunkelfeldbildung sensitiver für Veränderungen der Alveolarstruktur der Lunge ist als die absorptionsbasierte Radiographie.

5.4 Histologie

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung entsprechen den bereits in den Tomographien sichtbaren Veränderungen. Die histologischen Präparate der an der kompletten rechten Lunge bestrahlten Mäuse wiesen insbesondere an dessen Rand fibrotisch veränderte Areale auf. Auch in den Bildgebungen zeigte sich hier die Fibrose in beiden Bildgebungsmodalitäten am lateralen Rand der rechten Lunge (Abbildung 42). Die Präparate der Lungen aus der Kontrollgruppe

ließen keine Veränderungen im Lungengewebe erkennen, woraus sich wie zu erwarten schließen lässt, dass in den Lungen der unbestrahlten Kontrollgruppe keine Fibrose auftrat. Mit der histologischen Analyse lässt sich bestätigen, dass es sich bei den radiologischen Veränderungen der Lunge tatsächlich um eine Fibrose handelt.

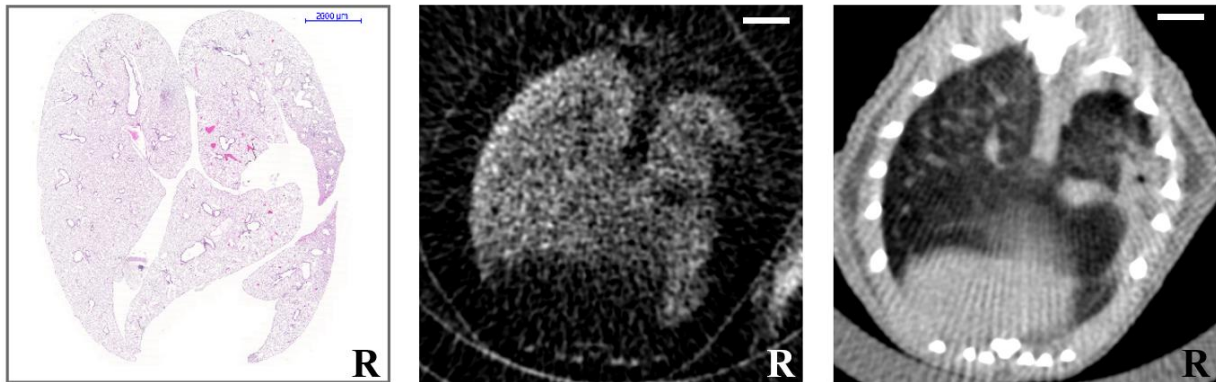


Abbildung 42: Gegenüberstellung von histologischem Präparat, Dunkelfeldbild und Absorptionsbild einer an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Maus. Die Bildgebung entstand in der 28. Woche nach Bestrahlung. Die in beiden Bildgebungsmodalitäten sichtbaren strukturellen Veränderungen der rechten Lunge korrelieren mit fibrotischen Veränderungen die in der histologischen Analyse detektiert wurden. Das fibrotische Areal befindet sich sowohl in Histologie als auch in der Bildgebung am lateralen Lungenrand. (Längsbalken Histologie: 2000 µm; Längsbalken Bildgebung: 5mm)

Bei den nur an der oberen oder unteren Lunge bestrahlten Mäusen zeigte sich in der histologischen Untersuchung nicht zwingend eine Fibrose. Bei den histologischen Präparaten der an der unteren rechten Lunge bestrahlten Mäuse ist in zwei von drei Fällen fibrotisches Gewebe sichtbar. Die an der oberen rechten Lunge bestrahlten Mäuse wiesen im histologischen Präparat keine offensichtlichen fibrotischen Veränderungen auf. Dies lässt sich zunächst durch die unterschiedliche Entwicklung der Lungenfibrose in den verschiedenen Mäusen erklären. So können unterschiedliche Mäuse derselben Tierart trotzdem Unterschiede in der Strahlensensibilität und der Entwicklung einer Lungenfibrose aufweisen. Des Weiteren kann auch die Größe des Bestrahlungsfeldes für die geringere Fibrosierung ursächlich sein. Die nur teilweise bestrahlten Lungen zeigten deshalb auch (entsprechend des volumetrischen Effektes) auch eine geringere Ausprägung der Fibrose. Ein kleineres Bestrahlungsfeld kann aber auch dazu führen, dass sich eine Lungenfibrose deutlich langsamer entwickelt als bei einer komplett bestrahlten Lunge. Ein Unterschied in der Entwicklung einer Lungenfibrose ist schließlich auch zwischen den oben und unten bestrahlten Lungen erkennbar. Auch hier wurde an der oberen Lunge ein etwas geringeres Lungenvolumen bestrahlt als am unteren Teil der Lunge.

Dementsprechend zeigen sich auch an der oberen rechten Lunge zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchung keine fibrotischen Veränderungen.

5.5 Weitere Aspekte

In einigen Aspekten der Studie zeigten sich in einer retrospektiven Analyse Möglichkeiten zur weiteren Verbesserung und Optimierung. Einer dieser Aspekte ist die geringe Gruppengröße der vier Studiengruppen. In der Kontrollgruppe schrumpfte die Größe aufgrund des vorzeitigen Todes zweier Tiere von sechs auf vier. Aus den Bildern der restlichen Mäuse und den vorausgehenden Verlaufsaufnahmen ist es jedoch immer noch möglich die Veränderungen in bestrahlten Tieren von der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Auch bei den bestrahlten Gruppen ist es trotz kleinen Gruppengrößen sehr unwahrscheinlich, dass die gemessenen Veränderungen im Lungengewebe rein zufällig sind. Schließlich konnte die Abweichung von einer gesunden Lunge in allen Dunkelfeld-Röntgenaufnahmen beobachtet werden.

