

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

## **Prävention strahleninduzierter Nierenfunktionsstörungen durch Behandlung mit Erythropoietin und Infliximab im Mausmodell**

Andrea Barbara Schnaiter

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Molls
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke

Die Dissertation wurde am 28.07.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.04.2009 angenommen.





Meinen Eltern gewidmet.



# Inhaltsverzeichnis

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b> .....	<b><u>4</u></b>
<b><u>1. Einleitung</u></b> .....	<b><u>6</u></b>
<b><u>1.1. Strahlennephropathie</u></b> .....	<b><u>6</u></b>
1.1.1. Strahlentoleranz der Niere.....	7
1.1.2. Klinisches Erscheinungsbild.....	7
1.1.3. Auftreten und Risikofaktoren.....	9
1.1.4. Prophylaxe.....	9
<b><u>1.2. Pathologie der bestrahlten Niere</u></b> .....	<b><u>11</u></b>
<b><u>1.3. Erythropoietin</u></b> .....	<b><u>13</u></b>
<b><u>1.4. TNF-<math>\alpha</math>-Antikörper Infliximab</u></b> .....	<b><u>15</u></b>
1.4.1. Tumornekrosefaktor.....	15
1.4.2. Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	16
1.4.3. Der TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab in der klinischen Anwendung.....	17
<b><u>1.5 Problemstellung</u></b> .....	<b><u>19</u></b>
<b><u>2. Material und Methoden</u></b> .....	<b><u>20</u></b>
<b><u>2.1. Aufbau des Experiments</u></b> .....	<b><u>20</u></b>
<b><u>2.2. Tiere und Tierhaltung</u></b> .....	<b><u>24</u></b>
<b><u>2.3. Injektionstechniken</u></b> .....	<b><u>25</u></b>
<b><u>2.4 Szintigraphie</u></b> .....	<b><u>29</u></b>
2.4.1. Statische Nierenszintigraphie mit $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA.....	29
2.4.2. Ablauf der szintigraphischen Untersuchung.....	31
2.4.3. Auswertung der Szintigramme.....	33
<b><u>2.5. Bestrahlung</u></b> .....	<b><u>35</u></b>
2.5.1. Ablauf der Bestrahlung.....	35
2.5.2. Bestrahlungsplanung.....	36
2.5.3. Dosimetrie.....	37
<b><u>2.6. Blutentnahme</u></b> .....	<b><u>38</u></b>
<b><u>2.7. Auswertung der Rohdaten</u></b> .....	<b><u>39</u></b>
<b><u>2.8. Statistische Auswertung</u></b> .....	<b><u>40</u></b>
<b><u>3. Ergebnisse</u></b> .....	<b><u>42</u></b>
<b><u>3.1. Ausgangssituation – Messergebnisse der initialen Nierenfunktion</u></b> .....	<b><u>42</u></b>
3.1.1. Deskriptive Statistik zur initialen Nierenfunktion.....	42
3.1.2. Schließende Statistik zur initialen Nierenfunktion.....	50
<b><u>3.2. Todesfälle</u></b> .....	<b><u>52</u></b>
<b><u>3.3. Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere</u></b> .....	<b><u>53</u></b>
3.3.1. Kontrollgruppe – Vergleich nach applizierten Strahlendosen.....	54
3.3.2. Kontrollgruppe und die Gruppen „Epo 500“ und „Epo 2000“ im Vergleich.....	56
3.3.3. Kontrollgruppe und die Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“ im Vergleich.....	67
<b><u>3.4. Zusammenfassung der szintigraphischen Ergebnisse</u></b> .....	<b><u>73</u></b>
<b><u>4. Diskussion</u></b> .....	<b><u>75</u></b>
<b><u>4.1. Radioprotektion durch Erythropoietin</u></b> .....	<b><u>75</u></b>
4.1.1. Erythropoietin und die Protektion der Niere.....	76
4.1.2. Eignung von Erythropoietin als potentiell radioprotektives Agens.....	77

<b>4.2. Radioprotektion durch den TNF-<math>\alpha</math>-Antikörper Infliximab.....</b>	<b>79</b>
4.2.1. Schädigung von Endothelzellen durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	79
4.2.2. Expression des Tumornekrosefaktors- $\alpha$ in der Niere.....	80
4.2.4. TNF- $\alpha$ als Radiosensitizer.....	81
<b>4.3. Entwicklung der Nierenfunktion nach Bestrahlung.....</b>	<b>83</b>
4.3.1. Vorschädigung der Niere bereits bei geringen Strahlendosen.....	85
<b>4.4. Einfluss von Erythropoietin auf die Nierenfunktion nach einzeitiger Bestrahlung.....</b>	<b>87</b>
4.4.1. Thrombogenes Potential von Erythropoietin.....	87
4.4.2. Mitogene Aktivität von Erythropoietin.....	89
4.4.3. Konsequenzen für die klinische Anwendung von Erythropoietin in Kombination mit Strahlentherapie.....	90
<b>4.5. Einfluss von Infliximab auf die Nierenfunktion nach einzeitiger Bestrahlung.....</b>	<b>92</b>
4.5.1. TNF- $\alpha$ als Radioprotektor und deletärer Effekt von TNF- $\alpha$ -Antikörpern.....	92
4.5.2. Immunreaktion durch transmembranales TNF- $\alpha$ .....	93
4.5.3. Konsequenzen für die Strahlentherapie bei Patienten unter Behandlung mit Infliximab.....	94
<b>4.6. Methodenkritik.....</b>	<b>95</b>
4.6.1. Verlaufsbeobachtung.....	95
4.6.2. Fallzahl.....	95
4.6.3. Bestrahlung.....	95
<b>4.7. Fazit und Ausblick.....</b>	<b>97</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>108</b>
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	108
7.2 Tabellenverzeichnis.....	109
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>110</b>
<b>9 Lebenslauf.....</b>	<b>111</b>

## 1. Einleitung

Die Strahlentherapie stellt neben Chemotherapie, Operation und Immuntherapie eine Säule der modernen onkologischen Therapie dar. Dabei kann sie mit kurativer oder palliativer Zielsetzung und auch in bestimmten onkologischen Notfallsituationen eingesetzt werden. Ziel der Strahlentherapie ist es also, Heilung oder zumindest eine Verlängerung der Lebenszeit bei guter Lebensqualität zu erreichen.

Eine adäquate und effektive Behandlung maligner Tumoren erfordert die Wahl einer angemessen hohen Strahlendosis. Zugleich gilt es, unerwünschte Wirkungen so weit wie möglich zu vermeiden. Dabei muss einerseits die zur optimalen Therapie erforderliche Gesamtdosis, andererseits die Schwellendosis kritischer Organe beachtet werden. Durch eine sorgfältige und zeitgemäß konzipierte Bestrahlungsplanung und mit Hilfe moderner Bestrahlungsgeräte wird versucht, dem Rechnung zu tragen. Trotzdem sind diese Maßnahmen nicht immer ausreichend, und Kompromisse zugunsten des Normalgewebes gehen dann zu Lasten der Tumorkontrollwahrscheinlichkeit.

Es ist daher wünschenswert und erforderlich, das Spektrum der radioprotektiven Möglichkeiten noch zu erweitern. Das Potential dazu haben chemische Radioprotektoren wie beispielsweise Amifostin. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere Substanzen auf mögliche radioprotektive Eigenschaften, speziell bezogen auf das Nierengewebe, hin untersucht: der hämatopoetische Wachstumsfaktor Erythropoietin und der TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab. Beide Substanzen sind im klinischen Alltag bereits etabliert, werden jedoch nicht zur Radioprotektion eingesetzt.

### 1.1. Strahlennephropathie

Die Strahlennephropathie stellt eine heutzutage relativ seltene, wenn auch schwerwiegende Komplikation der Therapie mit ionisierender Strahlung dar (Cohen 2003, S. 486). Gründe dafür mögen sein, dass die Schwellendosis der Niere inzwischen bekannt ist und dass in einigen Fällen die Chemotherapie heute die bessere Therapiealternative darstellt (Duchesne 1997, S. 834). Verbesserten Schutz bietet zudem eine genauere und effizientere Therapieplanung, die eine Reduktion sowohl der Gesamt- als auch der Fraktionsdosis ermöglicht. Weitere Maßnahmen zur Protektion

der Niere vor ionisierender Strahlung sind trotz allem wünschenswert, besonders, da eine wirkungsvolle Behandlung bestimmter Tumorleiden nur mit einer adäquaten Strahlendosis zu erreichen ist, die nicht durch die niedrige Toleranz der Niere und den daraus folgenden Komplikationen limitiert werden sollte.

### 1.1.1. Strahlentoleranz der Niere

In der Tat ist die Niere eines der strahlenempfindlichsten Organe des menschlichen Körpers. Man geht heute davon aus, dass die Toleranzdosis der Niere (TD 5/5) bei beidseitiger Bestrahlung mit Fraktionen von jeweils 2 Gy bei ca. 20 Gy liegt. Dabei stützt man sich auf die Untersuchungen von R. W. Luxton und P. B. Kunkler aus den Fünfziger und Sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts. In ihren Arbeiten beschäftigten sie sich intensiv mit den klinischen Zeichen und Folgen des strahlenbedingten Nierenversagens. An ihren Daten orientierten sich auch Emami et al. (Emami 1991, S. 111); sie sehen die Toleranzdosis der Niere bei therapeutischer Bestrahlung des ganzen Organs bei ca. 20 Gy (TD 5/5 bei 23 Gy, TD 50/5 bei 28 Gy).

Tabelle 1 zeigt die Toleranzdosen der Niere nach der Arbeit von Emami et al. Dargestellt sind die TD 5/5 und TD 50/5 der Niere, abhängig vom bestrahlten Organvolumen. Die TD 5/5 bezeichnet diejenige Strahlendosis, die mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 5 % innerhalb von fünf Jahren eine klinische Nephritis hervorruft. Analog dazu ist die TD 50/5 diejenige Strahlendosis, die mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 50 % innerhalb von fünf Jahren eine klinische Nephritis verursacht.

#### **Tabelle 1**

*Toleranzdosen der Niere in Gy, modifiziert nach Emami 1991*

Bestrahltes Volumen	TD 5/5			TD 50/5			Endpunkt
	1/3	2/3	3/3	1/3	2/3	3/3	
Niere I	50	30	23	-	40	28	Klinische Nephritis
Niere II	"	"	"	"	"	"	

### 1.1.2. Klinisches Erscheinungsbild

Anfangs wurde das klinische Erscheinungsbild der durch Bestrahlung verursachten Nierenschädigung noch als „Strahlennephritis“ bezeichnet, was eine entzündliche Genese der beobachtbaren Gewebsveränderungen impliziert. Mittlerweile ist man

davon jedoch abgekommen und verwendet lieber den neutraleren Begriff der „Strahlennephropathie“, da sich in histologischen Untersuchungen nur in geringem Maße Entzündungszeichen im eigentlichen Sinne finden ließen (Glatstein 1977, S. 940).

Die Strahlennephropathie kann zu akutem Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit, außerdem zu maligner Hypertonie mit all ihren Folgen, im ungünstigsten Fall mit letalem Ausgang führen. Charakteristische Symptome sind neben Hypertonie die Anämie, Polyurie, Isosthenurie, Proteinurie und Zylindrurie im Sinne einer Nephritis. Betrifft die Strahlenexposition nur eine Niere, so kann es durch den sogenannten Goldblatt-Mechanismus zu einer renalen Hypertonie kommen. Hierbei wird nach Drosselung der Nierendurchblutung auf der betroffenen Seite reflektorisch vermehrt Renin ausgeschüttet. Aus der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems resultiert eine Erhöhung des systemischen Blutdrucks. Dies kann wiederum die unbestrahlte Niere schädigen. Therapeutische Erfolge bei der Behandlung dieser hyperreninämischen Hypertonie wurden durch Nephrektomie des bestrahlten Organs erzielt (Crummy 1965, S. 111).

Das Auftreten von Symptomen einer Nierenschädigung wurde nie schon während oder sofort nach der Bestrahlung beobachtet. Auch die so genannte akute Strahlennephropathie mit in der Regel dramatischem Verlauf entwickelt sich mit einer Latenz von 6 bis 12 Monaten nach Bestrahlung. Neuere tierexperimentelle Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass strahlenbedingte Schäden in der Niere tatsächlich schon früher auftreten (Stevens 1991, S. 127), jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt symptomatisch werden.

Nach Kunkler und Luxton lassen sich außer der akuten Strahlennephropathie noch drei weitere klinische Formen von Folgeschäden nach bilateraler Nierenbestrahlung unterscheiden, nämlich die chronische Strahlennephropathie, die benigne Hypertonie und die maligne Hypertonie (Kunkler 1952, S. 192, Luxton 1953, S. 221). Während die maligne Hypertonie 12 bis 18 Monate nach Bestrahlung in Erscheinung tritt, zeigen sich die chronische Strahlennephropathie und die benigne Hypertonie erst nach über 18 Monaten. Dieser Zeitraum gilt wohl auch für die bereits erwähnte hyperreninämische Hypertonie nach einseitiger Bestrahlung (Hulbert 1985, S. 153).

### 1.1.3. Auftreten und Risikofaktoren

Luxton und Kunkler beobachteten die Strahlennephropathie bei Patienten nach abdomineller Bestrahlung bei Seminom und metastasiertem Ovarialkarzinom. Zur Verhinderung der akuten Transplantatabstoßung wurden früher die Nieren direkt bestrahlt. Diese Maßnahme hat sich allerdings als ineffektiv erwiesen und spielt deshalb heute keine Rolle mehr (Torrissi 1990, S. 1031).

Bedeutsam ist ein adäquater Schutz der Nieren heutzutage vor allem bei der Behandlung von Lymphomen mittels Großfeldtechnik wie „Extended Field“, beim Einsatz von Paraaortalfeldern, beispielsweise in der Therapie der Seminome, bei der Behandlung des Pankreas-Karzinoms, sowie bei der Bestrahlung der Milz.

Besonders gefährdet durch die Strahlennephropathie sind Patienten, deren Nieren beispielsweise durch eine vorangegangene Chemotherapie bereits vorgeschädigt sind. Dies kann der Fall sein bei Patienten, die im Zuge der Konditionierungsbehandlung vor Knochenmarkstransplantation sowohl Chemotherapie als auch Ganzkörperbestrahlung (TBI) erhalten (Stewart 1995, S. 236). Auch die Therapie mit offenen radioaktiven Stoffen erhöht das Risiko für die Entwicklung einer Strahlennephropathie, insbesondere dann, wenn sich die Radionuklide in der Niere anreichern, bevor sie ausgeschieden werden (Cohen 2001, S. 1102).

Zweitbestrahlungen sollten möglichst vermieden werden. Ein Erholungseffekt ist nach Erstbestrahlung nicht zu erwarten, vielmehr eine progrediente Funktionsverschlechterung. Selbst wenn nach der ersten Therapie keine klinischen Symptome einer Strahlennephropathie festgestellt werden konnten und Strahlendosen unterhalb der Toleranzschwelle angewandt wurden, so ist die Niere doch irreversibel vorgeschädigt und wird auf erneute Bestrahlung mit geringerer Dosis toleranz und einer weiteren Progredienz der Funktionsverschlechterung reagieren. Dies zeigten tierexperimentelle Studien an C3H-Mäusen von Stewart et al. (Stewart 1989, S. 459).

### 1.1.4. Prophylaxe

Die beste Prophylaxe der Strahlennephropathie besteht sicherlich darin, die Niere gar nicht erst ionisierender Strahlung auszusetzen. Individuell gefertigte Abdeckungen der Nierenregion und möglichst exakte Einhaltung der Feldgrenzen tragen dabei entscheidend zur Schonung der Nieren bei. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich wird, ist

auch die Bestrahlung eines möglichst geringen Teilvolumens der Niere weniger bedenklich als die Bestrahlung des gesamten Organs. Partielle Funktionsverluste können dank der parallelen und multiplen Anlage von Tubulus- und Gefäßsystem wenigstens zum Teil kompensiert werden.

Im Tierexperiment an der Ratte erwiesen sich die ACE-Hemmer Captopril und Enalapril als effektiv zur Prophylaxe der Strahlennephropathie (Cohen 1994, S. 377). Auch die Blockade der beiden Angiotensin II-Rezeptoren vom Typ I und II verminderte bei Ratten die Verschlechterung der Nierenfunktion nach Bestrahlung (Moulder 2004, S. 313).

## **1.2. Pathologie der bestrahlten Niere**

Die Histologie der bestrahlten Niere zeigt charakteristische Veränderungen. Sie sind abhängig vom zeitlichen Abstand zur Bestrahlung, sowie von der Strahlendosis und können Hinweise auf die Ursachen des Funktionsverlustes der Niere geben. Im Zusammenhang mit der Entwicklung der Strahlenneuropathie sind besonders Tubulusepithel und Gefäßendothel von Bedeutung. Kennzeichnend für die Strahlenneuropathie sind Zelluntergang, -proliferation und Fibrose durch gesteigerte Fibroblastenaktivität.

Histologische Untersuchungen wurden in der Vergangenheit bereits zahlreich und an unterschiedlichen Säugetierspezies durchgeführt. Die Befunde gleichen sich in weiten Teilen (Cohen 2003, S. 489). An Präparaten der menschlichen Niere wurden aus naheliegenden Gründen vor allem spätere Veränderungen untersucht, zu Zeitpunkten, zu denen das Nierenversagen bereits eingetreten war. Für das vorliegende Projekt besonders von Interesse sind die Erkenntnisse aus Versuchen an Mäusen. Hierzu finden sich auch die meisten Daten.

Allgemein wird beobachtet, dass ionisierende Strahlung an den Nieren im frühen Stadium der Nephropathie zunächst zu Glomerulosklerose, später auch zu tubulointerstitieller Fibrose führt. Auffällig ist eine Permeabilitätssteigerung der glomerulären Kapillaren (Sharma 1991, S. 478). Der subendotheliale Raum stellt sich vergrößert dar, da sich das Kapillarendothel von der Basalmembran abhebt. Die Zellzahl des sklerosierten Mesangiums ist meist vermindert. Gleichzeitig fibrosiert die mesangiale Matrix. In einigen Endothelzellen fallen stark vergrößerte Zellkerne auf. Zuweilen finden sich auch Mikrothrombosen. Das tubuläre Interstitium zeigt fibrotische Veränderungen; es entwickelt sich zunächst eine verstärkte Proliferation der Tubulusepithelzellen. Im weiteren Verlauf reduziert sich jedoch die Zahl dieses Zelltyps, und die Niere verliert an Masse (Otsuka 1990, S. 286).

Nicht nur die glomerulären, sondern in besonderem Maße auch die tubulären Veränderungen scheinen mit der Verschlechterung der Nierenfunktion nach Bestrahlung zusammenzuhängen. Offensichtlich besteht eine enge Korrelation zwischen den Schweregraden von tubulärer Fibrose und renaler Funktionseinschränkung (Bohle 1990, S. 136). Strahlenneuropathie wurde auch bei tubulointerstitieller Fibrose gesehen, ohne dass bemerkenswerte glomeruläre Schäden vorhanden waren (Robbins 2001, S. 486). Ferner lässt sich eine Proliferation der proximalen Tubuluszellen beo-

bachten, die nach einseitiger Bestrahlung erstaunlicherweise auch in der kontralateralen unbestrahlten Niere auftritt (Otsuka 1993, S. 249). Andere Studien wiederum fanden im frühen Stadium Nekrosen der Tubuluszellen. Im späteren Verlauf verliert die gesamte Niere an Masse (White 1976, S. 1140).

Es ist anzunehmen, dass sich die Strahlennephropathie an unterschiedlichen Schauplätzen in der Niere abspielt. Sicherlich sind daran mehrere verschiedene Zelltypen beteiligt, u. a. die Kapillarendothelzelle (Jaenke 1993, S. 398), die Mesangiumzelle und die Tubulusepithelzelle (Robbins 1994, S. 109). Die Vermittlung der strahleninduzierten strukturellen und funktionellen Veränderungen ist heute noch nicht vollständig geklärt. Hier scheinen unterschiedliche molekulare Mechanismen und Mediatoren eine Rolle zu spielen. Für die Prävention von strahleninduzierten Schäden an der Niere, einem Normalgewebe, mögen sich genau hier Ansatzpunkte finden lassen. Für die beiden in dieser Arbeit verwendeten Substanzen, den Wachstumsfaktor Erythropoietin und den TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab existieren Hinweise auf ein gewebeprotectives Potential im Zusammenhang mit Bestrahlung.

### **1.3. Erythropoietin**

Erythropoietin, auch Epo oder Epoetin genannt, ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor (Zytokin), der im menschlichen Körper vor allem in den Fibroblasten des peritubulären Interstitiums der Nierenrinde (Le Hir 1991, S. 569, Eckardt 1993, S. 821), in geringerem Maße aber auch in den Hepatozyten der Leber gebildet wird. Genauer handelt es sich bei dem Glykoproteinhoromon um ein Polypeptid aus 165 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht zwischen 34 und 39 kDa und einem Kohlenhydratanteil von 40 %. Das entsprechende Gen besitzt 5 Exons und ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert (Petrides 1997, S. 881).

Die schon seit langem bekannte Aufgabe des Zytokins liegt in der Regulation der Reifung und Proliferation von Erythrozyten-Vorläuferzellen, sogenannter BFU-E (burst-forming-unit) und CFU-E (colony-forming-unit), im Knochenmark. Hypoxämie, etwa bei Anämie oder arterieller Hypoxie, stellt den entscheidenden Reiz dar, der zur vermehrten Ausschüttung von Erythropoietin ins Plasma führt (Weiss 2000, S. 420). Über seine herausragende Stellung bei der Hämatopoese hinaus besitzt Erythropoietin jedoch auch ein hohes Potential zur Gewebeprotektion und übt seine Wirkung nicht nur auf hämatopoetische Stammzellen, sondern auch auf zahlreiche nicht-hämatopoetische Zellen aus. Seit einigen Jahren laufen in der Forschung intensive Bemühungen, dem gewebeprotectiven Effekt des Erythropoietins weiter auf den Grund zu gehen. Mögliche Einsatzgebiete des Zytokins erhofft man sich dabei nicht nur in der strahlentherapeutischen Anwendung, sondern auch bei der Behandlung zerebraler (Sirén 2000, S. 4044) oder myokardialer Ischämien (Moon 2003, S. 11612) oder zur Prävention des durch Cisplatin (Bagnis 2001, S. 932) oder Cyclosporin A (Lee 2005, S. 64) induzierten Nierenversagens.