Bei der Wahl der ROIs in der quantitativen Bestimmung der Grauwerte in den Radiographien ist auch unsere letzte Version der ROIs nicht optimal. Auch ein ROI mit beidseits komplett umrandeten Lungen kann ungenau sein, da die Radiographien nicht die dreidimensionale Struktur der Lungen abbilden (siehe Abb. 11). Dadurch können gegebenenfalls Veränderungen der Grauwerte in anderen Bildgebungsschichten übersehen und nicht berechnet werden. Bei einer Auswertung der Tomographien besteht kein Untersucher Bias und die komplette Lungenstruktur wird in die Untersuchung eingeschlossen. Das wäre die bestmögliche Methode, um zu verhindern, dass neue Lungenveränderungen nicht in die Grauwertbestimmung einbezogen und nicht berechnet werden. Die optimale Wahl der ROIs wäre also die Grauwertbestimmung über den segmentierten Lungen in den Tomographien beider Bildgebungsmodalitäten.

Ein für die weitere Auswertung wichtiger Punkt ist zudem, dass die Mäuse während der Bildaufnahme frei atmeten, sodass die von uns ermittelten Röntgenbilder die über mehrere Atemzyklen gemittelte Lunge wiedergeben. Dies kann die Wahrnehmung von Röntgenbildern verändern und zu einer herabgesetzten Bildqualität führen.

Eine weitere Fragestellung stellt die Größe der Mäuse dar. Da diese deutlich kleiner als Menschen sind, sind Röntgenaufnahmen, die mit unserem Bildgebungsgerät erstellt wurden, auf speziell für die klinische Verwendung entwickelten Monitoren weniger detailliert als herkömmliche klinische Röntgenaufnahmen beim Menschen. Dies kann zu einer ungewohnten

Wahrnehmung der Röntgenbilder führen, sodass das Potential beider Bildgebungsqualitäten unterschätzt werden kann.

Bei der Bildgebung von Kleintieren wird in derzeitigen Studien ein Mikro-CT für die Bildgebung eingesetzt. Dies geht allerdings mit einer erhöhten Strahlendosis einher. Es wurde berichtet, dass die erforderlichen Dosen zwischen 200 mGy und 1000 mGy variieren, wobei die Abweichungen zwischen Haut- und Organdosis 10% bis 35% betragen (Artaechevarria et al., 2011; De Langhe et al., 2012; Granton et al., 2014; Vande Velde et al., 2015; Willekens et al., 2010). Weitere Studien zeigten jedoch, dass solche Strahlendosen bei einer wöchentlichen Verabreichung nicht zu einer erhöhten Radiotoxizität führen (Detombe et al., 2013; Vande Velde et al., 2015). Die bisher berichteten Strahlendosen für die Dunkelfeld-Radiographie liegen unter 10 mGy (Meinel et al., 2014; Scherer et al., 2017). Für unsere Studie betrug die Oberflächendosis 14 mGy und die Dosis in 14 mm PMMA betrug 3 mGy. Die Dunkelfeldbildgebung mittels planarer Radiographien benötigt demnach eine erheblich geringere Strahlendosis als bisherige Mikro-CT-Setups um den Beginn von strahleninduzierten Lungenschäden quantitativ nachzuweisen. Dies hat insbesondere bei strahlentherapeutisch vorbehandelten Patienten deutliche Vorteile, da durch Ansätze mit geringen Strahlendosen weitere Strahlenschäden verhindert beziehungsweise minimiert werden können.

Der Versuchsaufbau konnte eine strahleninduzierte Lungenfibrose bei lebenden Mäusen anhand von Absorptions- und Dunkelfeldbildgebung nachweisen. Im Anschluss konnte diese histologisch gesichert werden. Im Vergleich mit vorherigen Studien zeigte unser Versuch eine verzögerte Ausbildung der Lungenfibrose nach Bestrahlung. Dies lässt sich unter anderem durch die in unserer Studie kleineren Bestrahlungsfelder erklären. Außerdem ist Fibroseentwicklung abhängig vom Stamm der Mäuse und für jedes Tier individuell. Es konnte jedoch in der histologischen Untersuchung gesichert werden, dass es sich tatsächlich um eine Lungenfibrose handelt. Außerdem wurden unsere Mäuse in einem Zeitraum von 28 Wochen in der Bildgebung untersucht, sodass die Entwicklung von strahleninduzierten Lungenveränderungen trotz verzögertem Verlauf beobachtet werden konnte.

Der Studienaufbau unterschied sich dabei wesentlich von vorherigen Studien, in welchen z.B. die Lungenfibrose durch Chemotherapeutika wie Bleomycin ausgelöst wurde. In anderen Studien kommt zur Detektion von Lungenveränderungen in Mäusen vorwiegend ein Mikro CT zum Einsatz.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Auswertung und die wichtigsten Erkenntnisse der Studie festhalten. Die qualitative Analyse, die mit einer

visuellen Auswertung erfolgte, zeigte erste strukturelle Veränderungen bereits nach 8-12 Wochen. Eine ausgeprägte Lungenfibrose ließ sich mit beiden ausgewerteten Bildgebungsmodalitäten gut erkennen. Bei frühen Veränderungen in kleinen Lungenarealen erlaubte jedoch das Dunkelfeld eine bessere Erkennung dieser und deren Entwicklung über die Zeit.

Die quantitative Analyse, welche anhand der Auswertung der Grauwerte über den segmentierten Lungen durchgeführt wurde, offenbarte, dass frühe Veränderungen der Lungenstruktur im Dunkelfeld früher detektiert werden können. Somit entsprechen die Ergebnisse aus der quantitativen Auswertung auch der vorhergehenden qualitativen Analyse.