Voraussetzung für die hämatopoetische Wirkung von Erythropoietin ist die Ausprägung des Epo-Rezeptors auf der Oberfläche der Erythrozyten-Progenitorzellen. Neuere Versuche mit Derivaten von Erythropoietin, die nicht an den klassischen Epo-Rezeptor binden konnten, jedoch trotzdem gewebeprotective Wirkung aufwiesen, lassen jedoch darauf schließen, dass die hämatopoetischen und die gewebeprotectiven Effekte des Wachstumsfaktors über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt werden (Leist 2004, S. 239). In einer weiteren Arbeit von Brines et al. konnte gezeigt werden, dass der Epo-Rezeptor seine gewebeprotective Wirkung nach Ligandenbindung in

Assoziation mit der „common  $\beta$  receptor subunit“ ( $\beta$ cR oder CD131) entfaltet. Derivate von Erythropoietin, wie carbamylisiertes Erythropoietin, binden also anscheinend nur an den Epo-Rezeptor, wenn er mit  $\beta$ cR assoziiert ist.

Der Erythropoietin-Rezeptor wurde nicht nur in der menschlichen Niere, sondern auch in der Niere von Ratte und Maus gefunden. Bei der Maus fand sich der Rezeptor zuerst auf den Epithelzellen des proximalen Tubulus (Westenfelder 1999, S. 818). Später wurde er auch auf der Oberfläche von Podozyten entdeckt, ebenso auf den Epithelzellen der distalen Tubuli und der Sammelrohre (Echigoya 2005, S. e23).

## **1.4. TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab**

Infliximab ist ein monoklonaler IgG-Antikörper gegen Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (IgG1-Antikörper cA2). Genauer handelt es sich dabei um ein chimäres Protein mit 25-prozentigem Mausanteil. Die konstanten Regionen sind hierbei humanen, die variablen Regionen murinen Ursprungs. In Kombination mit Methotrexat findet der TNF- $\alpha$ -Antikörper in der Therapie der rheumatoiden Arthritis Verwendung. Weitere Anwendungsgebiete liegen in der Behandlung der Spondylitis ankylosans, der Psoriasisarthritis und des Morbus Crohn (Nash 2005, S. 205). Der Antikörper wendet sich dabei gegen den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , der bei den genannten Erkrankungen wesentlich am Entzündungsgeschehen beteiligt ist. Um die Wirkung von Infliximab besser zu verstehen, mag es zunächst hilfreich sein, sein Antigen einer näheren Betrachtung zu unterziehen.

### **1.4.1. Tumornekrosefaktor**

Die Bezeichnung „Tumornekrosefaktor“ rührt her von der Fähigkeit dieses Zytokins, in bestimmten Tumoren, beispielsweise Sarkomen, eine hämorrhagische Nekrose hervorzurufen. Schon 1893 hatte Coley von der teilweise erfolgreichen Behandlung maligner Tumoren beim Menschen durch wiederholte Injektion von kleinen Mengen von Bakterienkulturen („*Streptococcus erysipelatis*“) in den Tumor berichtet (Coley 1893, S. 487 ff). Bei Labortieren war das Phänomen der Tumorlyse zunächst nach Gabe von „bakteriellem Polysaccharid“, das später als bakterielles Endotoxin identifiziert wurde, beobachtet worden (Shear 1943, S. 95, Shear 1944, S. 474). Im Jahre 1962 beschrieben O'Malley et al. die nekrotisierende Wirkung des Serums von mit *Serratia marcescens* infizierten Mäusen auf das auf andere Mäuse transplantierte Sarkom 37 (O'Malley 1962, S. 1174). In vitro jedoch entfaltet bakterielles Endotoxin keine zytotoxische Wirkung. Daraus schloss man, dass es indirekt zur Nekrose von Tumorgewebe führen musste. Als entsprechenden Mediator, der auch in vitro wirkt, fanden Carswell et al. 1975 den Tumornekrosefaktor im Serum von mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) infizierten Mäusen (Carswell 1975, S. 3668).

Die Hauptaufgabe des TNF liegt jedoch sicher nicht in der Lyse von Tumorzellen. Vielmehr ist die Pathophysiologie dieses Zytokins äußerst komplex, zumal es in zwei

unterschiedlichen Formen existiert: TNF- $\alpha$  (auch Kachektin genannt) und TNF- $\beta$  (auch Lymphotoxin genannt). TNF- $\alpha$  wird von Monozyten, Makrophagen und einigen anderen Zellen ausgeschüttet, während TNF- $\beta$  von Lymphozyten und ebenfalls von einigen anderen Zellen freigesetzt wird. Die Aminosäuresequenz des TNF- $\beta$  ist lediglich zu ca. 30 % identisch mit der von TNF- $\alpha$  (Pennica 1984, S. 728). Trotzdem zeigen beide Polypeptide ganz ähnliche Effekte: Sie wirken zytotoxisch auf Tumorzelllinien *in vitro* und induzieren eine hämorrhagische Nekrose *in vivo* (Pennica 1984, S. 728; Gray 1984, S. 723). Sie binden als Trimere (Eck 1989, S. 17597; Eck 1991, S. 2120) an dieselben Rezeptoren, wirken proinflammatorisch durch Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Shalaby 1985, S. 2072) und antiviral durch Interaktion mit Interferon- $\gamma$  (Wong 1986, S. 822).

Bisher konnten zwei TNF-Rezeptoren identifiziert und kloniert werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Molekularmasse von 55 kDa (p55) bzw. 75 kDa (p75) und in ihrer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne, an welche das Zytokin bindet, ist zwischen beiden Rezeptoren zu 28 % homolog. Es ist anzunehmen, dass sich auch die Signaltransduktionswege der Rezeptoren unterscheiden und dadurch verschiedene Stoffwechselfvorgänge gesteuert werden. Dies erklärt wenigstens zum Teil die variablen Wirkungen des Tumornekrosefaktors. Die TNF-Rezeptoren TNF-R1 (55 kD) und TNF-R2 (75 kD) gehören wie der Erythropoietin-Rezeptor zu den Zytokin-Rezeptoren.

#### **1.4.2. Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Das Polypeptid Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wird vor allem von Makrophagen und Monozyten ausgeschüttet (Vassalli 1992, S. 412), die durch bakterielle Lipopolysaccharide aktiviert wurden. Jedoch sind auch andere Zellarten zur Freisetzung des Zytokins befähigt, so etwa T-Lymphozyten (Steffen 1988, S. 2622), Mastzellen (Gordon 1990, S. 274), segmentkernige Leukozyten nach Stimulation durch Lipopolysaccharide oder *Candida albicans* (Dubravec 1990, S. 6759; Djeu 1990, S. 1408), Keratinozyten nach Behandlung mit Endotoxin oder UV-Licht (Köck 1990, S. 1610), Astrozyten und Mikroglia (Sawada 1989, S. 394; Chung 1990, S. 3000), glatte Gefäßmuskelzellen (Warner 1989, S. 104) und verschiedene Tumorzellen wie das Fibrosarkom der Maus (Rubin 1986, S. 1353), sowie epitheliale Tumorzelllinien beim Menschen (Spriggs 1988, S. 457).

TNF- $\alpha$  ist ein Zytokin mit einem fast schon unüberschaubaren Wirkungsspektrum und ubiquitärem Vorkommen im Körper. Ferner besitzt es natürlich nicht nur zerstörerisches, sondern oft genug auch protektives Potential, etwa bei der Bekämpfung von Infektionen durch gramnegative Bakterien oder Mykobakterien. Allerdings ist es auch mitverantwortlich für die Abläufe beim septischen Schock. Als Entzündungsmediator spielt es außerdem eine wesentliche Rolle in der Pathogenese autoimmun vermittelter Erkrankungen. Es nimmt Einfluss auf zahlreiche Stoffwechselfvorgänge, hat hormonähnliche Wirkung, wenn es in größerer Menge ausgeschüttet wird. Neben Interleukin-1 gilt es als endogenes Pyrogen. Es hemmt die Gerinnung und beeinträchtigt die Blutbildung (Pichler 2001, S. 540 f). Fibroblasten werden durch TNF zur Proliferation angeregt (Piguet 1990, S. 104); dadurch scheint das Zytokin an der Entstehung von Fibrosen mitbeteiligt zu sein. Weiter wurde TNF- $\alpha$  für die Kachexie bei Versuchstieren verantwortlich gemacht, weshalb es zuweilen auch als Kachektin bezeichnet wird (Beutler 1985, S. 553). Beim Menschen konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Socher 1988, S. 598). Es ist anzunehmen, dass TNF- $\alpha$  erst im Zusammenspiel mit vielen weiteren Faktoren wirksam wird.

### **1.4.3. Der TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab in der klinischen Anwendung**

Die Möglichkeit, den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  zu inhibieren, hat zu beachtlichen Erfolgen in der immunsuppressiven Therapie geführt und findet deshalb immer weitere Verbreitung. Für die klinische Anwendung stehen neben dem chimären IgG 1-Antikörper Infliximab noch zahlreiche weitere Inhibitoren des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  zur Verfügung, beispielsweise der humane IgG 1-Antikörper Adalimumab, das dimere Fusionsprotein Etanercept mit zwei TNF- $\alpha$ -Rezeptoren, die an ein Fc-Antikörperfragment gekoppelt sind, sowie der lösliche humane TNF- $\alpha$ -Rezeptor Onercept. Häufige Anwendungsgebiete sind die rheumatoide Arthritis, die Psoriasis und der Morbus Crohn, aber auch die Colitis ulcerosa und die Spondylitis ankylosans.

Bei einem Therapeutikum, das eine so hohe Effizienz besitzt wie die Inhibitoren des Tumornekrosefaktors- $\alpha$ , sind fast zwangsläufig auch unerwünschte Nebenwirkungen zu erwarten. Von der immunsuppressiven Substanz Infliximab ist bekannt, dass sie eine latente Tuberkulose reaktivieren kann (Gómez-Reino 2003, S. 2126). Deshalb sollte bei jedem Patienten vor einer Behandlung mit Infliximab eine Tbc ausge-

geschlossen werden. Unter Therapie mit Infliximab wurde neben vermehrten Infektionen durch opportunistische Erreger auch die Exazerbation einer chronischen Hepatitis B und C gesehen. Immunsuppression begünstigt jedoch nicht nur Infektionen, sondern auch die Entstehung von Tumoren. Möglicherweise spielt Infliximab auch bei der erhöhten Inzidenz von Non-Hodgkin-Lymphomen bei Patienten mit rheumatischer Arthritis eine Rolle. Dies ist jedoch nicht ausreichend gesichert. Selten kann sich unter Therapie mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper ein SLE-like-Syndrom entwickeln, dies bei Patienten, bei denen zuvor kein systemischer Lupus erythematoses bekannt war (De Bandt 2005, S. R546).

Eine besondere Organtoxizität, die etwa bei Niereninsuffizienz eine Dosisanpassung nötig machen würde, scheint im Übrigen nicht zu bestehen. Die Verstoffwechslung von Infliximab erfolgt im retikuloendothelialen System.

## **1.5 Problemstellung**

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, das Zytokin Erythropoietin und den TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab im Tierversuch auf ihr mögliches Potential zur Radioprotektion der Niere hin zu untersuchen.

Eine ausreichende Prävention von Strahlenschäden an der Niere nach abdomineller Bestrahlung ist nach dem heutigen Stand der Forschung und Technik noch nicht gegeben.

Die Nierenfunktion von Patienten mit intraabdominellen oder primär systemischen Tumoren wird nicht nur durch den Einsatz ionisierender Strahlung gefährdet, sondern in nicht unerheblichem Maße auch durch die zusätzlich notwendige Gabe von nephrotoxischen Chemotherapeutika. Gleichzeitig erfordert die Einhaltung der Schwellendosis kritischer Organe wie der Niere zuweilen Kompromisse bei der Wahl des Zielvolumens. Dies kann sich nachteilig auf die Tumorkontrollwahrscheinlichkeit auswirken.

Für ein optimales therapeutisches Ergebnis wäre also eine effektivere Protektion besonders gefährdeter Organe wünschenswert - bei zugleich ausreichend hoher Strahlendosis.

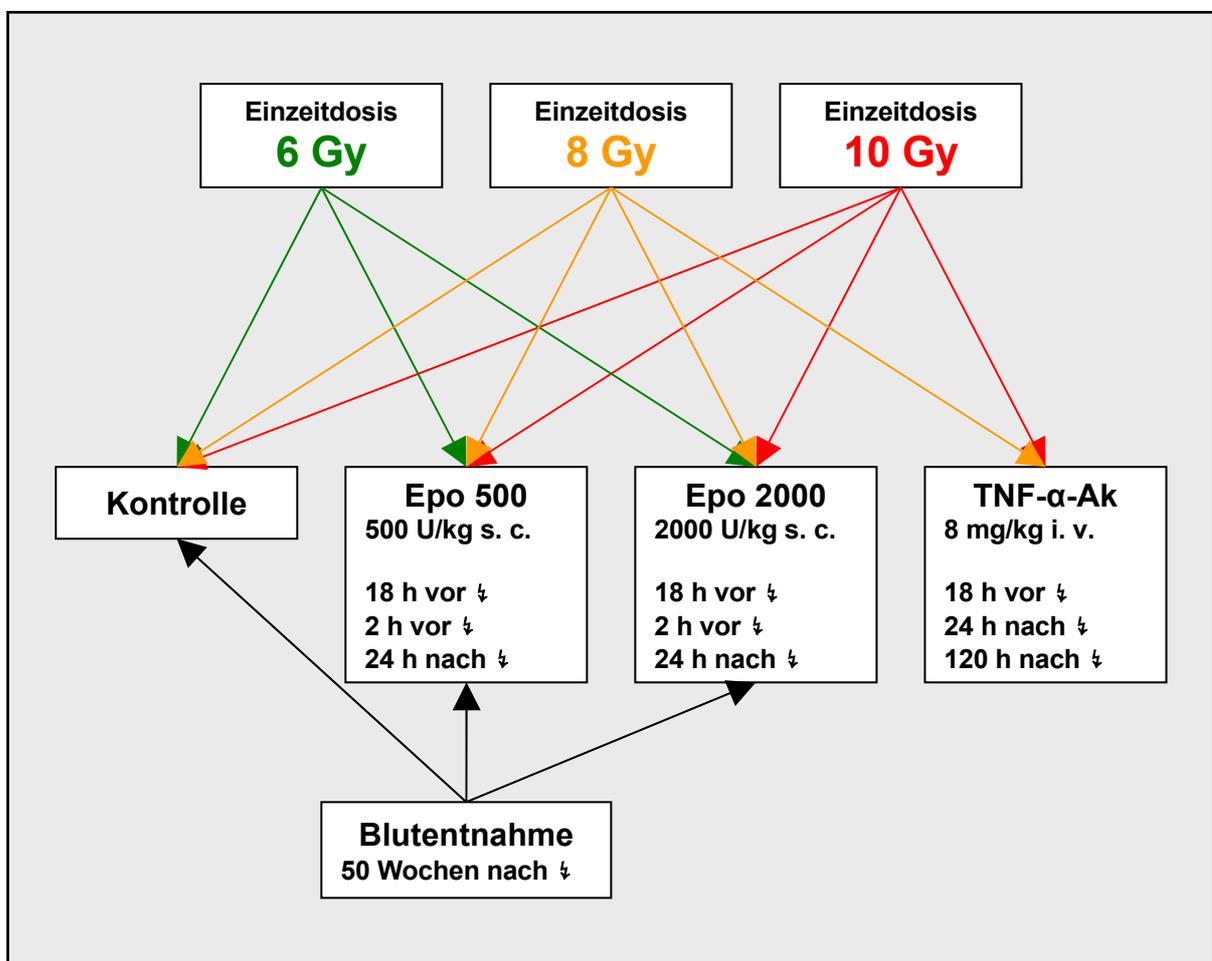
Für die vorliegende Arbeit ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Lässt sich in einem Beobachtungszeitraum von 50 Wochen nach Bestrahlung eine Verschlechterung der Nierenfunktion bei den verwendeten Strahlendosen von 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy beobachten?
2. Welchen Einfluss hat bei einer tatsächlichen Verschlechterung der Nierenfunktion nach Bestrahlung die Gabe von Erythropoietin bzw. Infliximab auf die Funktion der rechten Niere von weiblichen C3H-Mäusen?
3. Fällt die Verschlechterung der Nierenfunktion bei den medikamentös behandelten Tieren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe geringer aus?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Aufbau des Experiments

Insgesamt wurden 72 Mäuse in das Experiment aufgenommen. Die Tiere wurden auf vier Versuchsarme verteilt. Ein Versuchsarm diente als Kontrolle (KO), während in den drei übrigen Versuchsarmen den Tieren jeweils eine der beiden untersuchten Substanzen, teilweise in unterschiedlicher Dosierung, verabreicht wurde. Innerhalb jedes Versuchsarms wurden ferner Gruppen gebildet, die in einzeitiger Bestrahlung unterschiedliche Strahlendosen erhielten, nämlich 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy.



**Abbildung 1**

*Aufbau des Experiments. Einteilung in die vier Versuchsarme Kontrolle, Epo 500, Epo 2000 und TNF- $\alpha$ -Ak, jeweils mit Angabe der verabreichten Medikamentendosis und Injektionsart, außerdem zeitlicher Bezug der Injektionen zur Bestrahlung (↕). Verteilung der Strahlendosen auf die Versuchsarme. Die Bestrahlung erfolgte einzei-*

tig. Blutentnahme zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung bei Kontrolle, Epo 500 und Epo 2000.

**Tabelle 2**

Einteilung der Versuchsgruppen mit Anzahl der eingeschlossenen Mäuse.

Versuchsarm	Strahlendosis			Summe
	6 Gy	8 Gy	10 Gy	
<b>1: Kontrolle</b>	7	8	5	20
<b>2: Epo 500</b>	6	6	7	19
<b>3: Epo 2000</b>	5	6	7	18
<b>4: TNF-<math>\alpha</math>-Ak</b>	0	8	7	15
<b>SUMME</b>	18	28	26	<b>72</b>

Drei bis vier Tage nach einer ersten Nierenszintigraphie, in der die Ausgangswerte der Nierenfunktion festgestellt wurden, erfolgte die einzeitige Bestrahlung der rechten Niere jeder Maus. In der 20. Woche nach Bestrahlung wurde die erste Kontrollszintigraphie durchgeführt. Weitere Szintigraphien zur Verlaufsbeobachtung folgten von da an alle sechs Wochen. Die Nachbeobachtungszeit ab Bestrahlungstag betrug insgesamt 50 Wochen (350 Tage).

Die Verabreichung der Pharmaka per Injektion fand abhängig von der zu untersuchenden Substanz zu bestimmten Zeitpunkten um den Tag der Bestrahlung herum und an demselben statt. Genaue Zeitangaben folgen in den Einzeldarstellungen der verschiedenen Versuchsarme.

**Tabelle 3**

*Für alle Versuchsarme gültiger zeitlicher Ablauf.*

---

	1. Szintigraphie
<b>1. Woche</b>	Bestrahlung Injektion von Pharmaka
<b>20. Woche</b>	2. Szintigraphie
<b>26. Woche</b>	3. Szintigraphie
<b>32. Woche</b>	4. Szintigraphie
<b>38. Woche</b>	5. Szintigraphie
<b>44. Woche</b>	6. Szintigraphie
<b>50. Woche</b>	7. Szintigraphie

---

**Versuchsarm 1: Kontrolle**

Der Kontrollarm bestand aus 20 Mäusen.

Es fand keine Injektion von Pharmaka statt.

Bei der Bestrahlung erhielten sieben Tiere eine Dosis von 6 Gy, acht Tiere eine Dosis von 8 Gy und fünf Tiere eine Dosis von 10 Gy.

**Versuchsarm 2: Epo 500**

Behandelt wurden 19 Tiere.

Die Injektion von 500 U/kg KG Epoetin alpha (Janssen-Cilag, Neuss, Germany) erfolgte subkutan in die Nackenfalte. Bei einem Körpergewicht von ca. 20 g erhielt jedes Tier 10 U oder 5 µl der fertigen Lösung.

Insgesamt fanden drei Injektionen zu folgenden Zeitpunkten statt:

- 18 h vor Bestrahlung
- 2 h vor Bestrahlung
- 24 h nach Bestrahlung

Bei der Bestrahlung erhielten sechs Tiere eine Dosis von 6 Gy, sechs Tiere eine Dosis von 8 Gy und sieben Tiere eine Dosis von 10 Gy.

### **Versuchsarm 3: Epo 2000**

Behandelt wurden 18 Tiere.

Die Injektion von 2000 U/kg KG Epoetin alpha (Janssen-Cilag, Neuss, Germany) erfolgte subkutan in die Nackenfalte. Bei einem Körpergewicht von ca. 20 g erhielt jedes Tier 40 U oder 20 µl der fertigen Lösung.

Insgesamt fanden drei Injektionen zu folgenden Zeitpunkten statt:

- 18 h vor Bestrahlung
- 2 h vor Bestrahlung
- 24 h nach Bestrahlung

Bei der Bestrahlung erhielten fünf Tiere eine Dosis von 6 Gy, sechs Tiere eine Dosis von 8 Gy und sieben Tiere eine Dosis von 10 Gy.

### **Versuchsarm 4: TNF- $\alpha$ -Ak**

Behandelt wurden 15 Tiere.

Die Injektion von 8 mg/kg KG Infliximab erfolgte intravenös in die Schwanzvene. Bei einem Körpergewicht von ca. 20 g erhielt jedes Tier 0,16 mg in 200 µl der 12,5-fach verdünnten Standardlösung (100 mg/10 ml).