Trotz verbesserungswürdiger Aspekte wie der Zahl der Versuchstiere und der Bildqualität konnte unsere Hypothese bestätigt werden und es konnte gezeigt werden, dass das Dunkelfeld frühe fibrotische Veränderungen besser detektieren kann. Dies ist auch bereits mit planaren Dunkelfeldradiographien möglich. Bei planaren Radiographien erlaubt das Dunkelfeld zudem eine niedrigere Dosis als bei der bisher bei solchen Versuchen angewendeten Bildgebung mit einem Mikro-CT.

Die Dunkelfeldbildgebung ist eine nützliche Methode zur Detektion von strahleninduzierter Lungenfibrose in Mäusen, da sie eine genauere Darstellung der Veränderungen in der Mauslunge erlaubt als die üblicherweise verwendete Absorptionsbildgebung. Die Vorteile der Dunkelfeldbildgebung sind sowohl in der qualitativen als auch in der quantitativen Auswertung messbar. Deshalb kann sie dazu beitragen, die frühere Diagnose von strahleninduzierter Lungenfibrose zu verbessern.

6. Gesamtzusammenfassung und Ausblick

In unserer Studie wurden 24 Mäuse mit einer einmaligen Strahlendosis von 20 Gy in drei verschiedenen Lungenarealen bestrahlt. Sechs Mäuse wurden an der gesamten rechten Lunge bestrahlt, weitere sechs an der oberen rechten Lunge und sechs an der unteren rechten Lunge. Eine Kontrollgruppe von ebenfalls sechs Mäusen wurde nicht bestrahlt. Bei den bestrahlten Tieren wurde stets die linke Lunge ausgespart, um im weiteren Verlauf der Studie das gesunde Lungengewebe der unbestrahlten Lunge als Referenz zu nutzen. Bei den Tieren aller vier Versuchsgruppen erfolgte zu Beginn des Versuchs (Woche 0) eine Bildgebung mit dem Skyscan, um einen Ausgangswert zu erhalten. Dieser entspricht einer gesunden Lunge vor der Bestrahlung. Das Röntgen Bildgebungsgerät SkyScan 1190 Phasenkontrast MicroCT erstellt neben einem Absorptionsbild auch ein Dunkelfeldbild, sodass im Anschluss ein Vergleich beider Bildgebungsmodalitäten möglich ist. Anschließend erfolgten bei den Tieren der drei zu bestrahlenden Versuchsgruppen ein Planungs-CT und die Bestrahlung mit 20 Gy, entsprechend der Versuchsgruppenzugehörigkeit. Die Bildgebung wurde bei allen Tieren im Abstand von vier Wochen kontinuierlich wiederholt. Nach der letzten Bildgebung (Woche 28) erfolgten die Euthanasie der Tiere und die histologische Aufarbeitung von ausgewählten Mauslungen.

Die Radiographien und Tomographien wurden zunächst qualitativ, anhand einer visuellen Analyse ausgewertet. Diese zeigte in den Tomographien erste strukturelle Veränderungen des Lungengewebes schon nach 8 Wochen bei den an der ganzen rechten Lunge bestrahlten Mäusen. Hierbei offenbarte sich im Dunkelfeld ein Signalabbruch und in den Absorptionenaufnahmen eine Verschattung des Lungengewebes. Die an der oberen und unteren rechten Lunge bestrahlten Mäuse zeigten diese strahlenbedingten Veränderungen nach 20 Wochen. Die unbestrahlten Lungen der Mäuse aus der Kontrollgruppe hatten auch bis zum Endpunkt der Studie nach 28 Wochen keine Veränderungen des Lungengewebes. Hierbei wurde erkennbar, dass sich die Größe des Bestrahlungsfelds auf das Ausmaß der Lungenfibrose und deren Entstehungszeitpunkt auswirkt. Dadurch konnte ein volumetrischer Effekt beobachtet werden. Insbesondere die frühen Veränderungen des Lungengewebes mit kleinen Fibrosearealen konnten in den Dunkelfeldaufnahmen einfacher bestimmt werden. Die absorptionsbasierten Tomographien zeigten zu diesem Zeitpunkt keinen besonders klaren Unterschied beim Vergleich von fibrotischen und gesundem Lungengewebe.

Weiterhin erfolgte auch eine quantitative Auswertung der Radiographien. Diese erfolgte zunächst durch eine Grauwertbestimmung in quadratischen ROIs, welche in beiden Lungen

positioniert wurden. In einer weiteren quantitativen Bestimmung, erfolgte die Grauwertbestimmung der Radiographien mit ROIs, die die gesamten Lungen einschlossen

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse legten nahe, dass die Dunkelfeldbildgebung sensitiver für Veränderungen der Alveolarstruktur der Lunge ist, als die absorptionsbasierte Bildgebung. Wie auch in der qualitativen Analyse ließ sich in der quantitativen Bestimmung ein volumetrischer Effekt nachweisen.

Unsere Studie zeigte, dass die Dunkelfeldbildgebung erweiterte Informationen über die Entwicklung von strahleninduzierten Veränderungen des Lungengewebes liefert. Nach 24 Wochen offenbarten sich in der Bildgebung bei allen Mäusen aus der Gruppe die eine Bestrahlung erhalten hatte, deutliche Abweichungen von gesunden Lungen. Quantitative Analysen ergaben, dass die absorptionsbasierte Bildgebung zu diesem Zeitpunkt keine gesunden von fibrotischen Lungen unterscheiden konnte. Die qualitative Analyse erhärtete nicht nur, dass strukturelle Veränderungen der Lunge früher entdeckt werden können als bei der absorptionsbasierten Bildgebung, sondern ließ auch den Schluss zu, dass ihre Position genauer bestimmt werden kann. Diese Informationen sind entscheidend für die Bestrahlungsplanung in der Strahlentherapie, wenn bereits geschädigtes Gewebe geschont werden soll.

Um die Studienergebnisse weiterhin zu stützen, könnte unsere Studie mit größeren Versuchstierzahlen wiederholt werden. Dadurch könnte auch der Tod eines Versuchstiers im Verlauf der Studie besser kompensiert werden. Zudem bestünde so auch die Möglichkeit, Veränderungen in der Bildgebung zwischenzeitlich histologisch zu sichern.

Weiterhin könnten auch zusätzliche Anpassung bezüglich der Bildgebungsdauer im Skyscan getätigt werden, um so die Versuchstiere zu schonen. Hierbei sollte ein besonderer Fokus auf der Bildgebungsqualität bei veränderten Parametern liegen, um die Vergleichbarkeit mit vorherigen Studien zu garantieren.

Zur Schonung der Versuchstiere sollte in weiteren Versuchen mit dem Skyscan die Narkose der Tiere anhand einer Inhalationsanästhesie mit Isofluran durchgeführt werden. Diese ist mittlerweile im Gerät eingebaut und ermöglicht eine bessere Steuerbarkeit der Narkose, da keine Antagonisierung wie etwa bei einer intraperitonealen Narkose, nötig ist. Gleichzeitig zeichnet sich die inhalative Anästhesie durch eine bessere Verträglichkeit für die Mäuse aus.

Die in unserer Studie erworbenen Bildgebungsdaten können zudem zur weiteren Erschließung der Dunkelfeldbildgebung genutzt werden. Hierbei kann ein Fokus auf der weiteren Anpassung

von Bildgebungsparametern des Geräts liegen. Außerdem können auch die Prozessierung und Rekonstruktion der Skyscan-CTs optimiert werden. So kann erhoben werden, wie mit den beim Scanprozess entstandenen Artefakten (z.B. schwankenden Intensitäten, Ringartefakten, Rauschen oder Verzerrungen der Bildqualität) umzugehen ist, um eine optimale Bildqualität zur diagnostischen Nutzung zu gewährleisten.

Außerdem können die erhobenen Daten auch zur Auswertung der Grauwerte in den Tomographien der Mäuse genutzt werden. Hier könnte der Verlauf der mittleren Grauwerte der Lunge über die Zeit analog zur zuvor beschriebenen quantitativen Analyse ausgewertet werden. Die daraus resultierenden Ergebnisse könnten die tatsächlichen Veränderungen des Lungengewebes erfassen und noch exaktere Ergebnisse ermöglichen.

Unsere Studiendaten eignen sich zudem zur Durchführung einer zusätzlichen Reader Study. Eine an unsere Bildgebungsstudie anschließende verblindete Reader Study wurde bereits durchgeführt und manifestierte eine erhöhte diagnostische Genauigkeit bei der Auswertung von Dunkelfeldradiographien. Zudem wurde für das Dunkelfeld auch eine erhöhte Übereinstimmung der Reader mit sich selbst und untereinander deutlich, was darauf hindeutet, dass die Reader ihre Ersteinschätzung häufiger reproduzieren können und dass die Dunkelfeldradiographie weniger anfällig für die individuelle Wahrnehmung ist. Weiterhin könnte man eine ähnliche Reader Study auch mit den Tomographien aus unserem Datensatz durchführen. Möglicherweise ließe sich diese dann mit einer größeren Anzahl an Readern wiederholen, um einen genaueren Datensatz zu erheben.

Um die Anwendung der Dunkelfeldbildgebung zur Detektion der strahleninduzierten Lungenfibrose voranzutreiben, ist noch weitere Forschung nötig. So ist in unserer Studie auch ein weiterer Studienteil geplant. Hier soll neben der monatlichen Bildgebung zusätzlich eine histologische Sicherung der Veränderungen des Lungengewebes angeschlossen werden. Nach jeder Bildgebung im Skyscan soll ein Tier aus der Versuchstiergruppe ausgewählt werden um die Lunge histologisch zu untersuchen. Somit stehen die betroffenen Tiere einer weiteren Bildgebung und Nachbeobachtung nicht mehr zur Verfügung. Eine genauere histologische Sicherung würde eine zusätzliche Färbung mit Masson's Trichrom bieten, die Kollagenablagerungen anfärbt. Auch eine ergänzende Immunhistochemie wäre zu einer genaueren Sicherung der Lungenfibrose möglich. So kann man genauer zuordnen, zu welcher Krankheitsentität die in der Bildgebung sichtbaren Veränderungen gehören und mit welchen Befunden im Dunkelfeld diese korrelieren. Hierbei wäre mit einer histologischen Sicherung eine exakte Unterscheidung zwischen Lungenfibrose und der oft vorausgehenden

Strahlenpneumonitis möglich. Auch frühere fibrotische Veränderungen, die der Bildgebung verborgen bleiben, können mit einer histologischen Sicherung im Rahmen eines solchen Versuchsaufbaus detektiert werden. So ließe sich genau quantifizieren, ab welchem Zeitpunkt der Entstehung der Lungenfibrose eine Bildgebung mittels Dunkelfeldbildgebung möglich ist.

Überdies wäre ein weiterer Studienteil vorstellbar, in dem dasselbe Lungenareal mit fraktionierter Bestrahlung behandelt wird. Nachdem in unserem Versuchsaufbau eine Bestrahlungsdosis von 20 Gy an der gesamten rechten Lunge zu einer Fibrose geführt hat, könnte die fraktionierte Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 20 Gy durchgeführt werden, wobei mit 5 Fraktionen im Abstand von 24h bestrahlt werden könnte. So könnte zum einen die Korrelation von Fibrosegrad und Ausmaß der zuvor angewandten Strahlendosis mit Mikrofraktionierung quantifiziert werden. Außerdem ließe sich erschließen, ab welcher Strahlendosis eine fibrotische Veränderung der Lunge mittels Dunkelfeldbildgebung erkannt werden kann. Bei bisherigen Studien lag der Fokus auf den zeitlichen Aspekten der Detektion, also wie früh die Veränderungen sichtbar werden. (Bzw. bei der generellen Realisierbarkeit der Anwendung der Dunkelfeldbildgebung zur Detektion von strahleninduzierter Lungenfibrose.) Zusätzlich könnte in diesem Studienaufbau auch eine histologische Aufarbeitung, wie zuvor beschrieben, stattfinden, um die Korrelation von Strahlendosis und Fibroseentwicklung zu untersuchen und abzusichern.