Insgesamt fanden 3 Injektionen zu folgenden Zeitpunkten statt:

- 18 h vor Bestrahlung
- 24 h nach Bestrahlung
- 120 h nach Bestrahlung

Bei der Bestrahlung erhielten acht Tiere eine Dosis von 8 Gy und sieben Tiere eine Dosis von 10 Gy.

## **2.2. Tiere und Tierhaltung**

Die Versuche erfolgten an weiblichen C3H/HeN Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 68 - 72 Tagen. Zu Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Körpergewicht der Mäuse 20 g.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen bis maximal 20 Tieren in Macrolonkäfigen auf entstaubter und entkeimter Weichholzstreu (Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage, Deutschland) im Tierstall des Instituts für Experimentelle Onkologie der Technischen Universität München im Klinikum rechts der Isar. Die Tiere erhielten pelletiertes Futter (Altromin 1324, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage, Deutschland) und reines Leitungswasser über eine Nippeltränke ad libitum. Die Raumtemperatur betrug 21 - 24 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 – 60 %. Über eine Zeitschaltautomatik erfolgte die Regelung eines Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden. Die Tiere befanden sich die ganze Zeit über unter tierärztlicher Betreuung.

Eine Tierversuchsgenehmigung der Regierung von Oberbayern lag vor.



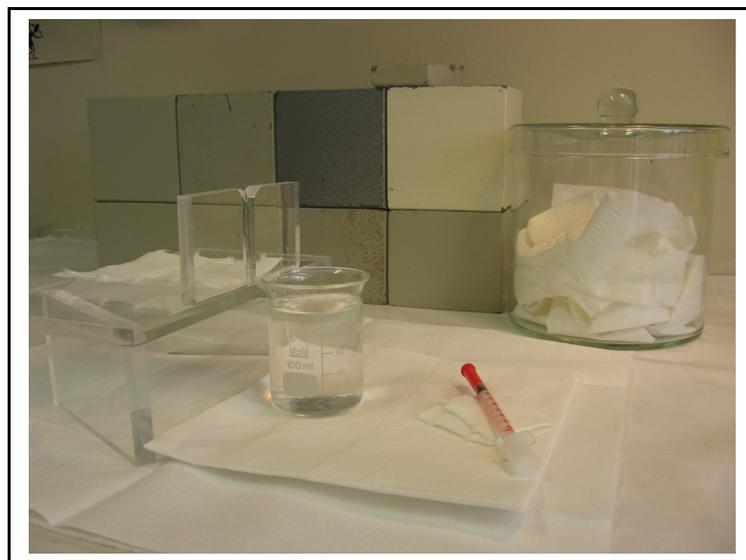
**Abbildung 2**

*Tierhaltung. Macrolonkäfig mit pelletiertem Futter, Leitungswasser über Nippeltränke, Weichholzstreu und Unterschlupfmöglichkeit aus Weichholz und Zellstoff.*

### 2.3. Injektionstechniken

Für das vorliegende Projekt kamen drei verschiedene Injektionstechniken zur Anwendung: die intravenöse Injektion in die Schwanzvene, die intraperitoneale Injektion und die subkutane Injektion in die Nackenfalte.

Für die Nierenzintigraphie wurde im nuklearmedizinischen Labor  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA intravenös in eine der beiden lateralen Schwanzvenen der Maus verabreicht. Nach einer kurzen Inhalationsnarkose mittels Diethylether im Etherglas wurde das Tier auf einem kleinen Injektionstisch aus Plexiglas gelagert (Abbildung 3).

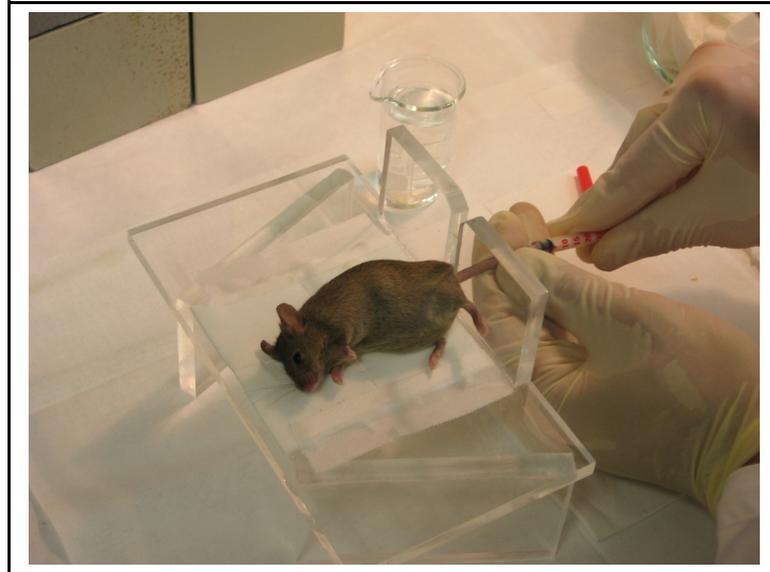


#### Abbildung 3

*Aufbau zur intravenösen Injektion in die Schwanzvene am nuklearmedizinischen Arbeitsplatz. Injektionstisch aus Plexiglas, Glasgefäß mit warmem Wasser zur Dilatation der Schwanzvenen, Insulinspritze BD Micro-Fine 1 ml und Tupfer, Glasgefäß zur Inhalationsnarkose gefüllt mit Diethylether-getränkten Papiertüchern, Bleiburg zur Abschirmung von radioaktivem Material wie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA aufgezogenen Spritzen.*

Um eine leichte Dilatation der Venen zu erreichen, wurde der Schwanz des Tieres zunächst einige Sekunden in warmes Wasser getaucht und anschließend mit einem Tupfer unter vorsichtigem Reiben abgetrocknet. An einem Ende der Platte des Injektionstisches war eine durch einen Längsspalt zweigeteilte Wand angebracht. Der Schwanz des Tieres wurde zur besseren Fixation durch diesen Spalt geführt und zur Injektion vorsichtig gespannt gehalten. Die Injektion in eine der beiden lateralen

Schwanzvenen erfolgte sodann wie auf Abbildung 4 zu sehen mit einer Insulinspritze (BD Micro-Fine 1 ml, K-40 Insulin, 29 G).



#### **Abbildung 4**

*Intravenöse Injektion des Radiopharmakons  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA in eine der beiden lateralen Schwanzvenen einer C3H-Maus. Die Lagerung der Maus erfolgte in Seitenlage. Eine kurzzeitige Sedierung wurde durch Inhalationsnarkose mit Diethylether erreicht.*

Die Injektion von Infliximab erfolgte ebenfalls intravenös in die Schwanzvene. Die Maus wurde dabei zur Narkose mit dem Kopf in einer mit Sauerstoff und Isofluran gefluteten Kriechröhre gelagert. Die besagte Röhre besaß außer den Anschlüssen für Sauerstoff- und Isofluranzufuhr ein geschlossenes und ein offenes Ende. Das offene Ende der Röhre wurde mit einem üblichen Gummihandschuh bezogen und dahinein eine kleine Öffnung für den Kopf der Maus geschnitten. Die Tiere krochen dabei meist selbst weiter in die Röhre, wenn man die Mäuse mit der Schnauze in die Öffnung führte. Der Schwanz jedoch wurde vom Untersucher vorsichtig außerhalb gehalten, bis eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war. Auf diese Weise waren gleichzeitig eine kontinuierliche Narkose unter Spontanatmung und die Injektion in die Schwanzvene möglich.

Für qualitativ gute szintigraphische Aufnahmen war es notwendig, die Mäuse möglichst bewegungsarm in Rückenlage auf dem Detektor der Gammakamera zu fixieren. Dies konnte durch eine Narkose mit einer intraperitoneal verabreichten Mischung aus Ketamin, Rompun und Kochsalzlösung (10 ml Ketavet, 8 ml Rompun, 82

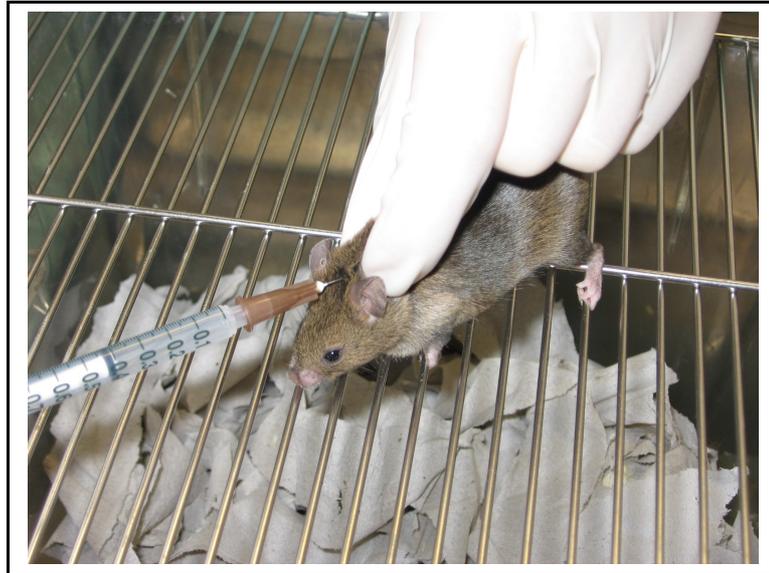
ml NaCl) sehr zufriedenstellend erreicht werden. Zur Injektion wurden 1 ml Tuberculin-Spritzen (Codan) mit Kanülen von 26 G Außendurchmesser verwendet (BD Microlance 3, 26 G, 0,45 x 10 mm). Die Maus wurde dabei mit Daumen und Zeigefinger in der Nackenfalte gehalten, gleichzeitig wurde der Schwanz zwischen kleinen Finger und Ringfinger geklemmt (Abbildung 5). Durch diesen Griff wurde bei Supination der haltenden Hand der Bauch des Tieres exponiert. Zu beachten war dabei eine leichte Kopftieflage der Maus, durch die der Abdomeninhalt ein wenig nach kranial verlagert wurde. Die Injektion erfolgte sodann rasch in den rechten unteren Quadranten des Abdomens. Darmperforationen oder anderweitige Verletzungen von Baueingeweiden wurden nicht beobachtet.



### **Abbildung 5**

*Intraperitoneale Injektion von Narkotikum (Ketamin, Rompun, NaCl) zur Sedierung vor der Lagerung auf dem Detektorfeld der Gammakamera. Die Maus wird an Schwanzbasis und Nackenfalte gehalten. Injiziert wird in leichter Kopftieflage.*

Der gleiche Griff wurde bei der subkutanen Injektion von Erythropoietin in die Nackenfalte angewandt. Das Tier erhielt dabei jedoch die Möglichkeit, sich weiterhin am Gitter der Käfigabdeckung festzuhalten (Abbildung 6). Die Injektion erfolgte mit Hilfe eine Mikroliterspritze (Hamilton 5 µl) zwischen Daumen und Zeigefinger der haltenden Hand hindurch, dem Verlauf der Wirbelsäule folgend in das Subkutangewebe der Nackenfalte.

**Abbildung 6**

*Subkutane Injektion in die Nackenfalte. Im Versuch wurde im Gegensatz zu der auf dieser Abbildung gezeigten Tuberculin-Spritze (Codan) mit Microlence-Kanüle (26 G) eine Mikroliterspritze (Hamilton, 5  $\mu$ l) verwendet.*

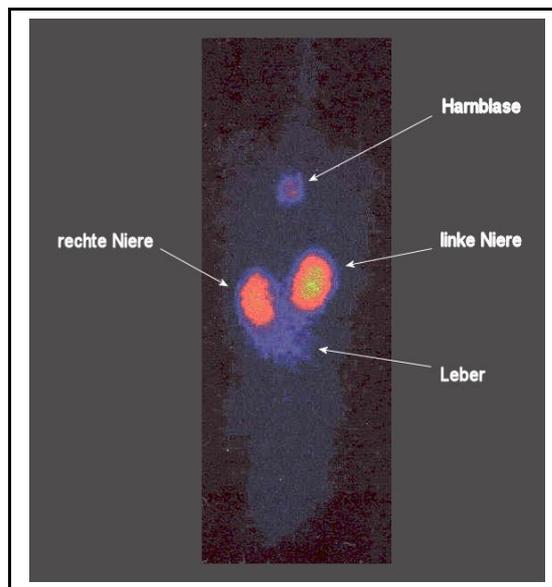
## 2.4 Szintigraphie

### 2.4.1. Statische Nierenzintigraphie mit $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA

In der konventionellen planaren Szintigraphie nimmt das Radionuklid  $^{99m}\text{Tc}$  eine herausragende Stellung ein. Seine kurze Halbwertszeit von ca. 6 h gewährt einerseits die Möglichkeit zur Beobachtung physiologischer Prozesse und hält andererseits die Strahlenexposition auf einem akzeptablen Niveau. Überdies ist es mit Hilfe eines [ $^{99}\text{Mo}$ ]/[ $^{99m}\text{Tc}$ ]-Mutter-Tochter-Nuklidgenerators leicht und schnell herzustellen (Schi-cha 2003, S. 25). Im Generator ist [ $^{99}\text{Mo}$ ] auf einer Aluminiumoxidsäule fixiert. Beim Zerfall des [ $^{99}\text{Mo}$ ] entsteht Pertechnetat ([ $^{99m}\text{Tc}$ ]TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>), das leicht mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung eluiert werden kann (Brandau 1999, S. 81). Die  $^{99m}\text{Tc}$  Pertechnetat-lösung aus dem Generator wird der DMSA-Lösung hinzugefügt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit steht das entstandene Gemisch zur Injektion bereit.

Die statische Nierenzintigraphie dient zur Beobachtung langsam verlaufender physiologischer Prozesse und zur Beurteilung der Nierenmorphologie. Etwa 3 h nach intravenöser Injektion erreicht das  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA seine maximale Konzentration in der Nierenrinde. Etwa 50 % der radioaktiven Substanz befinden sich dann in der Niere, ca. 20 % liegen im Plasma an Proteine gebunden vor, etwas weniger als 10 % in Leber und Muskulatur. Dimercaptobernsteinsäure reichert sich vermutlich durch peritubuläre Reabsorption in den Zellen des proximalen Nierentubulus an (Mallinckrodt 2005). Die Kumulation ist von der Durchblutung der Nierenrinde in funktionierenden Bereichen des Cortex renalis abhängig. Die renale Aufnahme von DMSA korreliert dabei mit dem Nierenvolumen (Kawamura 1984, S. 171). Auch die glomeruläre Filtrationsrate und der relative effektive Plasmafluss korrelieren gut mit der Aufnahme von DMSA in die Nierenrinde (Taylor 1986, S. 31).

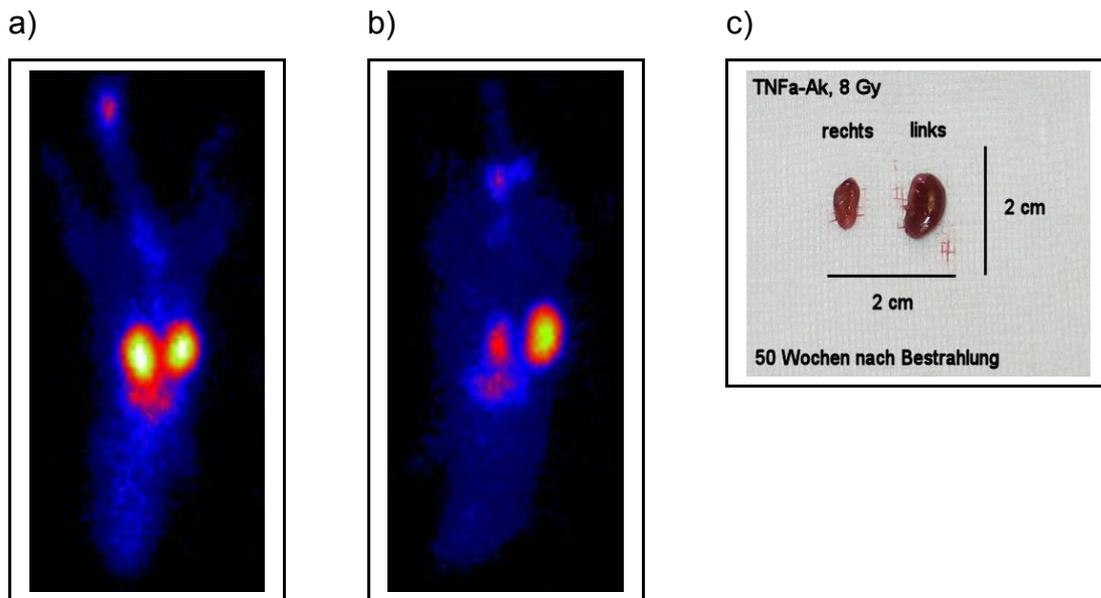
Die Nierenfunktion wird mit der hier vorgestellten Methode nicht quantitativ bestimmt, wie es bei einer Bestimmung der Nierenclearance der Fall ist. Es entsteht vielmehr eine Momentaufnahme des funktionierenden Nierenparenchyms. Nach der Bestrahlung ausgefallenes Nierengewebe ist nicht mehr in der Lage, das an das Radionuklid gekoppelte DMSA aufzunehmen. In Relation zu der „gesunden“ unbestrahlten Niere kann so ein Funktionsverlust der bestrahlten Niere gezeigt werden.



### **Abbildung 7**

*Anatomische Verhältnisse auf dem Szintigramm der Maus ca. 5 Stunden nach Injektion von  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA. Etwa 50 % des Radiopharmakons befindet sich bereits 3 Stunden nach Injektion in den Nieren, weitere 20 % liegen an Plasmaproteine gebunden vor, weniger als 10 % sind in Leber und Muskel gelangt. Nur ein geringer Teil wird über die Nieren ausgeschieden und sammelt sich in der Harnblase.*

Die statische Nierenszintigraphie mit einer tubulär gespeicherten Substanz wie DMSA hat gegenüber der Nierenfunktionsszintigraphie mit glomerulär filtrierte Substanzen wie EDTA einige Vorteile. Die Untersuchung der Nierenfunktion ist auch dann noch möglich, wenn sie bereits stärker eingeschränkt ist. Bei Mäusen schwierig durchzuführende und belastende Blutentnahmen zur Bestimmung der Plasmaaktivitätskonzentration sind nicht notwendig. Die Injektion des  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA muss nicht streng intravasal erfolgen. Auch bei teilweise paravasaler Injektion wird das statische Bild, das erst Stunden später aufgenommen wird, nicht wesentlich beeinflusst. Dies ist von Bedeutung, da die Venenverhältnisse nach wiederholten Injektionen durch die Bildung von Granulomen verschlechtert werden. Durch die Narkose während der Tracerinjektion werden die Kreislaufverhältnisse der Tiere in unterschiedlichem Maße beeinflusst. Dadurch kann auch die glomeruläre Filtrationsrate verändert werden. Bei der statischen Nierenszintigraphie spielt das jedoch eine untergeordnete Rolle. Die statische Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA stellte für dieses Projekt folglich eine praktikable Methode zur Bestimmung der seitengetrennten Nierenfunktion auch bei wiederholten Messungen in langen Abständen dar.



### Abbildung 8

C3H-Maus aus der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“.

a) 1. Szintigraphie zum Zeitpunkt 0 Wochen. Die rechte Niere zeigt mit 55 % Anteil an der Gesamtfunktion beider Nieren eine leicht stärkere Aktivität als die linke Niere.

b) 7. Szintigraphie zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung. Die bestrahlte rechte Niere weist eine gewisse Restfunktion auf. Der Anteil an der Gesamtfunktion beider Nieren beträgt noch 24 %.

c) Rechte und linke Niere nach Entnahme zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung. Die linke Niere zeigt sich normal groß (ca. 1 cm x 0,5 cm), während die bestrahlte rechte Niere einen erheblichen Parenchymverlust aufweist, wie es schon im Szintigramm ersichtlich war.

### 2.4.2. Ablauf der szintigraphischen Untersuchung

Zur Bestimmung der Nierenfunktion wurde eine statische Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA (Dimercaptosuccinat, TechneScan® DMSA Germany, Mallinckrodt Medical BV, Petten, NL) durchgeführt. Dazu wurden jeder Maus 100  $\mu\text{l}$  einer  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Lösung mit einer Aktivität von 100 MBq/ml unter kurzer Diethylether-Narkose (Apotheke des Klinikums rechts der Isar) in die Schwanzvene injiziert. Die applizierte Aktivität pro Maus betrug somit 10 MBq.