In weiteren Versuchsteilen könnten ebenfalls zusätzlich zu Bildgebung und Histologie Seromarker bestimmt werden, die Hinweise auf Fibrose geben. Dazu gehören beispielsweise TGF- β und entzündliche Zytokine. Die hierzu nötigen Blutabnahmen von etwa 0,1 ml könnten dann wöchentlich nach der letzten Bestrahlung stattfinden.

Eine weitere zukünftige Fragestellung wäre die Translation der Dunkelfeldbildgebung auf den Menschen. Hierbei zeigen sich zum einen Probleme in der Größe des Bildgebungsgeräts, da die für den Aufbau des Geräts nötigen Phasengitter momentan nur bis zu einer Größe von etwa 10cm hergestellt werden können. Ein weiterer Forschungspunkt wäre zudem die Aufnahmedauer für die Projektionen. Diese müsste in weiteren Versuchen optimiert werden, um die Nutzung der Dunkelfeldbildgebung am Menschen zu ermöglichen. Dadurch könnten sich neben der Darstellung von Lungenveränderungen wie Fibrose und Emphysem weitere Anwendungsgebiete aufzeigen. Hierzu könnten zum Beispiel die Bildgebung von unklaren Mammographie Befunden gehören, bei denen das Dunkelfeld als sekundäre Diagnostik zusätzliche Bildinformationen liefern kann (Eggl et al., 2018). Auch bei der Darstellung von Gelenkknorpel, die im herkömmlichen Röntgen nicht möglich ist, zeigt die

Dunkelfeldbildgebung gute Bildgebungsmöglichkeiten, sodass sie sich als mögliches diagnostisches Werkzeug für die Diagnostik von Gelenkerkrankungen wie Arthrose eignen könnte (Kunisada et al., 2008).

7. Literaturverzeichnis

- Artaechevarria X, Blanco D, de Biurrun G. Evaluation of micro-CT for emphysema assessment in mice: comparison with non-radiological techniques. *Eur Radiol* 2011, 21(5), 954-962. doi:10.1007/s00330-010-1982-5
- Bartl P. Phasenkontrast-Bildgebung mit photonenzählenden Detektoren. Doktorarbeit 2010. Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Benveniste MF, Welsh J, Godoy MC. New era of radiotherapy: an update in radiation-induced lung disease. *Clin Radiol* 2013, 68(6):e275-90. doi: 10.1016/j.crad.2013.01.013
- Bickelhaupt S, Erbel C, Timke C. Effects of CTGF Blockade on Attenuation and Reversal of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Journal of the National Cancer Institute* 2017, 109(8), 1-11. doi:10.1093/jnci/djw339
- Catane R, Schwade JG, Turrisi AT 3rd. Pulmonary toxicity after radiation and bleomycin: a review. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 1979, 5(9): 1513-1518. doi: 10.1016/0360-3016(79)90761-2
- Cho J, Kodym R, Seliounine S. High Dose-Per-Fraction Irradiation of Limited Lung Volumes Using an Image-Guided, Highly Focused Irradiator: Simulating Stereotactic Body Radiotherapy Regimens in a Small-Animal Model. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2010, 77(3), 895-902. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.12.074
- Choi SH, Hong ZY, Nam JK. A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Clinical Cancer Research* 2015, 21(16), 3716-3726. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3193
- Coggle JE, Lambert BE; Moore SR. Radiation Effects in the Lung. *Environmental Health Perspectives* 1986, Vol. 70, pp. 261-291. doi: 10.1289/ehp.8670261
- Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity Criteria of the radiation therapy oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 1995, 31(5): 1341-1346. doi: 10.1016/0360-3016(95)00060-C
- Dadrich M, Nicolay NH, Flechsig P. Combined inhibition of TGF β and PDGF signaling attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis. *OncoImmunology* 2015, 5(5):e1123366. doi:10.1080/2162402X.2015.1123366
- Davis SD, Yankelevitz DF, Henschke CI. Radiation effects on the lung: clinical features, pathology, and imaging findings. *American Journal of Roentgenology* 1992, 159(6), 1157-1164. doi:10.2214/ajr.159.6.1442375
- De Langhe E, Vande Velde G, Hostens J. Quantification of lung fibrosis and emphysema in mice using automated micro-computed tomography. *PLoS ONE* 2012, 7(8): e43123. doi:10.1371/journal.pone.0043123
- De Ruyscher D, Granton PV, Lieuwes NG. Nintedanib reduces radiation-induced microscopic lung fibrosis but this cannot be monitored by CT imaging: A preclinical study with a high precision image-guided irradiator. *Radiother Oncol* 2017, 124(3): 482-487. doi:10.1016/j.radonc.2017.07.014
- Detombe SA, Dunmore-Buyze J, Petrov IE. X-ray dose delivered during a longitudinal micro-CT study has no adverse effect on cardiac and pulmonary tissue in C57BL/6 mice. *Acta Radiol* 2013, 54(4): 435-441. doi:10.1177/0284185113475608
- Dubrey S, Pal S, Singh S. Digital clubbing: forms, associations and pathophysiology. *British Journal of Hospital Medicine* 2016, 77(7). doi: 10.12968/hmed.2016.77.7.403
- Eggl E, Grandl S, Sztromicronkay-Gaul A. Dose-compatible grating-based phase-contrast mammography on mastectomy specimens using a compact synchrotron source. *Sci Rep* 2018, 8(1): 15700. doi:10.1038/s41598-018-33628-z