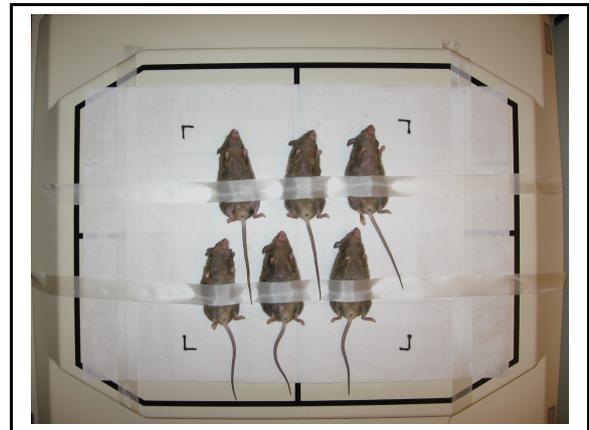
Die Aufnahme an der Forte™ Gammakamera mit VXHR Kollimatoren (ADAC, heute Philips Medical Systems) erfolgte fünf Stunden nach Injektion. Bis dahin hatte sich das  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA deutlich in den Nieren und in geringem Maße auch in der Leber

angereichert. Zum Zwecke einer möglichst bewegungsfreien Lagerung wurden jeder Maus 100 µl eines Narkotikums, bestehend aus 10 ml Ketavet® (100 mg/ml Ketamin, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) und 8 ml Rompun® 2 % (20 mg/ml Xylazin, Bayer) in 82 ml physiologischer NaCl-Lösung (Isotonische Natriumchloridlösung 0,9 %, DeltaSelect), i. p. verabreicht. Nach Wirkungseintritt wurden die Mäuse in Gruppen von bis zu zehn Tieren mittels eines Streifens Leukosilk-Klebeband vorsichtig in Rückenlage auf dem Detektor fixiert (Abbildung 9). Durch die Rückenlage wurde die Distanz der retroperitoneal gelegenen Nieren zum Detektor optimiert. Wegen des in Narkose fehlenden Lidschlussreflexes wurden die Augen der Mäuse zum Schutz der Cornea mit Augensalbe (Vidisic, Dr. Mann Pharma, Berlin) versorgt.

a)



b)

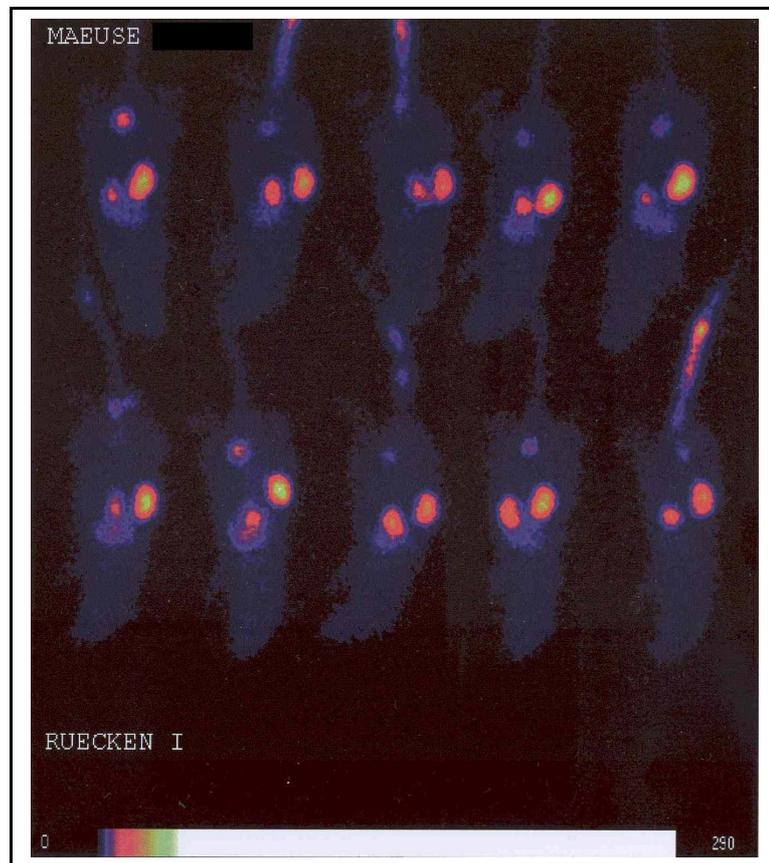


### **Abbildung 9**

a) Ansicht der Forte™ Gammakamera mit neun auf dem unteren Detektor gelagerten Mäusen.

b) Detailansicht zur Lagerung der Mäuse auf dem Detektor der Forte™ Gammakamera. Fixierung der Tiere unter Anästhesie in Spontanatmung durch Leukosilk-Klebeband im Aufnahmeveld des Detektors (CENTER FIELD, Zoom 25,4). Auf diese Weise konnte die Aufnahme von bis zu zehn Tieren gleichzeitig bewerkstelligt werden.

Die Aufnahmezeit unter dem Protokoll „KS Knochen SPAET“ betrug 300 Sekunden. Abbildung 10 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer szintigraphischen Aufnahme von zehn Tieren. Das entstandene Szintigramm zeigt die Tiere aus der Sicht des Detektors. Deshalb sind auf der Aufnahme oben und unten vertauscht. Die rechte Niere wird auf dem Szintigramm links abgebildet und umgekehrt.



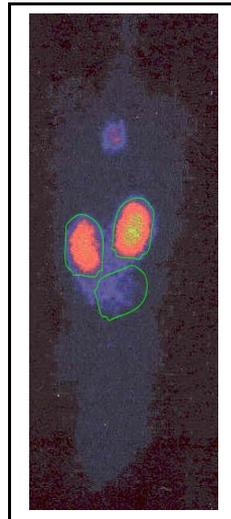
### **Abbildung 10**

*Szintigramm von zehn Mäusen. Die Aufnahme erfolgte in Rückenlage. Die linke Seite auf der Abbildung entspricht der rechten Seite am Tier. Die Maus, die sich auf der Abbildung links unten befindet, lag auf dem Detektor links oben.*

$^{99m}\text{Tc}$  hat eine relativ kurze Halbwertszeit von 6,02 h. Nach erfolgter Aufnahme wurden die Mäuse deshalb noch drei Tage im Stall isoliert gehalten. Damit wurde die zum Strahlenschutz geforderte Abklingzeit vom Zehnfachen der Halbwertszeit eingehalten.

### **2.4.3. Auswertung der Szintigramme**

Die Auswertung der Szintigramme erfolgte nach Übertragung auf das ADAC Pegasys Computersystem mit Hilfe des Programms ROI Analysis, Version 4.20. Dabei wurde zunächst eine Region of Interest (ROI) über der rechten Niere definiert. Diese wurde dann genau auf die linke Niere gespiegelt und zusätzlich auch in die Leber gelegt. So war es möglich, nach Subtraktion der Hintergrundaktivität des Extrazellulärraums, repräsentiert durch die Leber, die annähernd reine Aktivitätsaufnahme des Nierenparenchyms in Form von Total Counts, der Impulszahlen, zu ermitteln.



### **Abbildung 11**

*Regions of interest (ROIs) über beiden Nieren und der Leber. Die Festlegung der ROIs erfolgte zunächst über der rechten Niere. Ausgehend von dieser sind alle drei ROIs gleich groß und erlauben so einen direkten Vergleich der jeweiligen Impulszahlen. Die ROI über der Leber dient der Hintergrundkorrektur.*

Die Daten wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2003 eingegeben. Anschließend konnte der Anteil der Nierenfunktion an der Funktion beider Nieren errechnet werden, indem die Total Counts der rechten Niere zu den Total Counts beider Nieren zusammen ins Verhältnis gesetzt wurden.

## 2.5. Bestrahlung

### 2.5.1. Ablauf der Bestrahlung

Die Bestrahlung der rechten Niere jeder Maus erfolgte einzeitig mit 70 kV Röntgenstrahlen aus dem Weichstrahltherapiegerät RT 100 der Firma Philips. Nach Einleitung der Inhalationsnarkose mit 1,5 – 2,0 % Isofluran (Forene, Abbot GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und 0,5 l/min Sauerstoff wurde jedes Tier einzeln auf dem Bestrahlungstisch in Bauchlage gelagert, wobei die Schnauze im offenen Ende des Beatmungsschlauches positioniert wurde. Eine weitere Fixierung der Tiere war nicht notwendig. Die Narkose wurde während der Bestrahlungszeit mit Isofluran und Sauerstoff in der oben erwähnten Dosierung fortgeführt.

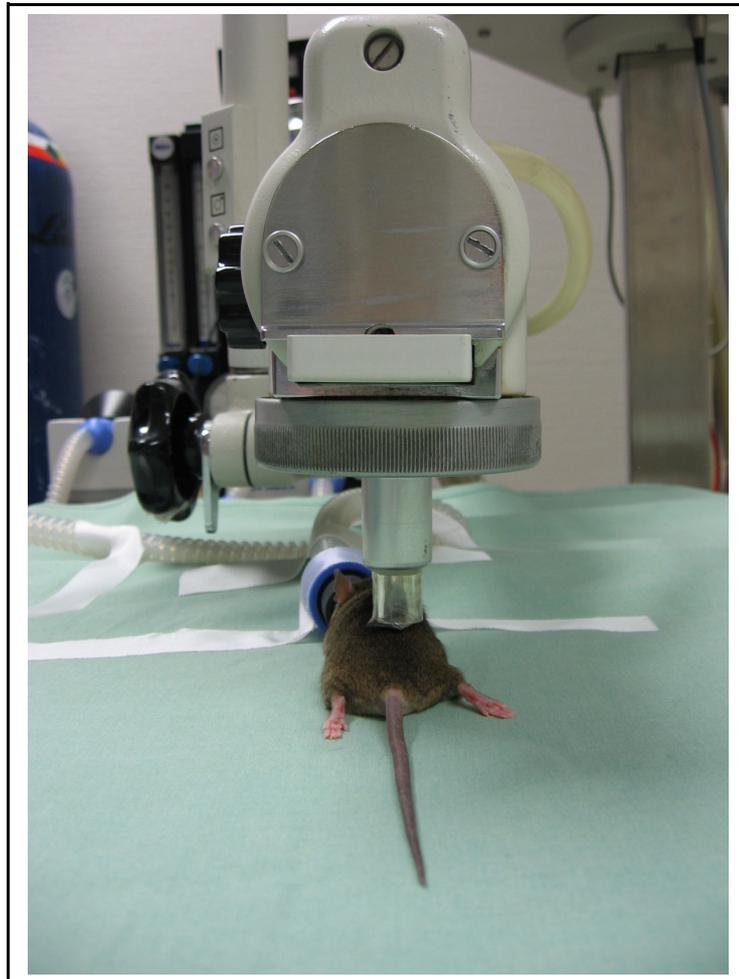


**Abbildung 12**

*Lagerung der Maus zur Bestrahlung unter Isofluran-Narkose. Der Abstand zwischen Schnauzenspitze und rechtem Nierenhilus betrug 4,5 – 5 cm. Die Abbildung ist nachgestellt und zeigt ein älteres Tier mit größerer Körperlänge als der der Tiere zum Zeitpunkt der Bestrahlung.*

Aus den szintigraphischen Grundaufnahmen hatte sich bei allen Tieren ein Abstand zwischen Schnauzenspitze und rechtem Nierenhilus von 4,5 – 5 cm ergeben. Ent-

sprechend wurden der Tubus und das Zentrum des Strahlenfeldes über dem rechten Nierenhilus ausgerichtet.



**Abbildung 13**

*Positionierung des Strahlerkopfes mit Tubus über der rechten Niere der Maus. Zusätzlich wurde noch eine Bleiabschirmung am Tubus befestigt, die über dem Rückgrat der Maus zu liegen kam.*

### **2.5.2. Bestrahlungsplanung**

Zur Bestrahlung verwendeten wir ein 1,5 cm großes Einzelstehfeld (runder Tubus, Durchmesser 1,5 cm) dorsal über der rechten Niere. Damit kam das Organ bei einer Größe von 0,8 – 1,0 cm komplett im Strahlenfeld zu liegen. Der Fokus-Haut-Abstand betrug 10 cm, die Energiedosisleistung 5,61 Gy/min. Laut Gerätehandbuch des RT 100 liegt die 10 %-Isodose 0,4 cm, die 5 %-Isodose 1,0 cm außerhalb der Feldpforte. Ohne weitere Maßnahmen wäre dadurch der mediale Anteil der linken Niere

von 10 %, der restliche Teil von 5 % der Maximaldosis betroffen gewesen. Um die linke Niere sicher aus dem Strahlenfeld herauszuhalten, installierten wir deshalb am Tubus eine Bleiabschirmung, die bei der Bestrahlung mittig über dem Rückgrat der Maus zu liegen kam (Abbildung 13).

### 2.5.3. Dosimetrie

Im Vorfeld der Bestrahlungen wurden die auf die Nierenoberfläche wirkenden Strahlendosen mit Hilfe von Thermolumineszenzdosimetern ermittelt. Diese wurden bei zuvor eingeschläferten Mäusen nach präparatorischer Darstellung der Nieren auf der dorsalen Organoberfläche fixiert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung wie oben beschrieben.

Bei einer konstanten Gleichspannung von 70 kV wurde ein 1,25 mm Al-Filter eingesetzt. Der Tubusdurchmesser betrug 1,5 cm. Ziel waren Einzeldosen von 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy im Bereich der Nierenrinde. Für die unterschiedlichen Strahlendosen ergaben sich folgende Bestrahlungszeiten:

#### ***Tabelle 4***

*Bestrahlungszeiten pro Applikationsdosis.*

<b>Applikationsdosis</b>	<b>Bestrahlungszeit</b>
<b>in Gy</b>	<b>in min</b>
6	1,07
8	1,43
10	1,79

## **2.6. Blutentnahme**

Zum Endpunkt der Untersuchung 50 Wochen nach Bestrahlung und nach der siebten und letzten Szintigraphie wurde bei den Tieren der Kontrollgruppe und der mit Erythropoietin behandelten Gruppen Blut entnommen. Untersucht werden sollten Kreatinin, Harnstoff und Hämatokrit. Die Laboranalysen wurden durchgeführt von der Vet Med Labor GmbH Ludwigsburg.

Um eine zur Analyse ausreichende Probenmenge zu erhalten, erfolgte die Blutentnahme kardial. Dazu wurden die Mäuse zunächst in einer mit Sauerstoff und Isofluran gefluteten Kammer narkotisiert. War eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, wurden sie aus der Kammer herausgenommen und auf dem Rücken gelagert. Die Kanüle zur Blutentnahme (Microlence) wurde unter dem Xiphoid in das Herz vorgeschoben und anschließend Blut aspiriert (1 ml Tuberculin-Spritze, Codan), das dann in mit EDTA präparierte Röhren des tiermedizinischen Labors umgefüllt wurde. Unmittelbar im Anschluss an die Blutentnahme wurden die noch narkotisierten Tiere in der CO<sub>2</sub>-Kammer eingeschläfert.

## **2.7. Auswertung der Rohdaten**

Das Programm „ROI-Analysis, Version 4.20“ der ADAC-Forte Gammakamera diente zur Auswertung der Szintigramme und lieferte die Rohdaten in Form von Total Counts (Impulszahlen) im Bereich der definierten Regions of Interest über beiden Nieren und der Leber jeder Maus. Diese Daten wurden anschließend in das Tabellenkalkulationsprogramm „Microsoft® Office Excel 2003“ eingegeben. Nach Subtraktion der Impulszahl des über der Leber definierten Hintergrunds wurden die Total Counts der rechten Niere zu der Summe der Total Counts beider Nieren ins Verhältnis gesetzt. In gleicher Art und Weise wurde mit den Daten jeder Szintigraphie verfahren, so dass sich eine entsprechende Verlaufsbeobachtung für jedes einzelne Tier ergab. Die so entstandenen Werte des Funktionsanteils der rechten Niere an der Gesamtfunktion beider Nieren wurden in das Statistikprogramm „SPSS 12.0 for Windows“ übertragen, mit dessen Hilfe alle weiteren Berechnungen vollzogen wurden. Die Verlaufsgrafiken wurden in Excel, alle anderen Diagramme in SPSS erstellt.

## **2.8. Statistische Auswertung**

Die Überprüfung auf Normalverteilung der initialen Nierenfunktionswerte erfolgt durch den Kolmogorov-Smirnov-Test und den Shapiro-Wilk-Test. Desweiteren wird die Verteilung der initialen Nierenfunktionswerte durch Histogramme veranschaulicht.

In Box- und Whiskerdiagrammen werden die Ausgangswerte sowohl aller Tiere gemeinsam als auch aufgetrennt nach den einzelnen Gruppen zum Vergleich nebeneinander gestellt. Das Box- und Whiskerdiagramm zur Veranschaulichung der Werteverteilung zeigt den Median, das erste und dritte Quartil und den größten (Maximum) und kleinsten Wert (Minimum). 50 Prozent aller Werte liegen demnach zwischen erstem und drittem Quartil. Als Ausreißer gelten Werte, die weiter als eineinhalb, aber nicht mehr als drei Kastenlängen außerhalb der Box liegen. Sie werden mit einem Kreis kenntlich gemacht.

Der absolute mittlere Funktionsverlust der rechten Niere wird stets mit Standardabweichung angegeben, ebenso alle übrigen Mittelwerte.

Der U-Test nach Mann und Whitney wird angewandt bei quantitativen Merkmalen und ist damit zur Analyse der szintigraphischen Messergebnisse geeignet. Er gilt für unverbundene Stichproben bei unbekannter Verteilung, setzt also keine Normalverteilung voraus. In der vorliegenden Arbeit dient er dazu, signifikante Unterschiede in der Abnahme der Nierenfunktion zum Endpunkt der Untersuchungen zwischen den verschiedenen Gruppen zu detektieren.

Eine Abwandlung des U-Tests nach Mann und Whitney stellt der sogenannte H-Test nach Kruskal und Wallis dar. Dieser Test wird für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben verwendet, so beispielsweise beim Vergleich der Mittelwerte der initialen Messungen.

Der Wilcoxon-Test zum nichtparametrischen Vergleich zweier abhängiger Stichproben wird verwandt, um signifikante Unterschiede in den zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Mittelwerten der Nierenfunktion einer Gruppe erkennen zu können. Dies geschieht in dieser Arbeit, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anhand der Mittelwerte der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 0, 20 und 26 Wochen nach Bestrahlung zu zeigen.

Unterschiede bei den Ergebnissen gelten als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  unterhalb der 5 %-Grenze liegt ( $p \leq 0,05$ ). Ein solches Ergebnis wird mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. Ein Ergebnis, bei dem die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  unter 1 % ( $p \leq 0,01$ ) beträgt, heißt sehr signifikant. Es wird mit zwei

Sternchen (\*\*) kenntlich gemacht. Drei Sternchen (\*\*\*) bezeichnen ein höchst signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert unter 1 ‰ ( $p \leq 0,001$ ). Ein nicht signifikantes Ergebnis wird mit der Abkürzung „ns“ versehen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit über 5 % muss davon ausgegangen werden, dass der Unterschied zufällig zustande gekommen ist.

## **3. Ergebnisse**

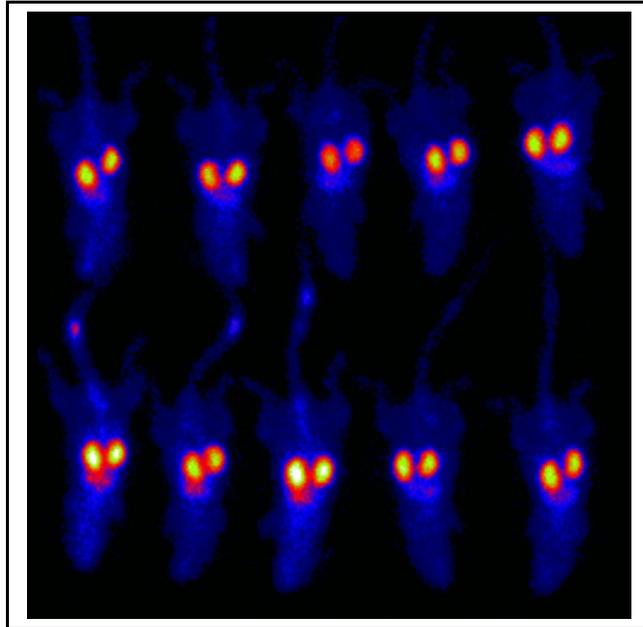
### ***3.1. Ausgangssituation – Messergebnisse der initialen Nierenfunktion***

Die Funktion der rechten Niere wurde bei allen Tieren ( $n = 72$ ) noch vor Beginn der Bestrahlung und vor Beginn der Medikamenteninjektionen unter gleichen Bedingungen ermittelt. Die Messwerte dienten als Ausgangsbefund, mit dem alle weiteren Ergebnisse verglichen werden konnten. Im Folgenden werden die Ergebnisse der ersten szintigraphischen Nierenfunktionsbestimmung durch deskriptive Statistik dargestellt. Die Vergleichbarkeit der Gruppen und die Reproduzierbarkeit der Versuche wird mit Hilfe der schließenden Statistik gezeigt.

#### **3.1.1. Deskriptive Statistik zur initialen Nierenfunktion**

Die deskriptive Statistik dient der Beschreibung der im Experiment gewonnenen Daten. Zu diesem Zweck werden die Daten sowohl grafisch, als auch unter Zuhilfenahme von statistischen Kennzahlen wie Mittelwert, Median, Minimum und Maximum aufbereitet. Berücksichtigt wird dabei auch der Streubereich der Messergebnisse.

In der vorliegenden Untersuchung erwartete man einen Anteil der Funktion der rechten Niere an der Gesamtfunktion beider Nieren von 50 %. Stellvertretend für alle Gruppen zeigt Abbildung 14 das vor Medikamentengabe und Bestrahlung angefertigte Szintigramm von zehn Mäusen der Gruppe TNF- $\alpha$ -Ak. Die rechte Niere hat bei fast allen Tieren sichtlich etwas mehr Aktivität aufgenommen als die linke Niere. Das gleiche Bild ergab sich auch in den anderen Gruppen.

**Abbildung 14**

*Planares Szintigramm nach statischer Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA. Dargestellt ist das initiale Szintigramm vor Bestrahlung und Medikamentengabe von zehn Mäusen der Gruppe TNF- $\alpha$ -Ak. Deutliche Aktivität zeigt sich in den Nieren, rechts meist stärker als links, etwas schwächere Aktivität in der Leber. Teilweise sind die Injektionsstellen am Schwanz der Tiere nach geringem paravasalem Austritt des  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA zu erkennen.*

Tabelle 5 listet die Mittelwerte der Messergebnisse der initialen Szintigraphien getrennt nach Substanzgruppen und in der Gesamtschau aller Tiere auf. Angegeben sind weiterhin jeweils Standardabweichung (SD), Median, Minima und Maxima der gemessenen Daten. Mit n wird die Anzahl der Mäuse in der jeweiligen Gruppe bezeichnet.

**Tabelle 5**

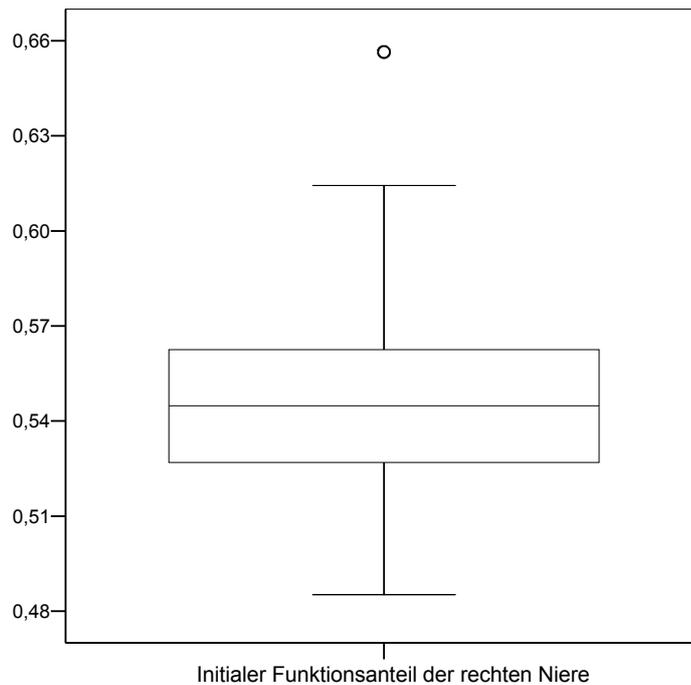
*Mittelwerte mit Standardabweichung, Medianen, Minima und Maxima der initialen Messwerte zur Funktion der rechten Niere.*

	n	Mittelwert	SD	Median	Minimum	Maximum
<b>Kontrolle</b>	20	0,5473	2 %	0,5518	0,50	0,58
<b>Epo 500</b>	20	0,5424	4 %	0,5362	0,49	0,66
<b>Epo 2000</b>	19	0,5495	3 %	0,5470	0,51	0,61
<b>TNF-<math>\alpha</math>-Ak</b>	15	0,5426	3 %	0,5410	0,49	0,58
<b>Gesamt</b>	74	0,5456	3 %	0,5448	0,49	0,66

Der tatsächliche Anteil der rechten Niere an der Gesamtfunktion beider Nieren lag also mit durchschnittlich 54 % über den theoretisch zu erwartenden 50 %. Der insgesamt kleinste Wert wurde mit 49 %, der größte Wert mit 66 % ermittelt. Median und arithmetisches Mittel liegen sowohl in den einzelnen Versuchsgruppen, als auch bei Betrachtung aller Tiere sehr nah beieinander. Dies weist auf eine symmetrische Verteilung der Werte, wie sie bei einer Normalverteilung vorkommt, hin.

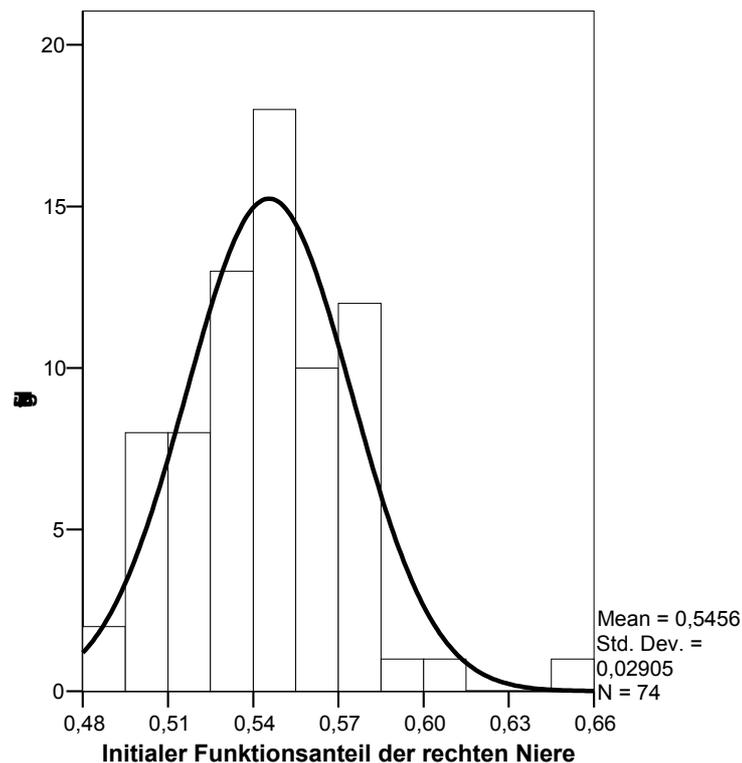
### **3.1.1.1. Überprüfung auf Normalverteilung: alle Tiere (n = 72)**

Im Box- und Whisker-Diagramm wird die nahezu symmetrische Verteilung der Werte grafisch veranschaulicht. Dargestellt sind neben dem Median auch erstes und drittes Quartil. Die Whisker werden begrenzt von Werten, die bis zum eineinhalbfachen Interquartilsabstand von erstem bzw. drittem Quartil entfernt liegen. Mit einem Kreis gekennzeichnet sind darüber hinaus Extremwerte, die mehr als eineinhalb, aber weniger als drei Kastenlängen außerhalb der Box zu liegen kommen, so geschehen bei einem Messwert von 66 %, der einer Maus aus der Gruppe Epo 500 zugeordnet werden kann.

**Abbildung 15**

*Box- und Whisker-Diagramm zur Werteverteilung aller Tiere ( $n = 72$ ) bei der initialen Messung der Funktion der rechten Niere.*

Die nahezu symmetrische Verteilung der Messergebnisse, die im obigen Box- und Whisker-Diagramm (Abbildung 15) zum Ausdruck kommt, würde zu einer Normalverteilung der Werte passen. Weitere Überprüfung ist jedoch angezeigt. Hierzu dient einerseits die Darstellung der Werteverteilung im Histogramm, andererseits der Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe.



**Abbildung 16**

*Histogramm mit eingezeichneter Normalverteilungskurve zur Darstellung der Werteverteilung aller Tiere ( $n = 72$ ) bei der initialen Messung der Funktion der rechten Niere.*

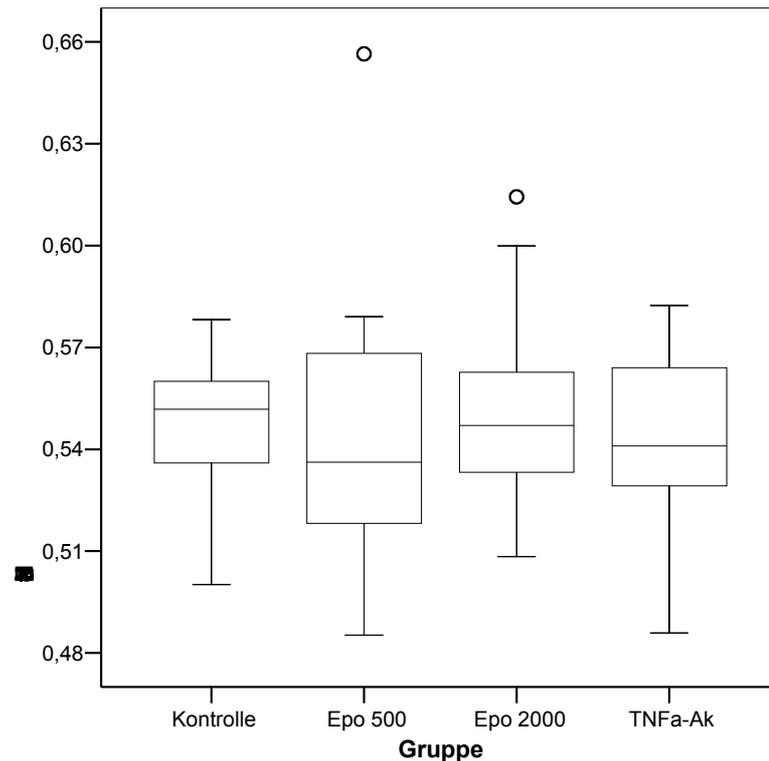
Bei Betrachtung des Histogramms mit eingezeichneter Normalverteilungskurve entsteht der Eindruck einer möglicherweise hinreichenden Normalverteilung.

Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest für eine Stichprobe erlaubt es, eine gegebene Verteilung auf Normalverteilung zu überprüfen. Nach Lilliefors-Korrektur ergibt sich eine Signifikanz von 0,20.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,10$ , wie sie für die Lilliefors-Korrektur des Kolmogorov-Smirnov-Tests üblich ist, besteht eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p = 0,20$  sind die Werte der initialen Nierenfunktion demnach hinreichend normalverteilt.

### **3.1.1.2. Überprüfung auf Normalverteilung: Einzelgruppen**

Folgende Boxplots (Abbildung 17) zeigen den Funktionsanteil der rechten Niere an der Gesamtfunktion beider Nieren, der bei der ersten Szintigraphie ermittelt wurde aufgetrennt nach den einzelnen Versuchsgruppen.



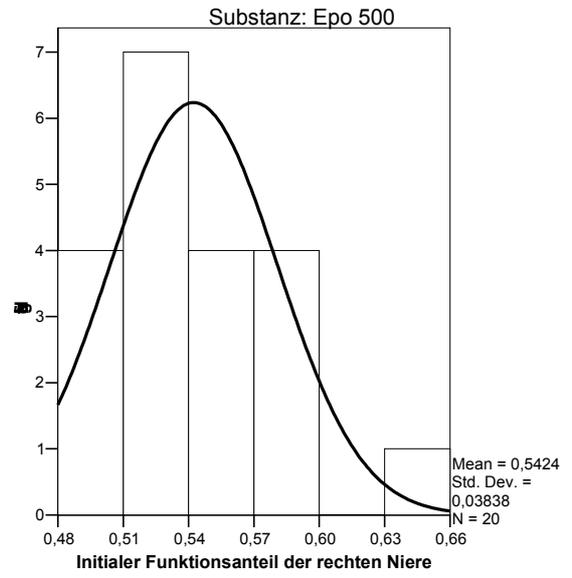
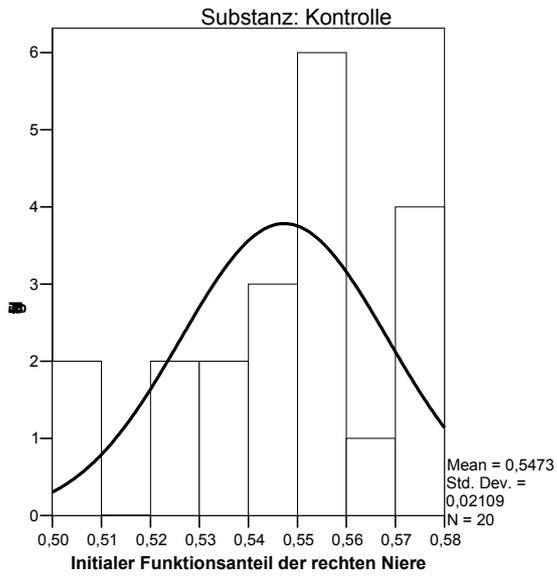
**Abbildung 17**

*Box- und Whisker-Diagramme zur Werteverteilung bei der initialen Messung der Funktion der rechten Niere getrennt nach Versuchsgruppen.*

In allen Gruppen lagen die anfänglichen Nierenfunktionswerte deutlich oberhalb der 50 %-Marke. Mit Werten von 66 % (aus Epo 500) und 61 % (aus Epo 2000) liegen die Daten zweier Tiere als Extremwerte mehr als eineinhalb Kastenlängen oberhalb des dritten Quartils. Die Werteverteilung innerhalb der Gruppen ist asymmetrisch. Dies lässt jedoch nicht den Schluss zu, dass hier keine Normalverteilung vorliegen könnte. Je größer die gewählte Stichprobe ist, desto eher wird sich eine symmetrische Werteverteilung ergeben. Dies gilt auch für die Histogramme in Abbildung 18.

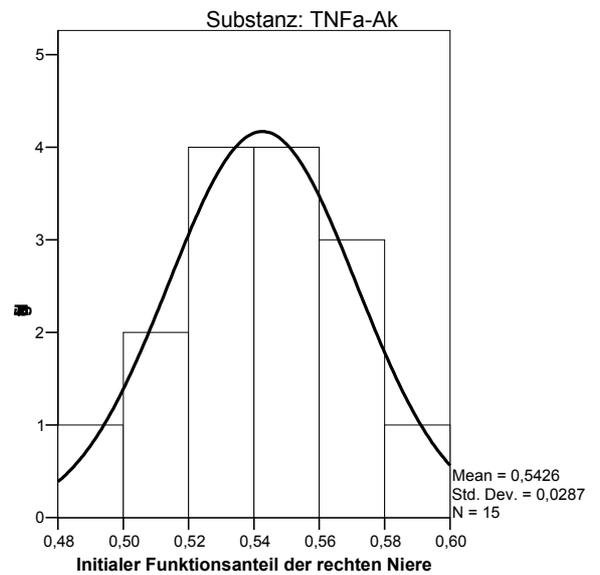
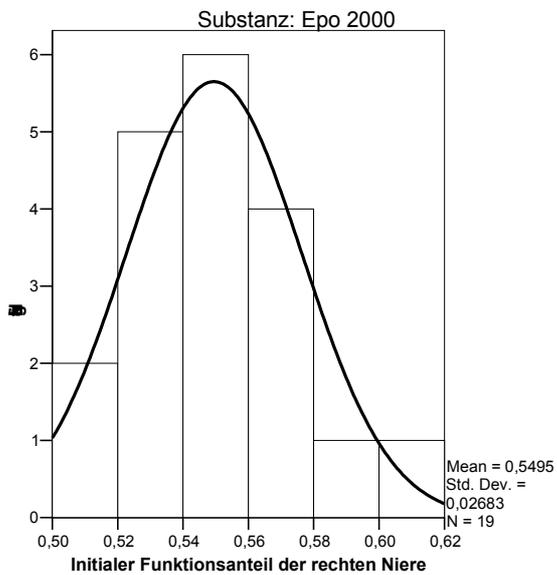
a)

b)



c)

d)



**Abbildung 18**

*Histogramme mit eingezeichneter Normalverteilungskurve zur Darstellung der Werteverteilung bei der initialen Messung der Funktion der rechten Niere, getrennt nach Versuchsgruppen.*

- a) Kontrolle
- b) Epo 500
- c) Epo 2000
- d) TNF- $\alpha$ -Ak

Die Histogramme zur Häufigkeitsverteilung der Messergebnisse in den einzelnen Gruppen lassen die Vermutung zu, dass die Werte einer Normalverteilung entstammen könnten. Dass die Verteilung der Werte schief erscheint, hängt mit den geringen Fallzahlen in den einzelnen Gruppen zusammen.

Bei derart geringen Fallzahlen empfiehlt sich als Test auf Normalverteilung weniger der Kolmogorov-Smirnov-Test, als vielmehr der Test nach Shapiro-Wilk. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6**

*Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk.*

<b>Gruppe</b>	<b>n</b>	<b>Signifikanz nach Shapiro-Wilk</b>
<b>Kontrolle</b>	20	0,261
<b>Epo 500</b>	20	0,069
<b>Epo 2000</b>	19	0,269
<b>TNF-<math>\alpha</math>-Ak</b>	15	0,658

Die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen der Normalverteilung und der Verteilung der empirischen Werte gäbe, kann bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  nicht verworfen werden. Es ist also davon auszugehen, dass die Messergebnisse Stichproben einer Normalverteilung darstellen.

### **3.1.2. Schließende Statistik zur initialen Nierenfunktion**

#### **3.1.2.1. Vergleichbarkeit der Gruppen**

Bereits vor Bestimmung der initialen Nierenfunktion in der ersten Szintigraphie wurden die Tiere ihren jeweiligen Gruppen zugeteilt. Die Einteilung geschah damit rein zufällig und war nicht abhängig von den Ergebnissen der szintigraphischen Messungen.

Mit Hilfe des H-Tests nach Kruskal und Wallis für mehr als zwei unabhängige Stichproben lässt sich feststellen, ob sich die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen signifikant voneinander unterscheiden.

Der H-Test nach Kruskal und Wallis ergibt eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p = 0,701$ . Die Nullhypothese, dass alle Gruppen bezüglich ihres Mittelwerts bei der ersten Szintigraphie gleich sind, muss also beibehalten werden.

#### **3.1.2.2. Vermeidung von Messfehlern**

Ein zufälliger Fehler ergibt sich einerseits durch die natürliche Variabilität der Nierenfunktion der Mäuse, andererseits aber auch bei der Durchführung der Szintigraphie und bei der Auswertung der Bilddaten durch die manuelle Erstellung der Regions of Interest. Um diesen Fehler möglichst klein zu halten, wurden die Szintigraphien stets durch dieselbe Person durchgeführt, ebenso die Daten stets durch dieselbe Person ausgewertet.

Der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen bei verbundenen Stichproben ergibt, dass sich die Mittelwerte der mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlten Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 0, 20 und 26 Wochen nach Bestrahlung noch nicht signifikant unterscheiden (Tabelle 7).

#### ***Tabelle 7***

*Unterschiede bei den Mittelwerten der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 0, 20 und 26 Wochen nach Bestrahlung.*

<b>Wochen nach Bestrahlung</b>	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Irrtumswahrscheinlichkeit p nach Wilcoxon-Test</b>
<b>0</b>	54 $\pm$ 1 %	
<b>20</b>	53 $\pm$ 3 %	0,866
<b>26</b>	53 $\pm$ 4 %	0,499

Zum Zeitpunkt der ersten Szintigraphie wurde eine mittlere Funktion der rechten Niere  $\pm$  Standardabweichung von 54  $\pm$  1 % ermittelt. In der zweiten Szintigraphie 20 Wochen nach Bestrahlung ergaben sich 53  $\pm$  3 %. In der dritten Szintigraphie 26 Wochen nach Bestrahlung schließlich wurde ein Wert von 53  $\pm$  4 % gemessen.

Da sich also bei den Kontrollen, die mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt wurden, nach 20 und 26 Wochen höchstens selten relevante Nierenfunktionsstörungen entwickelt haben, können die entsprechenden Werte verwendet werden, um die Messgenauigkeit der Methode zu ermitteln und ihre Reproduzierbarkeit zu zeigen.

Sieben Tiere aus der Kontrollgruppe können in diese Überlegungen miteinbezogen werden. Betrachtet man die Werte jedes einzelnen Tieres, so beträgt die durchschnittliche maximale Abweichung vom Ursprungswert 4,4 %. Alle Werte, die über den Umfang der Messgenauigkeit hinausgehen, können deshalb prinzipiell in dieser Untersuchung als relevante Verschlechterung der Nierenfunktion angesehen werden. Da die Werte nach wiederholter Messung nur gering schwanken, ist auch die Reproduzierbarkeit der Messungen gegeben.

### 3.2. Todesfälle

Todesfälle durch gastrointestinale Komplikationen nach Bestrahlung im Bereich des Dünndarms konnten nicht vollkommen vermieden werden, traten bei den verwendeten Strahlendosen insgesamt aber nur in sehr geringem Maße auf. Bei den betroffenen Tieren fanden sich bei der Sektion Briden und stenosierte Dünndarmschlingen mit teils ausgeprägter poststenotischer Dilatation.

Gastrointestinale Komplikationen mit Todesfolge entwickelten sich ausschließlich bei Mäusen, die mit 10 Gy bestrahlt worden waren, frühestens innerhalb 20 Wochen und spätestens bis zur 38. Woche nach Bestrahlung. Insgesamt waren davon nur vier Tiere betroffen. Drei Mäuse starben bereits im Zeitraum zwischen 1. und 2. Szintigraphie (0 bis 20 Wochen nach Bestrahlung), ein Tier starb erst in der Zeit von der 4. bis zur 5. Szintigraphie (32. bis 38. Woche nach Bestrahlung). Unter den Mäusen, die TNF- $\alpha$ -Antikörper erhalten hatten, gab es keine Todesfälle. Dagegen starben zwei Mäuse, die mit Erythropoietin in der Dosierung 2000 U/kg KG behandelt worden waren. Tabelle 8 bietet nochmals eine Übersicht über die Daten zu Todesfällen durch gastrointestinale Komplikationen nach Bestrahlung.

#### **Tabelle 8**

*Todesfälle durch gastrointestinale Komplikationen.*

<b>Gruppe (n)</b>	<b>Anzahl der gestorbenen Tiere (Strahlendosis)</b>	<b>Zeitraum des Todes in Wochen nach Bestrahlung</b>
<b>Kontrolle (20)</b>	1 (10 Gy)	0 – 20
<b>Epo 500 (20)</b>	2 (beide 10 Gy)	0 – 20 und 32 – 38
<b>Epo 2000 (19)</b>	1 (10 Gy)	0 – 20
<b>TNF-<math>\alpha</math>-Ak (15)</b>	0	–

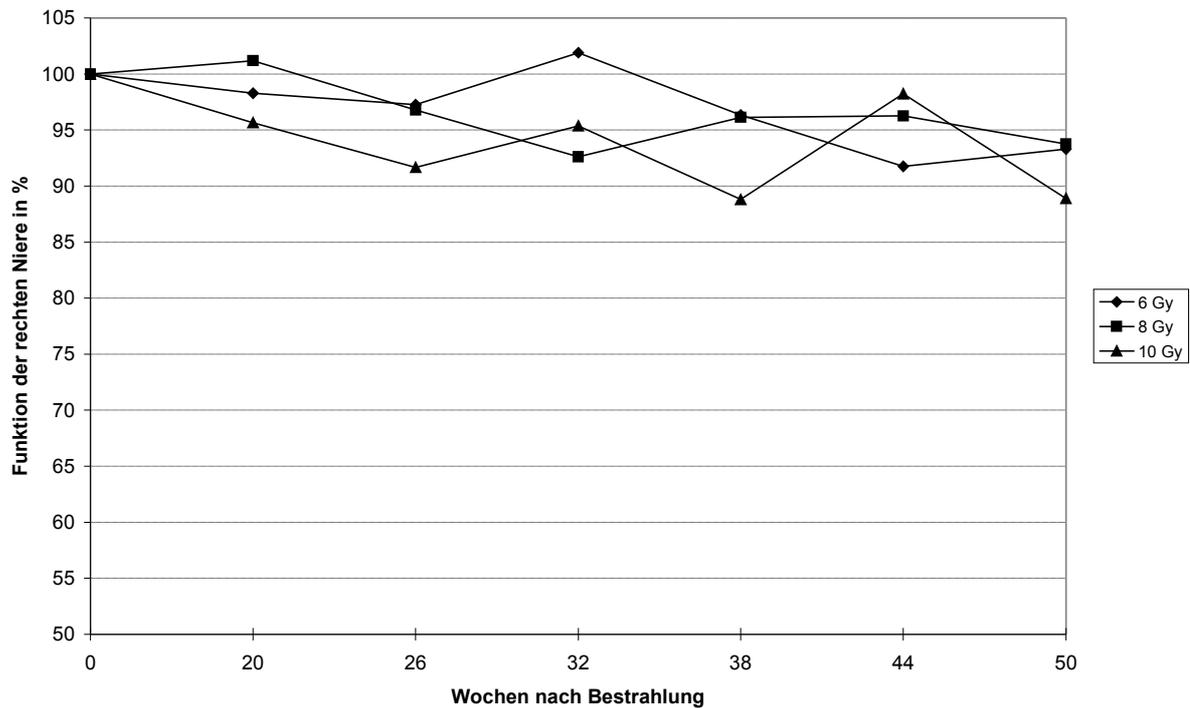
### **3.3. Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere**

Die regelmäßig durchgeführten Nierenszintigraphien ermöglichten es, gemäß den Messzeitpunkten Verlaufskurven zu erstellen. Die Mittelwerte der Funktion der rechten Niere zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in den folgenden Liniendiagrammen als Messpunkte dargestellt. Die Verbindungslinien der Messpunkte dienen lediglich der Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs, stellen jedoch keine realen Messwerte dar. Der Zeitpunkt 0 bezeichnet die 1. Szintigraphie vor Bestrahlung und vor Medikamenteninjektion. Erstuntersuchung und Bestrahlung fielen stets in die gleiche Woche. 20 Wochen nach Bestrahlung fand die 2. Szintigraphie statt. Im Abstand von jeweils 6 Wochen folgten dann die weiteren Nachuntersuchungen. Endpunkt des Experiments war mit Durchführung der letzten Kontrollszintigraphie zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung.