- Eldh T, Heinzelmann F, Velalakan A. Radiation-induced changes in breathing frequency and lung histology of C57BL/6J mice are time- and dose-dependent. *Strahlentherapie und Onkologie* 2012, 188(3): 274-281. doi:10.1007/s00066-011-0046-3
- Flechsig P, Dadrich M, Bickelhaupt S. LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF- β and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals. *Clinical Cancer Research* 2012, 18(13): 3616-3627. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2855
- Flechsig P, Hartenstein B, Teurich S. Loss of Matrix Metalloproteinase-13 Attenuates Murine Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2010, 77(2): 582-590. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.12.043
- Froese AR, Ask K, Labiris R. Three-dimensional computed tomography imaging in an animal model of emphysema. *Eur Respir J* 2007, 30(6): 1082-1089. doi:10.1183/09031936.00000507
- Giuranno L, Ient J, De Ruyscher D. Radiation-Induced Lung Injury (RILI). *Front Oncol* 2019, 9:877. doi:10.3389/fonc.2019.00877
- Granton PV, Dubois L, Van Elmpt W. A longitudinal evaluation of partial lung irradiation in mice by using a dedicated image-guided small animal irradiator. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2014, 90(3): 696-704. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.07.004
- Hellbach K, Yaroshenko A, Meinel FG. In Vivo Dark-Field Radiography for Early Diagnosis and Staging of Pulmonary Emphysema. *Invest Radiol* 2015. 50(7): 430-5. doi: 10.1097/RLI.0000000000000147.
- Hellbach K, Yaroshenko A, Willer K. X-ray dark-field radiography facilitates the diagnosis of pulmonary fibrosis in a mouse model. *Sci Rep* 2017, 7(1): 340. doi:10.1038/s41598-017-00475-3
- Hong ZY, Lee CG, Shim HS. Time, Dose, and Volume Responses in a Mouse Pulmonary Injury Model Following Ablative Irradiation. *Lung* 2016, 194(1), 81-90. doi:10.1007/s00408-015-9825-4
- Jackson IL, Xu P, Hadley C. A preclinical rodent model of radiation-induced lung injury for medical countermeasure screening in accordance with the FDA animal rule. *Health Phys* 2012, 103(4): 463-473. doi:10.1097/HP.0b013e31826386ef
- Jennings FL, Arden A. Development of experimental radiation pneumonitis. *Arch Pathol* 1961, 71: 437-46. PMID: 13789856
- Kunisada T, Shimao D, Sugiyama H. X-ray dark field imaging of human articular cartilage: possible clinical application to orthopedic surgery. *Eur J Radiol* 2008, 68(3 Suppl): S18-21. doi:10.1016/j.ejrad.2008.04.034
- Li M, Abdollahi A, Gröne, HJ. Late treatment with imatinib mesylate ameliorates radiation-induced lung fibrosis in a mouse model. *Radiation oncology* 2009, 4:66. doi:10.1186/1748-717X-4-66
- Luo, Y., Mao, Q., Wang, X., Yu, J., & Li, M. (2018). Radiotherapy for esophageal carcinoma: dose, response and survival. *Cancer Manag Res*, 10, 13-21. doi:10.2147/CMAR.S144687
- Matthys H, Seeger W. *Klinische Pneumologie* 2008 (4. Auflage), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 8-113
- Mattonen SA, Palma DA, Haasbeek, CJ. Distinguishing radiation fibrosis from tumour recurrence after stereotactic ablative radiotherapy (SABR) for lung cancer: A quantitative analysis of CT density changes. *Acta Oncologica* 2013, 52(5): 910-8, doi:10.3109/0284186X.2012.731525
- Meinel FG, Yaroshenko A, Hellbach K. Improved Diagnosis of Pulmonary Emphysema Using In Vivo Dark-Field Radiography. *Investigative Radiology* 2014, 49(10): 653-8, doi: 10.1097/RLI.0000000000000067.

- Monson JM, Stark P, Reilly JJ. Clinical radiation pneumonitis and radiographic changes after thoracic radiation therapy for lung carcinoma. *Cancer* 1998, 82(5): 842-50, PMID: 9486572
- Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 294(2): L152-160. doi:10.1152/ajplung.00313.2007
- Movsas B, Raffin TA, Epstein AH. Pulmonary radiation injury. *Chest* 1997, 111(4): 1061-76, doi: 10.1378/chest.111.4.1061
- Netter FH, *Atlas der Anatomie 2020* (7. Auflage), Elsevier, 202-214
- Oh YT, Noh OK, Jang H. The features of radiation induced lung fibrosis related with dosimetric parameters. *Radiotherapy and Oncology* 2012, 102(3): 343-346, doi:10.1016/j.radonc.2012.02.003
- Park KJ, Chung JY, Chun MS. Radiation-induced lung disease and the impact of radiation methods on imaging features. *Radiographics* 2000, 20(1): 83-98, doi:10.1148/radiographics.20.1.g00ja0483
- Postnov AA, Meurrens K, Weiler H. In vivo assessment of emphysema in mice by high resolution X-ray microtomography. *Journal of Microscopy* 2005, 220(Pt 1): 70-5, doi: 10.1111/j.1365-2818.2005.01510.x
- Rubin P, Constine LS, Fajardo LF. EORTC Late Effects Working Group. Overview of late effects normal tissues (LENT) scoring system. *Radiother Oncol* 1995, 35(1): 9-10, doi: 10.1016/0167-8140(95)97447-1
- Ruscitti F, Ravanetti F, Essers J. Longitudinal assessment of bleomycin-induced lung fibrosis by Micro-CT correlates with histological evaluation in mice. *Multidiscip Respir Med* 2017, 12:8, doi:10.1186/s40248-017-0089-0
- Saito S, Murase K. Detection and Early Phase Assessment of Radiation-Induced Lung Injury in Mice Using Micro-CT. *PLoS One* 2012, 7(9):e45960, doi:10.1371/journal.pone.0045960
- Salomon FV, Geyer H, Gille U. *Anatomie für die Tiermedizin 2008*, (2. Auflage), Enke Verlag Stuttgart, 750-753
- Scherer K, Yaroshenko A, Bölükbas DA. X-ray Dark-field Radiography - In-Vivo Diagnosis of Lung Cancer in Mice. *Sci Rep* 2017, 7(1): 402, doi: 10.1038/s41598-017-00489-x
- Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 182(8): 1065-1072. doi:10.1164/rccm.200912-1840OC
- Shu HK, Yoon Y, Hong S. Inhibition of the CXCL12/CXCR4-axis as preventive therapy for radiation-induced pulmonary fibrosis. *PLoS One* 2013, 8(11): 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0079768
- Sigmund G, Slanina J, Hinkelbein W. Diagnosis of Radiation-Pneumonitis. *Recent Results Cancer Res* 1993, 130: 123-31, doi: 10.1007/978-3-642-84892-6_11
- Straub JM, New J, Hamilton CD. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2015, 141(11): 1985-1994. doi: 10.1007/s00432-015-1974-6
- Tapfer A. *Small Animal X-ray Phase-Contrast Imaging*. Doktorarbeit 2013, Technische Universität München
- Tapfer A, Bech M, Velroyen A. Experimental results from a preclinical X-ray phase-contrast CT scanner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109(39): 15691-15696. doi:10.1073/pnas.1207503109
- Tashiro J, Rubio GA, Limper AH. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)* 2017, 4:118, doi:10.3389/fmed.2017.00118