In Abbildung 19 werden die Verläufe der verschiedenen Strahlendosisgruppen 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy der Kontrollgruppe nebeneinander dargestellt. Die weiteren Diagramme zeigen die Verläufe aufgeteilt nach den unterschiedlichen Strahlendosisgruppen. Verglichen werden dabei jeweils die Kontrollgruppe mit den Gruppen „Epo 500“ und „Epo 2000“ bzw. die Kontrollgruppe mit der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“.

Im Diagramm wurden alle Mittelwerte der initialen Funktion der rechten Niere mit 100 % angesetzt. Die Datenpunkte bezeichnen also jeweils den Mittelwert der Funktion der rechten Niere zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung in Prozent bezogen auf die initiale Messung. Werte über 100 % bedeuten damit, dass zu dem jeweiligen Zeitpunkt eine bessere Nierenfunktion gemessen wurde als bei der ersten Szintigraphie. Werte unter 100 % zeigen hingegen eine schlechtere Nierenfunktion verglichen mit dem Anfangswert.

### 3.3.1. Kontrollgruppe – Vergleich nach applizierten Strahlendosen



**Abbildung 19**

*Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere in der Kontrollgruppe, unterteilt nach den applizierten Strahlendosen 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy.*

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden lediglich der Bestrahlung mit den Dosen 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy unterzogen. Unter der Voraussetzung, dass diese Strahlendosen eine Verschlechterung der Nierenfunktion induzieren können, müsste folglich eine höhere Strahlendosis eine größere Funktionsverschlechterung bewirken als eine niedrigere Dosis. Betrachtet man jedoch die Verläufe der Kontrollgruppe, aufgeteilt nach Strahlendosen, so ergibt sich ein anderes Bild. Die Verlaufskurven zeigen zahlreiche Überschneidungen. So entsteht insgesamt der Eindruck, dass es zwischen den Verläufen der drei Dosisgruppen keinen großen Unterschied gibt. Ein Trend hin zur Funktionsverschlechterung kann jedoch bei allen drei Strahlendosen angenommen werden.

Vergleicht man mit Hilfe des Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben in jeder Dosisgruppe den Ausgangswert der Nierenfunktion mit dem gemessenen Wert zum Endpunkt der Untersuchung 50 Wochen nach Bestrahlung, so ergibt sich für die Dosis 6 Gy ein p-Wert von 0,028, für die Dosis 8 Gy ein p-Wert von 0,123 und für die Dosis 10 Gy ein p-Wert von 0,109 bei zweiseitiger Signifikanz. Bei einer Irrtumswahr-

scheinlichkeit von  $\alpha = 0,10$  ist davon auszugehen, dass bei allen Dosisgruppen zwar eine gewisse Verschlechterung der Nierenfunktion stattgefunden hat, dieser Unterschied jedoch nur bei den mit 6 Gy bestrahlten Mäusen signifikant ist.

**Tabelle 9**

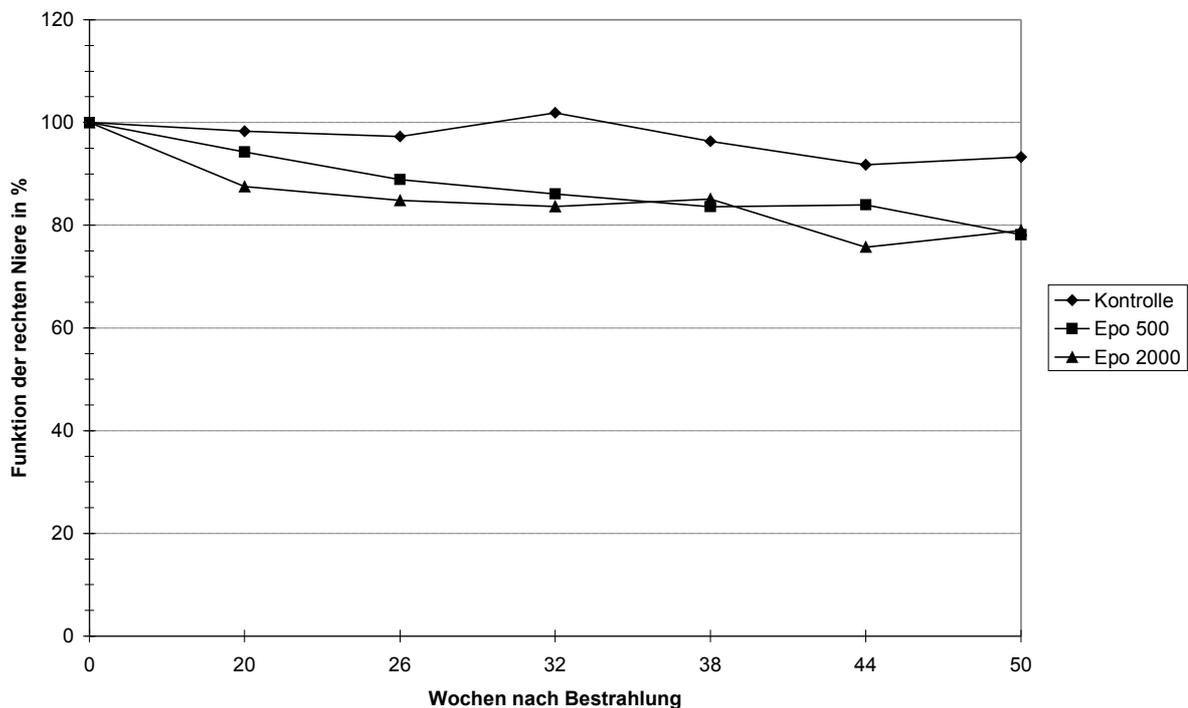
*Unterschiede im Mittelwert der Funktion der rechten Niere zwischen erster und letzter Szintigraphie in der Kontrollgruppe getrennt nach applizierter Strahlendosis.*

<b>Dosis (n)</b>	<b>Wochen nach Bestrahlung</b>	<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>p-Wert (Wilcoxon-Test)</b>
<b>6 Gy (7)</b>	0	0,54 $\pm$ 0,01	
	50	0,51 $\pm$ 0,05	0,028 *
<b>8 Gy (8)</b>	0	0,54 $\pm$ 0,03	
	50	0,51 $\pm$ 0,04	0,123 ns
<b>10 Gy (3)</b>	0	0,56 $\pm$ 0,01	
	50	0,49 $\pm$ 0,04	0,109 ns

### 3.3.2. Kontrollgruppe und die Gruppen „Epo 500“ und „Epo 2000“ im Vergleich

Im Folgenden werden für jede Strahlendosis die zeitlichen Verläufe der Nierenfunktionswerte der Kontrollgruppe neben denen der Gruppen „Epo 500“ und „Epo 2000“ grafisch dargestellt.

#### 3.3.2.1. Applizierte Strahlendosis 6 Gy



#### Abbildung 20

*Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere bei Kontrolle, Epo 500 und Epo 2000 bei einer applizierten Strahlendosis von 6 Gy.*

Im Diagramm ist zu erkennen, dass bei allen drei Gruppen eine gewisse Verschlechterung der Nierenfunktion stattgefunden hat. Bei Tieren, die mit Erythropoietin behandelt worden waren, fällt dieser Trend deutlicher aus, als bei der Kontrollgruppe. Die höhere Erythropoietin-Dosis von 2000 U/kg KG bewirkt anscheinend auch eine etwas stärkere Verschlechterung der Nierenfunktion als die geringere Dosis von nur 500 U/kg KG.

Um ein Maß für den tatsächlichen Unterschied zwischen den drei Gruppen zu erhalten, wurde für jedes Tier die Differenz zwischen dem Ergebnis der ersten Szintigraphie und dem Ergebnis der sechsten Szintigraphie ermittelt. Aus den einzelnen Differenzen wurde für jede Gruppe der mittlere Funktionsverlust zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung errechnet. Der U-Test nach Mann und Whitney gibt Aufschluss darüber, ob ein signifikanter Unterschied im mittleren Funktionsverlust zwischen der Kontrollgruppe und jeweils einer der beiden anderen Gruppen besteht. Tabelle 10 zeigt für jede Gruppe den Wert der initialen Nierenfunktion, den absoluten mittleren Nierenfunktionsverlust mit Standardabweichung und den p-Wert gemäß U-Test nach Mann und Whitney. Der relative mittlere Funktionsverlust ist neben dem absoluten in Klammern angegeben.

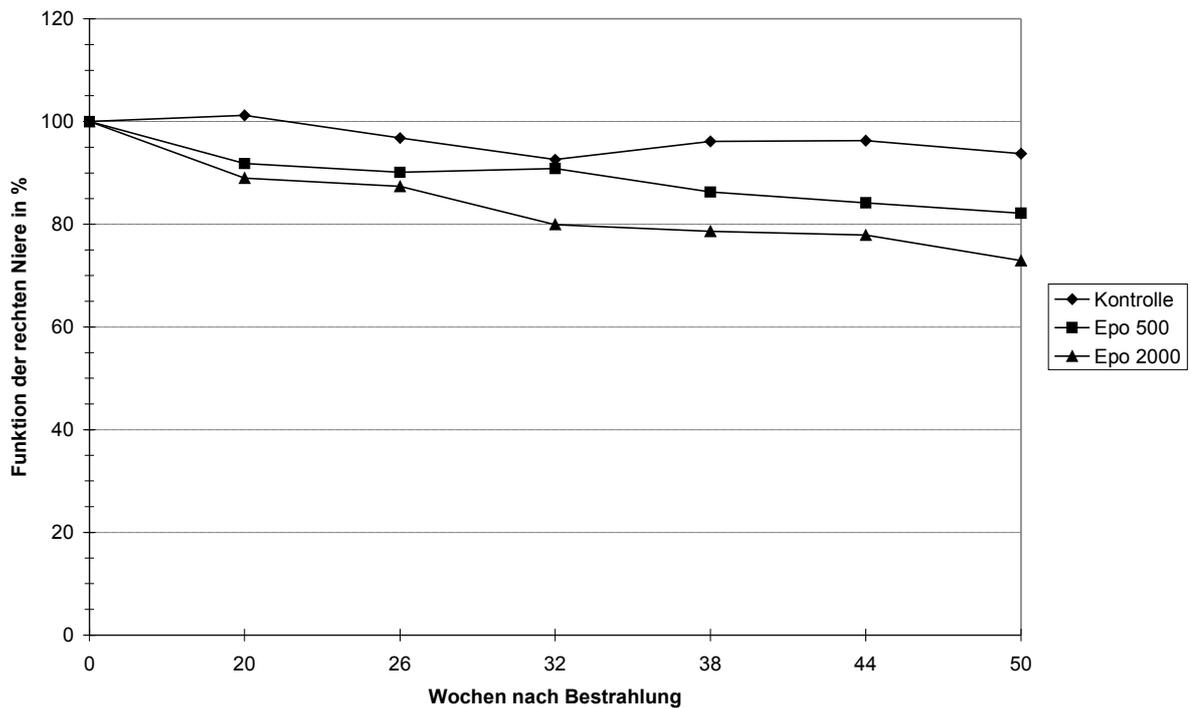
**Tabelle 10**

*Unterschied im absoluten mittleren Funktionsverlust der rechten Niere zwischen Kontrollgruppe und Epo 500 bzw. Kontrollgruppe und Epo 2000 bei einer applizierten Strahlendosis von 6 Gy.*

<b>Gruppe (n = Anzahl der Tiere)</b>	<b>Initiale Nierenfunktion</b>	<b>Mittlerer Funkti- onsverlust absolut ± SD (relativ)</b>	<b>p-Wert (Mann-Whitney- Test)</b>
<b>Kontrolle (7)</b>	0,54 ± 0,01	0,04 ± 0,05 (7 %)	
<b>Epo 500 (6)</b>	0,55 ± 0,03	0,10 ± 0,07 (18 %)	0,018 *
<b>Epo 2000 (5)</b>	0,57 ± 0,04	0,12 ± 0,04 (21 %)	0,018 *

Der relative Verlust an Nierenfunktion liegt in der Kontrollgruppe bei 7 %, in der Gruppe „Epo 500“ bei 18 % und in der Gruppe „Epo 2000“ bereits bei 21 % der ursprünglichen Nierenfunktion. Bei einer Strahlendosis von 6 Gy ergab sich 50 Wochen nach Bestrahlung für die Gruppe „Epo 500“ gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,018$ ) im mittleren Funktionsverlust. Genauso sieht es für die Gruppe „Epo 2000“ aus. Bei einem p-Wert von ebenfalls 0,018 ist auch der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe „Epo 2000“ signifikant.

### 3.3.2.2. Applizierte Strahlendosis 8 Gy



**Abbildung 21**

*Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere bei Kontrolle, Epo 500 und Epo 2000 bei einer applizierten Strahlendosis von 8 Gy.*

Das Diagramm zeigt ein ganz ähnliches Bild wie das der Verläufe bei einer Strahlendosis von 6 Gy. Wieder ist eine Tendenz zur Verschlechterung der Nierenfunktion bei allen drei Gruppen zu erkennen. Wiederum hat sich die Nierenfunktion bei der mit der höheren Erythropoietin-Dosis behandelten Gruppe deutlicher verschlechtert als bei der Gruppe, die die geringere Dosis erhalten hatte. In Zahlen werden die Daten in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11**

*Unterschied im absoluten mittleren Funktionsverlust der rechten Niere zwischen Kontrollgruppe und Epo 500 bzw. Kontrollgruppe und Epo 2000 bei einer applizierten Strahlendosis von 8 Gy.*

Gruppe (n)	Initiale Nierenfunktion	Mittlerer Funktionsverlust absolut $\pm$ SD (relativ)	p-Wert (Mann-Whitney-Test)
<b>Kontrolle (8)</b>	0,54 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,06 (7 %)	
<b>Epo 500 (6)</b>	0,53 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,07 (19 %)	0,108 ns
<b>Epo 2000 (6)</b>	0,53 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,07 (26 %)	0,005 **

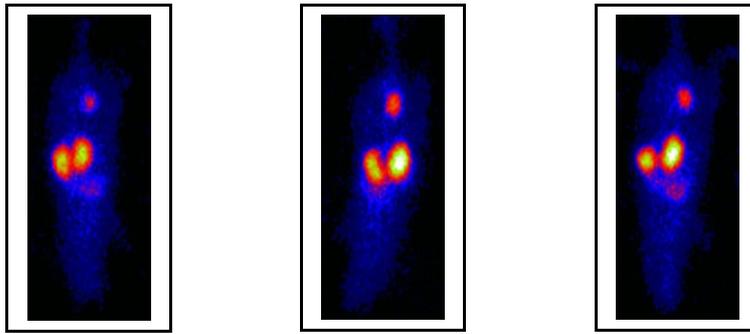
Vergleicht man die Kontrollgruppe mit der Gruppe „Epo 500“ auf einen signifikanten Unterschied im mittleren Funktionsverlust nach 50 Wochen hin, so ergibt sich bei einem p-Wert von 0,108 nach Mann und Whitney keine Signifikanz. Dagegen muss die Nullhypothese bei einem Vergleich der Kontrollgruppe und der Gruppe „Epo 2000“ verworfen werden ( $p = 0,005$ ). Die relativen Verluste an Nierenfunktion liegen diesmal bei 7 % für die Kontrollgruppe, 19 % für die Gruppe „Epo 500“ und 26 % für die Gruppe „Epo 2000“.

Abbildung 22 zeigt charakteristische Szintigramme von mit 8 Gy bestrahlten Mäusen der Gruppen Kontrolle (a), Epo 500 (b) und Epo 2000 (c) zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung. Bei dem Tier der Kontrollgruppe (a) zeigt sich eine nur geringe Abschwächung der Aktivitätsaufnahme in der rechten Niere gegenüber der linken Niere. Stärker ist diese Aktivitätsabschwächung bei den mit Erythropoietin behandelten Tieren zu sehen. Dabei wiederum ist bei der mit 2000 U/kg behandelten Maus (c) deutlich weniger funktionierendes Nierenparenchym vorhanden als bei dem mit 500 U/kg behandelten Tier (b). Insgesamt gesehen nehmen die rechten Nieren nun eindeutig weniger  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA auf als die linken Nieren. Dies war bei der initialen Szintigraphie gerade andersherum, wie auf Abbildung 1 zu sehen ist.

a)

b)

c)

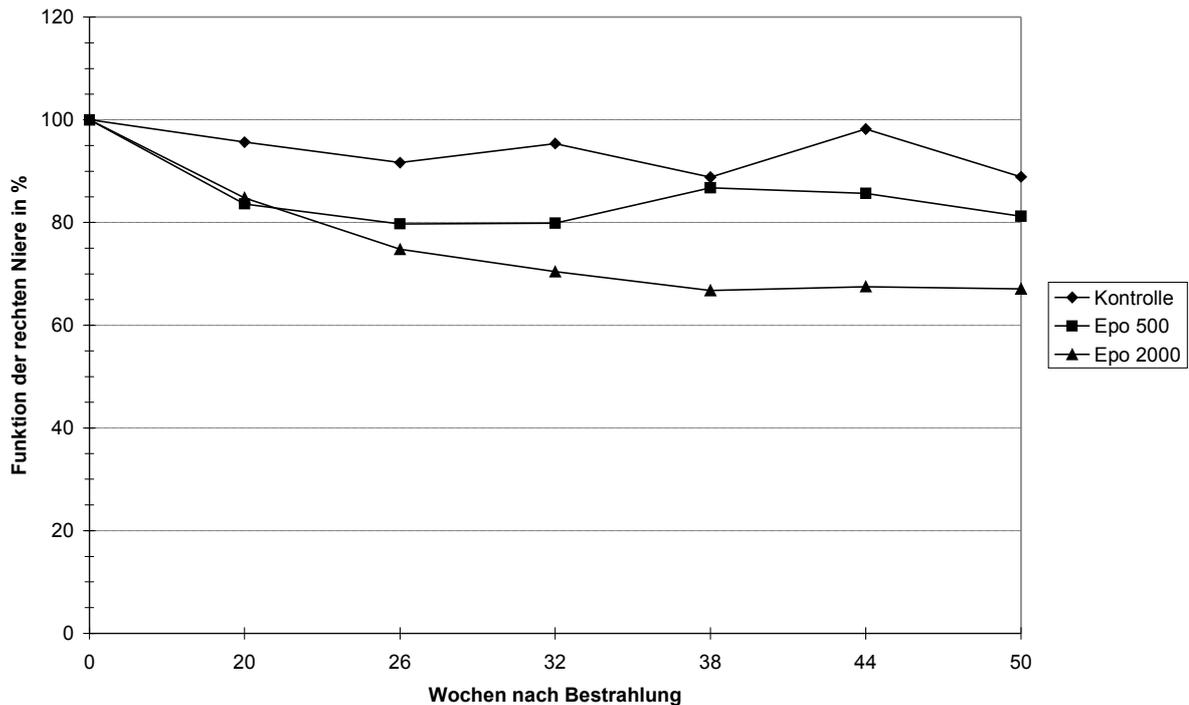


**Abbildung 22**

Planare Szintigramme nach statischer Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA. Dargestellt sind charakteristische Szintigramme von mit 8 Gy bestrahlten Mäusen aus den Gruppen Kontrolle, Epo 500 und Epo 2000. Die Aufnahmen entstanden zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung.

- a) Kontrolle: Geringe Aktivitätsabschwächung der rechten gegenüber der linken Niere.
- b) Epo 500: Im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas stärkere Aktivitätsabschwächung in der rechten Niere.
- c) Epo 2000: Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe Epo 500 starker Verlust an funktionierendem Nierenparenchym.

### 3.3.2.3. Applizierte Strahlendosis 10 Gy



**Abbildung 23**

*Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere bei Kontrolle, Epo 500 und Epo 2000 bei einer applizierten Strahlendosis von 10 Gy.*

Auch im Verlaufsdigramm der mit 10 Gy bestrahlten Tiere findet sich das bereits bekannte Muster, dass die mit Erythropoietin behandelten Gruppen eine deutlichere Verschlechterung der Nierenfunktion aufweisen als die Kontrollgruppe. Besonders auffällig weicht hier die Gruppe „Epo 2000“ von der Kontrollgruppe ab. Die statistische Analyse der Unterschiede in der mittleren Nierenfunktion der drei Gruppen findet sich in Tabelle 12.

**Tabelle 12**

*Unterschied im absoluten mittleren Funktionsverlust der rechten Niere zwischen Kontrollgruppe und Epo 500 bzw. Kontrollgruppe und Epo 2000 bei einer applizierten Strahlendosis von 10 Gy.*

Gruppe (n)	Initiale Nierenfunktion	Mittlerer Funktionsverlust absolut ± SD (relativ)	p-Wert (Mann-Whitney- Test)
<b>Kontrolle (5)</b>	0,56 ± 0,01	0,06 ± 0,03 (11 %)	
<b>Epo 500 (7)</b>	0,55 ± 0,06	0,10 ± 0,09 (18 %)	0,700 ns
<b>Epo 2000 (7)</b>	0,54 ± 0,02	0,18 ± 0,15 (33 %)	0,393 ns

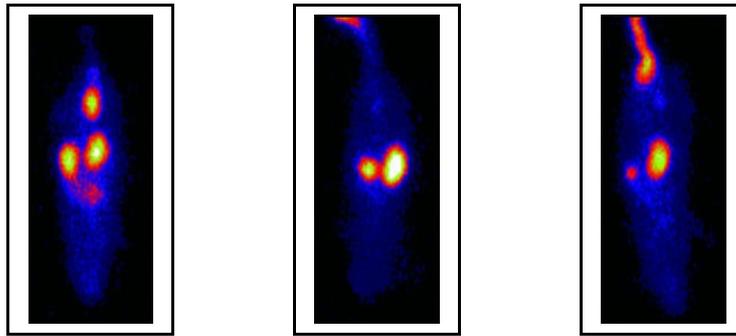
Kein signifikanter Unterschied fand sich zwischen der mit 10 Gy bestrahlten Kontrollgruppe und der zusätzlich mit Erythropoietin behandelten Gruppe „Epo 500“ ( $p = 1,000$ ). Im Falle der ebenfalls mit Erythropoietin behandelten Gruppe „Epo 2000“ kann die Nullhypothese gegenüber der Kontrolle ebenfalls nicht verworfen werden ( $p = 0,393$ ). Ein relativer Verlust an Nierenfunktion von 11 % betraf die Kontrollgruppe gegenüber einem Verlust von 18 % bei der Gruppe „Epo 500“ und 33 % bei der Gruppe „Epo 2000“.

Abbildung 24 zeigt charakteristische Szintigramme von mit 10 Gy bestrahlten Mäusen der Gruppen Kontrolle (a), Epo 500 (b) und Epo 2000 (c) zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung. In der Kontrollgruppe (a) zeigt sich allenfalls eine geringe Abnahme der Aktivitätsaufnahme in der rechten Niere. Deutlicher wird dies in den Gruppen Epo 500 (b) und Epo 2000 (c), wobei das mit 2000 U/kg behandelte Tier auf der rechten Seite nur noch sehr wenig funktionierendes Nierenparenchym besitzt.

a)

b)

c)



**Abbildung 24**

Planare Szintigramme nach statischer Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA. Dargestellt sind charakteristische Szintigramme von mit 10 Gy bestrahlten Mäusen aus den Gruppen Kontrolle, Epo 500 und Epo 2000. Die Aufnahmen entstanden zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung.

- a) Kontrolle: Geringe Aktivitätsabschwächung der rechten gegenüber der linken Niere.
- b) Epo 500: Im Vergleich zur Kontrollgruppe starke Aktivitätsabschwächung in der rechten Niere.
- c) Epo 2000: An der rechten Niere ist nur noch wenig funktionierendes Parenchym vorhanden.

#### **3.3.2.4. Ergebnisse der Blutentnahme bei Kontrollen, Epo 500 und Epo 2000**

Nach der letzten Szintigraphie zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung wurde den Tieren der Kontrollgruppe und den mit Erythropoietin behandelten Mäusen Blut abgenommen. Aus labortechnischen Gründen, die mit der geringen Blutentnahmemenge zusammenhingen, konnte nicht wie ursprünglich vorgesehen bei jedem Tier der Kreatinin-Wert bestimmt werden. Dies war leider nur bei den Mäusen der Gruppe „Epo 2000“ möglich. Im Folgenden werden deshalb zur Beurteilung der Nierenfunktion der Harnstoff-Wert und zur Beurteilung einer eventuell länger andauernden Erythropoietin-Wirkung der Hämatokrit-Wert dargestellt.

#### **Tabelle 13**

Ergebnisse der Blutanalyse in der Kontrollgruppe.

	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
<b>6 Gy</b>			
Harnstoff mg/dl	6	28,3	6,8
Hkt %	5	43,2	1,6
<b>8 Gy</b>			
Harnstoff mg/dl	7	32,9	15,8
Hkt %	7	40,1	6,8
<b>10 Gy</b>			
Harnstoff mg/dl	2	22,5	3,5
Hkt %	2	44,0	0

**Tabelle 14**

*Ergebnisse der Blutanalyse in der Gruppe Epo 500.*

	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
<b>6 Gy</b>			
Harnstoff mg/dl	5	48,0	17,9
Hkt %	5	42,0	1,0
<b>8 Gy</b>			
Harnstoff mg/dl	6	24,2	3,8
Hkt %	5	43,2	2,2
<b>10 Gy</b>			
Harnstoff mg/dl	2	80,0	56,6
Hkt %	2	40,0	1,4

**Tabelle 15**

*Ergebnisse der Blutanalyse in der Gruppe Epo 2000.*

	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
<b>6 Gy</b>			
Kreatinin mg/dl	5	0,5	0,1
Harnstoff mg/dl	5	31,0	4,2
Hkt %	4	41,5	2,4
<b>8 Gy</b>			
Kreatinin mg/dl	5	0,3	0,1
Harnstoff mg/dl	5	32,4	4,5
Hkt %	4	42,3	1,0
<b>10 Gy</b>			
Kreatinin mg/dl	5	0,4	0
Harnstoff mg/dl	5	28,4	2,7
Hkt %	4	38,8	5,0

Unabhängig von Strahlendosis oder verabreichter Substanz ergaben die Blutanalysen keine auffälligen Abweichungen der Werte vom Normalbereich. Einzig der mittlere Harnstoff-Wert der mit 10 Gy bestrahlten Mäuse aus der Gruppe „Epo 500“ befindet sich mit 80 mg/dl unerwartet weit außerhalb des Referenzbereiches. Dieser Mittelwert ergab sich aus der Messung bei lediglich zwei Tieren. Das Minimum lag bei 40 mg/dl, das Maximum bei 120 mg/dl.

50 Wochen nach Bestrahlung und Behandlung mit bzw. ohne Erythropoietin zeigten sich keine auffälligen Harnstoff-Werte. Eine eventuell positive Korrelation zwischen Harnstoff-Werten und Grad der Verschlechterung der Funktion der rechten Niere bestand nicht. Ebenso wenig gaben die Hämatokrit-Werte zum Zeitpunkt der letzten Szintigraphie Anlass zu der Annahme, dass die Behandlung mit Erythropoietin eine länger anhaltende Wirkung auf die Erythropoese in Form einer Erhöhung des Hämatokrit zeitigen könnte.

### **3.3.2.5. Zusammenfassende Betrachtung: Kontrolle und Epo 500 bzw. Epo 2000**

Alle Diagramme und die zugehörigen Tabellen zeigen für die mit Erythropoietin behandelten Gruppen eine Verschlechterung der Funktion der rechten Niere gegenüber der Kontrollgruppe. Unter allen Strahlendosen, ausgenommen die Gruppe „Epo 500“, die mit 10 Gy bestrahlt worden war, waren die absoluten mittleren Funktionsverluste der mit Erythropoietin behandelten Gruppen mehr als doppelt so hoch wie die der Kontrollgruppe. Eine höhere Dosierung von Erythropoietin (2000 U/kg KG) erwies sich als nachteiliger im Hinblick auf die Nierenfunktionsabnahme als die niedrigere Dosis von lediglich 500 U/kg KG. Bei Verabreichung von 2000 U/kg KG Erythropoietin ist der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe „Epo 2000“ unter der Strahlendosis 6 Gy signifikant, unter einer Dosis von 8 Gy sogar sehr signifikant. Die Abnahme der Nierenfunktion erscheint in allen Gruppen als mit zunehmendem Abstand zum Bestrahlungszeitpunkt progredient und abhängig von der Strahlendosis. Unterschiede im Grad der Nierenfunktionsverschlechterung, die mit der Höhe der Strahlendosis zusammenhängen, zeigen sich diskret in der Kontrollgruppe, etwas deutlicher noch in der Gruppe „Epo 2000“. Erst eine Strahlendosis zwischen 8 und 10 Gy scheint jedoch eine relevante Verschlechterung der Nierenfunktion zu bewirken.

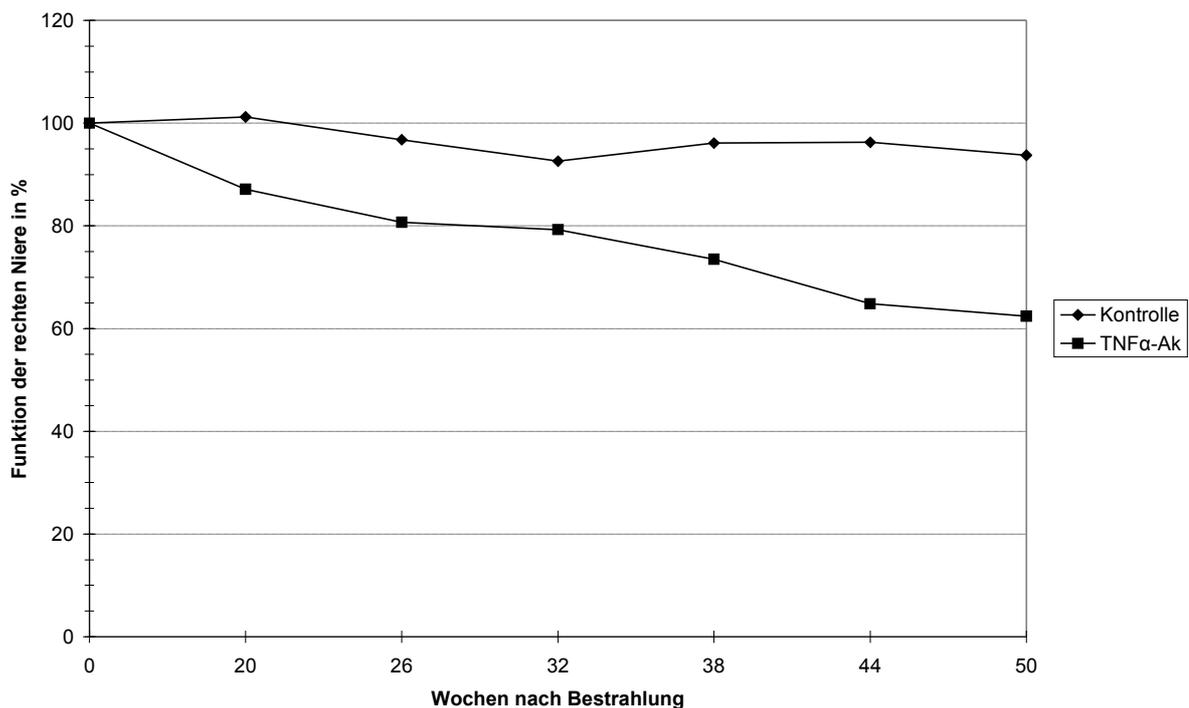
Blutuntersuchungen zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung ergaben weder Hinweise auf eine verschlechterte Nierenfunktion, noch auf einen länger anhaltenden Effekt des Erythropoietins auf die Höhe des Hämatokrits.

### 3.3.3. Kontrollgruppe und die Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“ im Vergleich

Analog zum Vergleich der mit Erythropoietin behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe wird im Folgenden der Verlauf der Nierenfunktion der mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab behandelten Gruppe dem Verlauf der unbehandelten Kontrollgruppe gegenübergestellt. Dabei wird zwischen zwei Strahlendosen unterschieden: 8 Gy und 10 Gy. Die Dosierung von Infliximab war in beiden Gruppen gleich und betrug jeweils 8 mg/kg KG.

Für jede Strahlendosis wird ein Diagramm gezeigt, das den Verlauf der mittleren Funktion der rechten Niere zu den verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Bestrahlung angibt. In einem Diagramm wird dabei die Kurve der Kontrollgruppe zum Vergleich neben der Kurve der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“ dargestellt.

#### 3.3.3.1. Applizierte Strahlendosis 8 Gy



#### Abbildung 25

*Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere bei Kontrolle und TNF- $\alpha$ -Ak bei einer applizierten Strahlendosis von 8 Gy.*

Während die Kontrollkurve über die Zeit von 50 Wochen nach Bestrahlung nur geringfügig von der 100 %-Marke abweicht (zwischen 5 und 10 %), verschlechtert sich

in der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“ die Funktion der rechten Niere im gleichen Zeitraum um 35 bis 40 %. Diese Tendenz ist bereits zum Zeitpunkt 20 Wochen nach Bestrahlung zu erkennen und bis zum Ende der Untersuchung progredient. Eine Erholung der Nierenfunktion setzt nicht ein.

### **Tabelle 16**

*Unterschied im absoluten mittleren Funktionsverlust der rechten Niere zwischen Kontrollgruppe und TNF- $\alpha$ -Ak bei einer applizierten Strahlendosis von 8 Gy.*

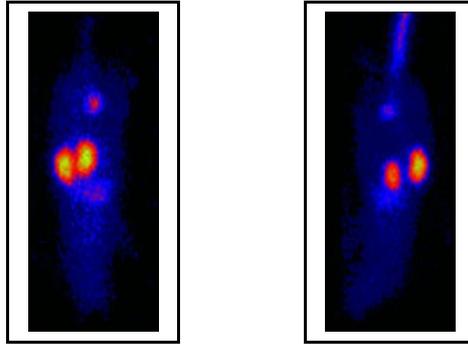
<b>Gruppe (n)</b>	<b>Initiale Nierenfunktion</b>	<b>Mittlerer Funktionsverlust absolut <math>\pm</math> SD (relativ)</b>	<b>p-Wert (Mann-Whitney- Test)</b>
<b>Kontrolle (8)</b>	0,54 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,06 (7 %)	
<b>TNF-<math>\alpha</math>-Ak (8)</b>	0,55 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,10 (38 %)	0,001 ***

Der relative Funktionsverlust der rechten Niere betrug in der mit 8 Gy bestrahlten Kontrollgruppe 7 %, in der zusätzlich mit Infliximab behandelten Gruppe bereits 38 %. Bei einem p-Wert von 0,001 ist der Unterschied in der Funktionsabnahme zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“ hoch signifikant.

Abbildung 26 zeigt charakteristische Szintigramme von mit 8 Gy bestrahlten Mäusen der Gruppen Kontrolle (a) und TNF- $\alpha$ -Ak (b). Die Aufnahmen wurden zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung angefertigt. Das funktionierende Nierenparenchym der mit Infliximab behandelten Maus (b) ist stark zurückgegangen. Vergleiche hierzu auch die Szintigramme der mit 8 Gy bestrahlten Mäuse der Gruppen Epo 500 und Epo 2000 in Abbildung 22. Dagegen stellt sich im Szintigramm der Maus aus der Kontrollgruppe (a) nur eine geringe Aktivitätsabschwächung des Parenchyms der rechten Niere dar.

a)

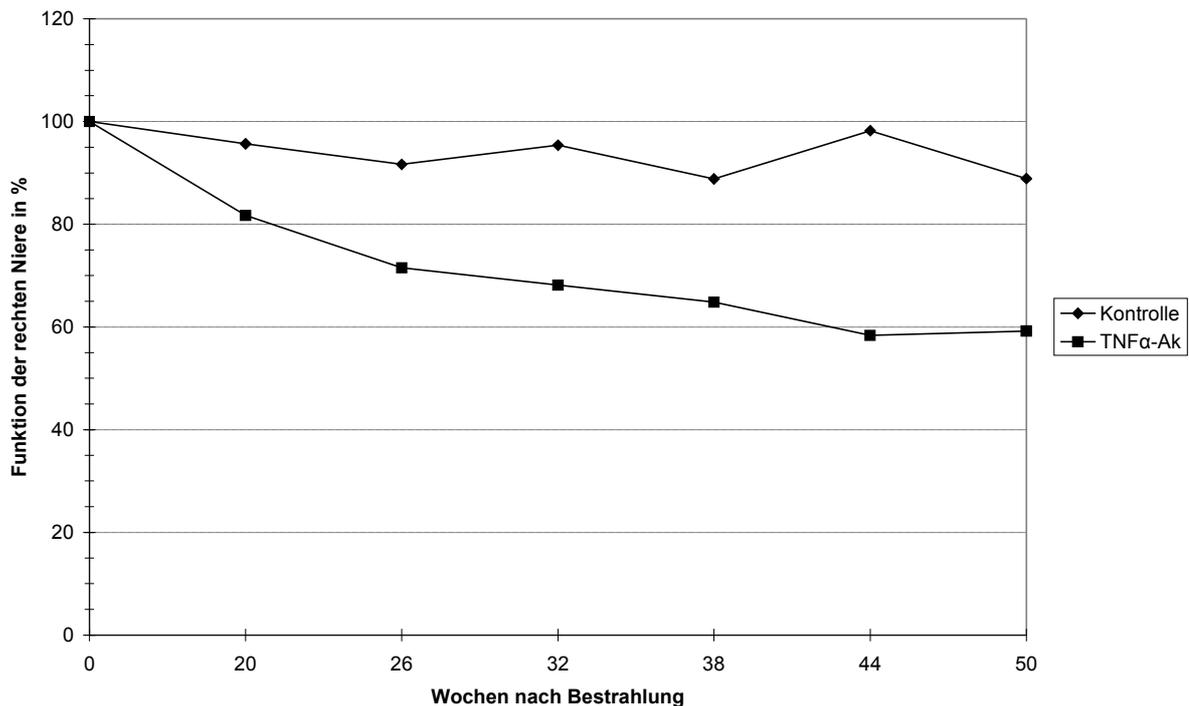
b)

**Abbildung 26**

Planare Szintigramme nach statischer Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA. Dargestellt sind charakteristische Szintigramme von mit 8 Gy bestrahlten Mäusen aus den Gruppen Kontrolle und TNF- $\alpha$ -Ak. Die Aufnahmen entstanden zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung.

- a) Kontrolle: Geringe Aktivitätsabschwächung der rechten gegenüber der linken Niere.
- b) TNF- $\alpha$ -Ak: Im Vergleich zur Kontrolle stärkere Aktivitätsabschwächung in der rechten Niere.

### 3.3.3.2. Applizierte Strahlendosis 10 Gy

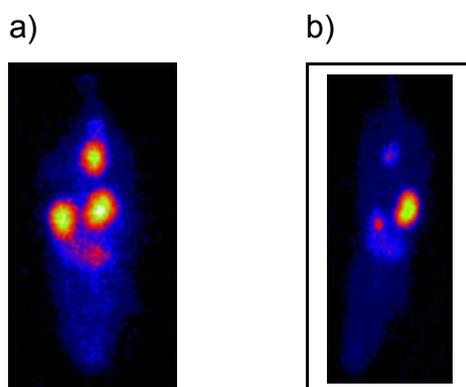


**Abbildung 27**

*Zeitlicher Verlauf der Funktion der rechten Niere bei Kontrolle und TNF- $\alpha$ -Ak bei einer applizierten Strahlendosis von 10 Gy.*

Bei den mit 10 Gy bestrahlten Tieren zeigt die Verlaufsgrafik, dass sich unter Behandlung mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper die Funktion der rechten Niere um etwas mehr als 40 % verschlechtert hat. In der Kontrollgruppe ergab sich ebenfalls eine Abnahme der Nierenfunktion, jedoch in erheblich geringerem Maße, nämlich um etwas mehr als 10 %.

Abbildung 28 zeigt charakteristische Szintigramme von mit 10 Gy bestrahlten Mäusen der Gruppen Kontrolle (a) und TNF- $\alpha$ -Ak (b). Die Aufnahmen wurden zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung angefertigt. Verglichen mit Abbildung 13 b) ist bei dem mit 10 Gy bestrahlten Tier der Gruppe TNF- $\alpha$ -Ak in der rechten Niere noch weniger funktionierendes Parenchym übrig. Bei der ebenfalls mit 10 Gy bestrahlten Maus der Kontrollgruppe zeigt sich nur eine geringe Aktivitätsabschwächung der rechten gegenüber der linken Niere.



**Abbildung 28**

Planare Szintigramme nach statischer Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA. Dargestellt sind charakteristische Szintigramme von mit 10 Gy bestrahlten Mäusen aus den Gruppen Kontrolle und TNF- $\alpha$ -Ak. Die Aufnahmen entstanden zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung.

- a) Kontrolle: Geringe Aktivitätsabschwächung der rechten gegenüber der linken Niere.
- b) TNF- $\alpha$ -Ak: An der rechten Niere ist nur noch wenig funktionierendes Parenchym vorhanden. Vergleiche hierzu auch Abbildung 26 b) einer mit 8 Gy bestrahlten Maus der Gruppe TNF- $\alpha$ -Ak.

**Tabelle 17**

Unterschied im absoluten mittleren Funktionsverlust der rechten Niere zwischen Kontrollgruppe und TNF- $\alpha$ -Ak bei einer applizierten Strahlendosis von 10 Gy.