- Theuws JC, Muller SH, Seppenwoolde Y. Effect of Radiotherapy and Chemotherapy on Pulmonary Function After Treatment for Breast Cancer and Lymphoma: A Follow-Up Study. *J Clin Oncol* 1993, (10): 3091-3100, doi: 10.1200/JCO.1999.17.10.3091
- Treuting PM, Dintzis SM. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas (Expert Consult) 2012, (Vol. 1), Academic Press, 121-134
- Trotti A, Colevas AD, Setser A. CTCAE v3.0: Development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2003, 13(3): 176-181, doi:10.1016/S1053-4296(03)00031-6
- Vande Velde G, De Langhe E, Poelmans J. Longitudinal in vivo microcomputed tomography of mouse lungs: No evidence for radiotoxicity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015, 309(3): L271-279. doi:10.1152/ajplung.00098.2015
- Velroyen A. X-ray Phase-Contrast and Dark-Field Imaging of Small Animals Contrast Enhancement and In Vivo Imaging. Doktorarbeit 2015, Technische Universität München, München.
- Velroyen A, Yaroshenko A, Hahn D. Grating-based X-ray Dark-field Computed Tomography of Living Mice. *EBioMedicine* 2015, 2(10): 1500-6, doi:10.1016/j.ebiom.2015.08.014
- Walkin L, Herrick SE, Summers A. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013, 6(1): 18, doi: 10.1186/1755-1536-6-18.
- Weber T, Bayer F, Haas W. Investigation of the signature of lung tissue in X-ray grating-based phase-contrast imaging. *arXiv* 2012, 1212.5031
- Willekens I, Buls N, Lahoutte T. Evaluation of the radiation dose in micro-CT with optimization of the scan protocol. *Contrast Media Mol Imaging* 2010, 5(4): 201-7, doi: 10.1002/cmim.394
- Wong J, Armour E, Kazanzides P. High-Resolution, Small Animal Radiation Research Platform With X-Ray Tomographic Guidance Capabilities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008. 71(5): 1591-9, doi:10.1016/j.ijrobp.2008.04.025
- Yaroshenko A, Hellbach K, Yildirim AO. Improved In vivo Assessment of Pulmonary Fibrosis in Mice using X-Ray Dark-Field Radiography. *Sci Rep* 2015, 5:17492, doi:10.1038/srep17492
- Yaroshenko A, Meinel F, Bech M. Pulmonary Emphysema Diagnosis with a Preclinical Small-Animal X-ray Dark-Field Scatter-Contrast Scanner. *Radiology* 2013, 269(2): 427-433, doi:10.1148/radiol.13122413/-/DC1
- You H, Wei L, Sun WL. The green tea extract epigallocatechin-3-gallate inhibits irradiation-induced pulmonary fibrosis in adult rats. *Int J Mol Med* 2014, 34(1): 92-102, doi:10.3892/ijmm.2014.1745

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die menschliche Lunge.....	Seite 7
Abbildung 2	Die Lunge der Maus.....	Seite 13
Abbildung 3	Histologie der Lungenfibrose.....	Seite 16
Abbildung 4	Aufbaus eines Talbot-Lau-Interferometers	Seite 30
Abbildung 5	Aufbau des Skyscan 1190 Phasenkontrast MicroCT.....	Seite 31
Abbildung 6	Schematische Darstellung der Bestrahlungsfelder	Seite 33
Abbildung 7	SARRP Aufbau Bildgebung.....	Seite 36
Abbildung 8	SARRP Aufbau Bestrahlung.....	Seite 37
Abbildung 9	Bestrahlungsplanung gesamte rechte Lunge.....	Seite 38
Abbildung 10	Bestrahlungsplanung untere rechte Lunge.....	Seite 39
Abbildung 11	Bestrahlungsplanung obere rechte Lunge.....	Seite 39
Abbildung 12	Skyscan 1190 Phasenkontrast MicroCT	Seite 41
Abbildung 13	Skyscan Bildgebungssoftware.....	Seite 42
Abbildung 14	Methodik der qualitativen Auswertung.....	Seite 43
Abbildung 15	Methodik der quantitativen Auswertung - Erstversuch ROI.....	Seite 44
Abbildung 16	Methodik der quantitativen Auswertung - ROI.....	Seite 45
Abbildung 17	Absorption in Woche 0 & 24: ganze rechte Lunge.....	Seite 47
Abbildung 18	Absorption in Woche 0 & 24: obere rechte Lunge.....	Seite 48
Abbildung 19	Absorption in Woche 0 & 24: untere rechte Lunge	Seite 49
Abbildung 20	Absorption in Woche 0 & 24: Kontrollgruppe.....	Seite 50
Abbildung 21	Dunkelfeld in Woche 0 & 24: ganze rechte Lunge.....	Seite 50
Abbildung 22	Dunkelfeld in Woche 0 & 24: obere rechte Lunge.....	Seite 51
Abbildung 23	Dunkelfeld in Woche 0 & 24: untere rechte Lunge.....	Seite 52
Abbildung 24	Dunkelfeld in Woche 0 & 24: Kontrollgruppe.....	Seite 53
Abbildung 25	Gegenüberstellung im Zeitverlauf ganze rechte Lunge.....	Seite 55
Abbildung 26	Gegenüberstellung im Zeitverlauf untere rechte Lunge.....	Seite 57
Abbildung 27	Gegenüberstellung im Zeitverlauf obere rechte Lunge.....	Seite 58
Abbildung 28	Gegenüberstellung im Zeitverlauf Kontrollgruppe.....	Seite 59

Abbildung 29	Entwicklung von R_A im Zeitverlauf - Erstversuch ROI.....	Seite 60
Abbildung 30	Entwicklung von R_{DF} im Zeitverlauf – Erstversuch ROI.....	Seite 61
Abbildung 31	Entwicklung von R_A im Zeitverlauf.....	Seite 62
Abbildung 32	Entwicklung von R_{DF} im Zeitverlauf.....	Seite 63
Abbildung 33	Entwicklung von R_A in den Wochen 0 und 24.....	Seite 64
Abbildung 34	Entwicklung von R_{DF} in den Wochen 0 und 24.....	Seite 64
Abbildung 35	Histologie Maus 20 Gy 1.....	Seite 66
Abbildung 36	Histologie Maus 0 Gy 1.....	Seite 67
Abbildung 37	Histologie Maus 20 Gy Unten 1.....	Seite 68
Abbildung 38	Histologie Maus 20 Gy Unten 3.....	Seite 69
Abbildung 39	Histologie Maus 20 Gy Unten 6.....	Seite 69
Abbildung 40	Histologie Maus 20 Gy Oben 6.....	Seite 71
Abbildung 41	Histologie Maus 20 Gy Oben 1.....	Seite 72
Abbildung 42	Gegenüberstellung Histologie, Dunkelfeld und Absorption.....	Seite 81

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	CTCAE Version 3.....	Seite 24
Tabelle 2	RTOG: Late Radiation Morbidity Scoring Schema.....	Seite 26
Tabelle 3	Gitterstabmaterialien, -höhen und –perioden.....	Seite 31
Tabelle 4	Absolute Häufigkeiten der ersten Lungenveränderungen.....	Seite 54
Tabelle 5	Mausnamensystematik und Studiengruppenzugehörigkeit.....	Seite 97

Anhang

Ganze rechte Lunge	Obere rechte Lunge	Untere rechte Lunge	Kontrollgruppe
Maus 20 Gy 1	Maus 20 Gy Oben	Maus 20 Gy Oben Unten 1	Maus 0 Gy 1
Maus 20 Gy 2	Maus 20 Gy Oben	Maus 20 Gy Oben Unten 2	Maus 0 Gy 2
Maus 20 Gy 6	Maus 20 Gy Oben	Maus 20 Gy Oben Unten 3	Maus 0 Gy 3
Maus 20 Gy 7	Maus 20 Gy Oben	Maus 20 Gy Oben Unten 4	Maus 0 Gy 5
Maus 20 Gy 8	Maus 20 Gy Oben	Maus 20 Gy Oben Unten 5	Maus 0 Gy 6
Maus 20 Gy 9	Maus 20 Gy Oben	Maus 20 Gy Oben Unten 6	

Tabelle 5: Systematik der Mausnamen und Zugehörigkeit zur Studiengruppe.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre. Die Nennung der Personen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, wird auf Grund der Vielzahl der Leute in jedem Fall unvollständig bleiben müssen. Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Jan J. Wilkens, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und die beste Unterstützung, die man sich als Doktorand wünschen kann. Ich danke Frau Prof. Dr. Stephanie E. Combs für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachterin und Mentorin. Ich bedanke mich an Rico Burkhardt für die Unterstützung und Geduld bei physikalischen Fragestellungen und die gemeinsame Arbeits- und Promotionszeit in stets sehr guter Arbeitsatmosphäre. Danke für die vielen fachlichen und außerfachlichen Gespräche.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Thomas E. Schmid für die Einführung und die Unterstützung beim Umgang mit Mäusen, die Betreuung im Labor und die Hilfe bei der Planung unserer Studie.

Ich bedanke mich bei Dr. Daniela Schilling für die Hilfe bei der Planung unserer Studie und für den großen Wissenszuwachs, den ich durch das Seminar Strahlenbiologie erfahren durfte. Ein besonderer Dank geht auch an Prof. Dr. Axel K. Walch vom Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrum München für die Aufarbeitung und Befundung unserer histologischen Präparate. Außerdem danke ich Manuela Duda für die Bereitstellung von Bildern und Hilfe zum SARRP. Ebenso bedanke ich mich bei Andrea Mair, Marlon Stein, Annique Dombrowsky, Dr. Sophie Dobiasch und Lily Nguyen für die exzellente Hilfe und die Betreuung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Julia und Bogdan, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben. Danken möchte ich außerdem meinen Kommilitonen, die mich im Rahmen des Studiums begleitet und moralisch unterstützt haben.