Gruppe (n)	Initiale Nierenfunktion	Mittlerer Funktionsverlust absolut $\pm$ SD (relativ)	p-Wert (Mann-Whitney-Test)
Kontrolle (5)	0,56 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,03 (11 %)	
TNF- $\alpha$ -Ak (7)	0,54 $\pm$ 0,03	0,22 $\pm$ 0,08 (41 %)	0,024 *

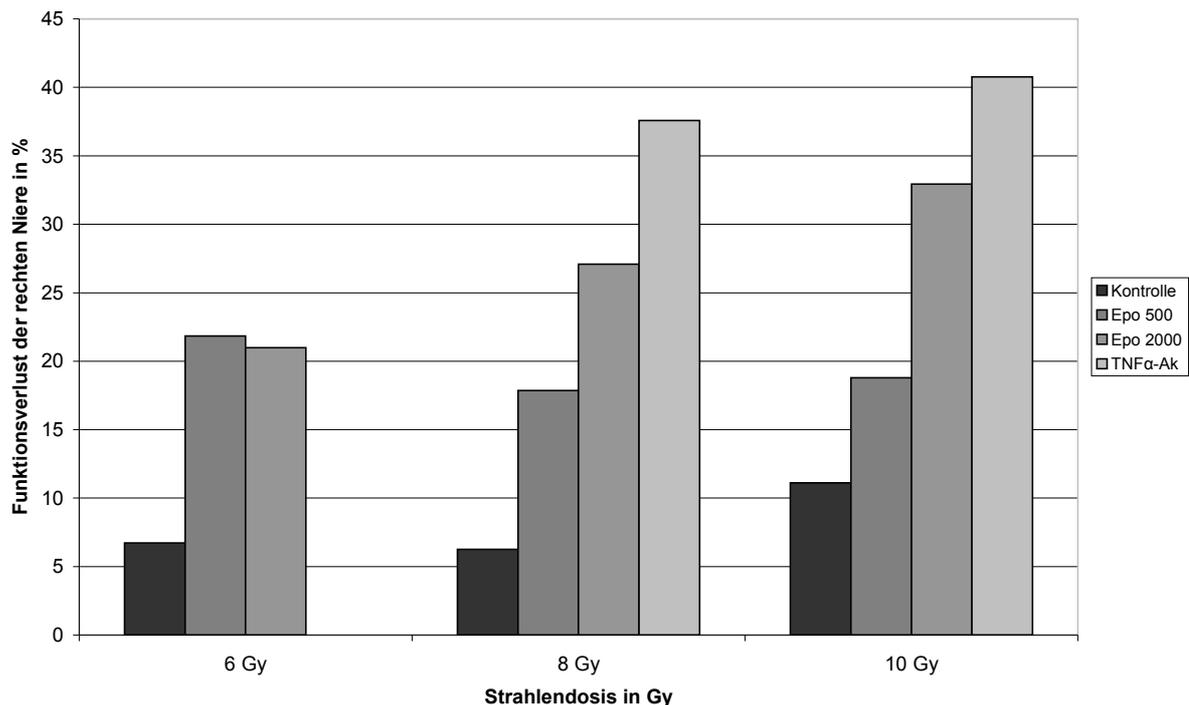
Der relative Funktionsverlust der rechten Niere betrug in der Kontrollgruppe 11 % gegenüber der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“ von 41 %. Der U-Test nach Mann und Whitney ergab bei einem p-Wert von 0,024 einen signifikanten Unterschied in der Funktionsabnahme zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“.

**3.3.3.3. Zusammenfassende Betrachtung: Kontrolle und TNF- $\alpha$ -Ak**

Sowohl in den Kontrollgruppen, als auch in den mit Infliximab behandelten Gruppen verschlechterte sich nach Bestrahlung mit 8 bzw. 10 Gy die Nierenfunktion, dies jedoch in unterschiedlichem Maße. Die Bestrahlung unter Behandlung mit Infliximab führte offensichtlich zu einer deutlicheren FunktionseinbuÙe der rechten Niere als die Bestrahlung alleine. Der Unterschied im Funktionsverlust zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe „TNF- $\alpha$ -Ak“ nach Bestrahlung mit 10 Gy ist mit einem p-Wert von 0,024 als signifikant, der Unterschied bei einer Strahlendosis von 8 Gy sogar als höchst signifikant anzusehen.

### 3.4. Zusammenfassung der szintigraphischen Ergebnisse

Das folgende Balkendiagramm stellt die Ergebnisse der szintigraphischen Untersuchungen zusammenfassend dar. Auf der Abszisse finden sich die drei Strahlendosis-Gruppen wieder. Jeder Balken steht dabei für eine Substanzgruppe bzw. für die Kontrollgruppe. Die Höhe der Balken bezeichnet den Funktionsverlust der rechten Niere nach 50 Wochen in Prozent.



**Abbildung 29**

*Funktionsverlust der rechten Niere zum Zeitpunkt 50 Wochen nach Bestrahlung, angegeben in Prozent. Darstellung für jede Versuchsgruppe zu den applizierten Strahlendosen.*

Sowohl die Behandlung mit Erythropoietin als auch die Behandlung mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab hatte gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe eine Verschlechterung der Nierenfunktion zur Folge. Diese Verschlechterung zeigt sich unter allen drei, bei Infliximab unter beiden Strahlendosen. Die Gruppe, die eine höhere Dosis von 2000 U/kg KG Erythropoietin erhalten hatte, zeigte eine stärkere Abnahme der Nierenfunktion als die Gruppe mit der niedrigeren Dosis von nur 500 U/kg KG Erythropoietin. Die deutlichste Funktionsabnahme ergab sich jedoch nach Behandlung mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab. Eine Abhängigkeit der Funktionsver-

schlechterung von der Höhe der Strahlendosis wird besonders bei den Gruppen „Epo 2000“ und „TNF- $\alpha$ -Ak“ deutlich, zeigt sich jedoch auch in der Kontrollgruppe. Hierbei scheint erst eine Strahlendosis zwischen 8 und 10 Gy eine Verschlechterung der Nierenfunktion zu bewirken.

## 4. Diskussion

### 4.1. Radioprotektion durch Erythropoietin

An weiblichen C3H-Mäusen sollte im vorliegenden Projekt zunächst der Effekt von Erythropoietin auf die Nieren hinsichtlich radioprotektiver Eigenschaften überprüft werden. Die Überlegung, dass die Gabe von Erythropoietin den Nieren einen gewissen Schutz vor ionisierender Strahlung vermitteln könnte, resultiert aus verschiedenen Vorarbeiten zum Thema Gewebeprotektion durch Erythropoietin.

Über die Stimulation der Hämatopoese hinaus haben sich mittlerweile weitere Betätigungsfelder des Zytokins erschlossen. In verschiedenen experimentellen Studien wurden gewebeprotective Effekte von Erythropoietin gesehen. Bei vielen Untersuchungen im Zusammenhang mit Erythropoietin als gewebeprotectivem Agens spielen ischämische oder toxische Gewebeschädigungen etwa durch Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Cyclosporin eine Rolle. Postuliert wird eine Inhibition der Apoptose durch den Wachstumsfaktor.

An einer klonalen murinen hämatopoetischen Zelllinie mit Überexpression des Epo-Rezeptors (Epo-R) wurde *in vitro* eine erhöhte Resistenz gegenüber strahleninduzierten Zellschäden beobachtet. Ein Einfluss von Erythropoietin auf den Zellzyklus in Form einer Akkumulation der Zellen in der S-Phase konnte in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden (Santucci 1994, S. 508). Der Epo-Rezeptor konnte auch bei Astrozyten und an den Endothelzellen von Kapillaren im Gehirn von Mensch, Maus und Ratte nachgewiesen werden. Erythropoietin ist es damit möglich, die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren (Brines 2000, S. 10528). Nach zerebraler Ischämie zeigte die Behandlung mit Erythropoietin *in vitro* und *in vivo* tatsächlich neuroprotective Effekte. Diese werden über eine Hemmung der Apoptose von Neuronen vermittelt (Sírén 2001, S. 4049). Diese Befunde geben Anlass zu der Überlegung, Erythropoietin beispielsweise bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom einzusetzen, die sich einer prophylaktischen Schädelbestrahlung unterziehen müssen. Dabei soll den nach Bestrahlung vorkommenden neurokognitiven Defiziten vorgebeugt werden (Senzer 2002, S. 47). Bei radiochirurgischen Versuchen an Gehirnen von Ratten verwendete die Arbeitsgruppe um Erbayraktar et al. carbamyliertes Erythropoietin (CEPO), das keinerlei Wirkung auf das Knochenmark zeigt. Eventuelle unerwünschte Nebenwirkungen durch die Therapie mit dem Wachstumsfaktor in Form von thromboembolischen Ereignissen sollten so vermieden werden. Tatsächlich zeigte sich ein

radioprotektiver Effekt von CEPO. Funktionelle Defizite, die kurz nach Bestrahlung aufgetreten waren bildeten sich rasch zurück, histologisch wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ein geringeres Ausmaß an Nekrosebildung gefunden (Erbayraktar 2006, S. 77).

Auch im Myokard wurde der Epo Rezeptor entdeckt. Deshalb wurde der Effekt von Erythropoietin auch im Zusammenhang mit ischämischen Myokardschäden untersucht. In vitro wurde bei hypoxischen Kardiomyozyten eine geringere Apoptoserate registriert, in vivo konnte bei Ratten der Verlust von Kardiomyozyten um etwa 50 % reduziert werden (Calvillo 2003, S. 4804). Nach Ligatur einer der menschlichen LAD entsprechenden Koronararterie bei Sprague-Dawley-Ratten und lediglich einmaliger Gabe von 3000 U/kg Erythropoietin direkt nach der Operation konnte die Ausdehnung des resultierenden Myokardinfarkts gegenüber unbehandelten Tieren stark limitiert werden (Moon 2003, S. 11615). Auch bei Hautläsionen verbessert eine Behandlung mit Erythropoietin die Wundheilung, erhöht die Kapillardichte im verletzten Hautareal und hemmt Entzündungsvorgänge (Buemi 2002, S. 414).

#### **4.1.1. Erythropoietin und die Protektion der Niere**

Erythropoietin stimuliert in vitro dosisabhängig DNA-Synthese und Proliferation von Zellen des Mesangiums, des proximalen Tubulus und des distalen Tubulus (Westenfelder 1999, S. 814). An der gesunden Niere in vivo können diese Effekte jedoch nicht festgestellt werden. Offensichtlich wird der Wachstumsfaktor erst unter pathologischen Bedingungen aktiv (Westenfelder 2002, S. 296).

Untersuchungen an ischämisch oder toxisch geschädigten Nieren konnten positive Effekte einer Behandlung mit Erythropoietin zeigen. Die Erholungsrate nach akutem Nierenversagen, verursacht durch das Chemotherapeutikum Cisplatin, ist signifikant höher als bei alleiniger Behandlung mit Cisplatin. Dies zeigten Versuche an Sprague-Dawley-Ratten, bei denen renaler Blutfluss und glomeruläre Filtrationsrate durch Clearance-Untersuchungen bestimmt wurden. Lichtmikroskopie und Immunhistochemie an mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen) behandelten Nierenpräparaten gaben Hinweise auf eine erhöhte Proliferationsrate der Tubuluszellen nach Stimulation durch Erythropoietin (Bagnis 2001, S. 934).

Bei ischämisch bedingtem akutem Nierenversagen erwies sich der Einsatz des Wachstumsfaktors in vitro und in vivo gleichermaßen als vorteilhaft. Verwendet wurden für die In-vitro-Tests Kulturen aus humanen Zellen des proximalen Tubulus unter

hypoxischen Bedingungen. Die Apoptoserate konnte durch Zugabe von Erythropoietin signifikant vermindert werden, die mitotische Aktivität der Zellen wurde hingegen intensiviert. Im In-vivo-Versuch (Ischämie-Reperfusion-Modell) wiesen Ratten, die eine ein- oder beidseitige Nierenischämie erlitten hatten und zugleich mit Erythropoietin behandelt worden waren niedrigere Kreatininwerte auf als die Tiere der Kontrollgruppe, der der Wachstumsfaktor vorenthalten worden war (Vesey 2004, S. 350). In einer weiteren Studie wurde im Ischämie-Reperfusion-Modell an Rattennieren eine verminderte Aktivität der Caspase-3 gefunden, gegenüber einer erhöhten Expression von bcl-2 (Yang 2003, S. 1755). Auch eine Studie von Sharples et al., ebenfalls im Ischämie-Reperfusion-Modell an der Ratte, fand eine verminderte Aktivität der Caspase-3, darüber hinaus aber auch der Caspase-8 und -9. Apoptosen wurden bei mit 300 U/kg Erythropoietin behandelten Ratten seltener gesehen. Insgesamt waren glomeruläre und tubuläre Dysfunktion in geringerem Ausmaß vorhanden als bei unbehandelten Tieren (Sharples 2004, S. 2117). In einer Studie von Patel et al. wurden männliche C57BL/6J-Mäuse einem Ischämie-Reperfusion-Versuch unterzogen. Die Gabe von Erythropoietin erfolgte einerseits als Vorbehandlung drei Tage präoperativ mit einer Tagesdosis von 1000 U/kg KG, in einer anderen Gruppe am Tag der Operation mit einer Dosis von 1000 U/kg KG. Die Behandlung mit Erythropoietin hatte eine signifikante Verminderung des renalen Schadens zur Folge. Die Vorbehandlung mit Epo war letztlich wirkungsvoller als die einmalige Gabe am Operationstag (Patel 2004, S. 985).

#### **4.1.2. Eignung von Erythropoietin als potentiell radioprotektives Agens**

Zur Wahl von Erythropoietin als möglichem Agens zur Radioprotektion der Niere trug wesentlich das gewebeprotective Potential des Wachstumsfaktors bei. Dieses konnte wie bereits erwähnt in zahlreichen experimentellen Studien gezeigt werden. Meist war dabei die Schädigung der Nierenzellen bzw. des Nierengewebes ischämisch oder toxisch, nicht jedoch durch ionisierende Strahlung bedingt. Die meisten Versuche wurden überdies an Ratten durchgeführt. Auch die Erkenntnis, dass der Erythropoietin-Rezeptor im Nierengewebe exprimiert wird, lässt Erythropoietin zur potentiellen Prävention von strahleninduzierten Nierenschäden geeignet erscheinen.

Die bei der vorliegenden Arbeit verabreichte Dosis von 500 U/kg Körpergewicht orientierte sich an bereits vorhandenen experimentellen Studien zur Nierenschädigung im Ischämie-Reperfusion-Modell. Ebenso wurde mit dem Zeitschema verfahren. Ein

Tier-Modell, das Gabe von Erythropoietin und Nierenbestrahlung kombinierte, war bis zum Beginn dieses Projekts noch nicht vorhanden. Der zeitliche Rahmen zur Applikation des Medikaments ist durch Patel et al. untersucht worden. Eine dreitägige Vorbehandlung wurde dabei mit einer einmaligen Bolusgabe verglichen. Als vorteilhafter erwies sich indes die Vorbehandlung mit Erythropoietin. Es ist jedoch nicht bekannt, ob bei Bestrahlung eine Vorbehandlung oder Nachbehandlung vergleichbare Ergebnisse bringen würde. In Arbeiten zur Radioprotektion des Rückenmarks durch Wachstumsfaktoren war das für dieses Projekt gewählte Zeitschema jedenfalls effektiv (Nieder 2005, S. 149).

Tabelle 18 zeigt In-vivo-Modelle zur Gewebeprotektion der Niere durch rekombinantes humanes Erythropoietin. Angegeben sind das Modell der Gewebeschädigung, die Tierspezies, der Zeitrahmen der Gabe von Erythropoietin, die Dosierung von Erythropoietin mit der Art der Injektion und die Referenz der experimentellen Studie.

### **Tabelle 18**

*In-vivo-Modelle zur Gewebeprotektion der Niere durch rekombinantes humanes Erythropoietin.*

<b>Modell</b>	<b>Spezies</b>	<b>Zeitraumen</b>	<b>Dosierung</b>	<b>Referenz</b>
Cisplatin-Toxizität	Ratte	9 Tage, 1 x tägl.	100 U/kg i. p.	Bagnis 2001
Ischämie-Refusion	Ratte	Cisplatin: 1 x 6 mg/kg 24 h vor OP	3000 U/kg i. v.	Yang 2003
Ischämie-Refusion	Ratte	Bolus am OP-Tag	5000 U/kg i. p.	Vesey 2004
Ischämie-Refusion	Maus	3 Tage, 1 x tägl. bzw. Bolus am OP-Tag	1000 U/kg s. c.	Patel 2004
Ischämie-Refusion	Ratte	Bolus am OP-Tag	300 U/kg i. v.	Sharples 2004

## **4.2. Radioprotektion durch den TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab**

Damit der TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab als Radioprotektor zur Prävention der Strahlennephropathie eingesetzt werden kann, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  muss entscheidend zur Pathogenese der Strahlennephropathie beitragen, etwa durch Schädigung von Endothelzellen oder Tubulosepithelien.
2. Dazu müssen Zellen im Nierengewebe den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  nach Bestrahlung exprimieren.
3. Damit der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  wirken kann, müssen auf den Zielzellen Rezeptoren für das Zytokin vorhanden sein.

### **4.2.1. Schädigung von Endothelzellen durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Die Schädigung von Endothelzellen der Nierenkapillaren spielt in der Pathogenese der Strahlennephropathie eine bedeutende Rolle. Wäre es möglich, die Schädigung von Gefäßendothel durch eine Blockade des Zytokins TNF- $\alpha$  zu vermindern, könnte damit der Entwicklung einer schweren Strahlennephropathie vorgebeugt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des TNF- $\alpha$ -Antikörpers Infliximab versucht.

Von TNF- $\alpha$  ist bekannt, dass es die Genexpression von Endothelzellen unter anderem durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B fördert. Dies wird auch als „Aktivierung“ der Endothelzellen bezeichnet und stellt einen wichtigen Schritt in der Entstehung von Entzündungsreaktionen dar. TNF- $\alpha$  führt dabei zur Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (Pohlman 1986, S. 4549) und wirkt prokoagulatorisch (Bevilacqua 1986, S. 4534). Zudem wirkt das Zytokin ebenfalls durch Apoptoseinduktion direkt zytotoxisch auf normale Endothelzellen in vitro (Robaye 1991, S. 452). In bovinen Glomeruli induziert TNF- $\alpha$  abhängig von Einwirkungsdauer und Dosis die Apoptose von Endothelzellen (Meßmer 1999, S. 2326).

### **4.2.2. Expression des Tumornekrosefaktors- $\alpha$ in der Niere**

Im Zuge einer autoimmun medierten Glomerulonephritis wurde in der Niere vermehrt TNF-mRNA gefunden (Boswell 1988, S. 3051). TNF- $\alpha$  gilt als wesentlicher Mediator der Entzündungsvorgänge bei Glomerulonephritiden. Immunkomplexbildung und Komplementaktivierung führen zu seiner Freisetzung (Stahl 2001, S. 940). Dafür verantwortlich sind eingewanderte Immunzellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten, aber auch die niereneigenen Mesangiumszellen (Baud 1989, S. 1114). Mesangiumszellen sind am entzündlichen Geschehen in der Niere klar beteiligt. Einerseits reagieren sie auf inflammatorische Reize wie die Komplementaktivierung (Lovett 1987, S. 2477), andererseits setzen sie selbst Entzündungsmediatoren frei, neben TNF auch Interleukin-1 (Lovett 1988, S. 118).

Die Rezeptoren für den Tumornekrosefaktor TNFR1 und TNFR2 werden in der gesunden Niere des Menschen von verschiedenen Zelltypen exprimiert (Al-Lamki 2001, S. 1505). Dabei wird TNFR1 auf dem Endothel der Glomeruli und in Maßen auf den Endothelzellen der peritubulären Arteriolen und Kapillaren exprimiert. Dagegen wurde TNFR2 vorwiegend auf Epithelzellen der distalen und proximalen Tubuli, praktisch gar nicht auf dem glomerulären Endothel gefunden. Für die Entwicklung einer autoimmun induzierten Glomerulonephritis ist insbesondere der TNFR2 von Bedeutung. Er wird dann auch auf den Endothelzellen der Glomeruli und der postkapillären Venolen exprimiert. Nephritis induziert also die Expression des TNFR2 auf den Endothelzellen der Glomeruli (Vielhauer 2005, S. 1202).

### **4.2.3. Expression von TNF- $\alpha$ in Tumorzellen und Normalgeweben nach Bestrahlung**

In bestimmten humanen Sarkom-Zelllinien fanden Hallahan et al. nach Bestrahlung erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ -mRNA (Hallahan 1989, S. 10105). Genauso konnte bei humanen Leukämiezellen aus dem Knochenmark und Monozyten aus dem peripheren Blut eine vermehrte Produktion von TNF- $\alpha$ -mRNA und dem entsprechenden Protein TNF- $\alpha$  festgestellt werden (Sherman 2001, S. 1795). Ionisierende Strahlung kann offensichtlich die Expression von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  induzieren. Sowohl ionisierende Strahlung, als auch TNF- $\alpha$  für sich alleine sind in der Lage Tumorzellen zu schädigen. Aus der Interaktion beider ergibt sich eine additive Wirkung. Es ist daher anzunehmen, dass die Strahlenwirkung auch auf einer ver-

mehrten Ausschüttung zytotoxischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  beruht – ein interessanter Aspekt für die onkologische Therapie. Tatsächlich führte dies zu Überlegungen, TNF- $\alpha$  in Kombination mit Bestrahlung in der Tumorthherapie einzusetzen. Allerdings ist TNF- $\alpha$  wegen unerwünschter Wirkungen, die bei adäquat hoher Dosierung auftreten, für die systemische Gabe eher ungeeignet. Deshalb wurde ein gentherapeutischer Ansatz mit einem adenoviralen Vektor entwickelt. Ein durch ionisierende Strahlung aktivierbarer Promotor soll dabei für die Transkription des TNF- $\alpha$ -Gens sorgen (Weichselbaum 2002, S. 667).

Nicht nur bei Tumorzellen, sondern auch in Normalgeweben wurde nach Bestrahlung vermehrt TNF- $\alpha$ -mRNA gefunden. Gut untersucht ist in dieser Hinsicht das Lungengewebe. Rube et al. fanden einen biphasischen Anstieg der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ . Bereits 1 h nach Bestrahlung konnte ein erster Anstieg festgestellt werden, der dann wieder zurückging, um anschließend in der pneumonitischen Phase erneut und in noch größerem Ausmaß mit einem Peak acht Wochen nach Bestrahlung aufzutreten (Rube 2004, S. 445).

#### **4.2.4. TNF- $\alpha$ als Radiosensitizer**

Es existieren Beispiele für einen radiosensibilisierenden Effekt von TNF- $\alpha$ . Hallahan et al. konnten dies an epithelialen und mesenchymalen Tumorzelllinien beobachten (Hallahan 1989, S. 10105). Eine weitere experimentelle Studie ergab, dass mit dem HI-Virus infizierte T-Zellen strahlenempfindlicher sind als nicht infizierte Zellen. Die Strahlensensibilität lässt sich durch Vorbehandlung der infizierten Zellen mit TNF- $\alpha$  noch steigern (Wong 1991, S. 4373).

Eissner et al. stellten bei in vitro Untersuchungen an humanen Endothelzellen aus der Nabelvene fest, dass Bestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy zur Apoptose der Zellen führte. Dieser Effekt wurde durch Behandlung mit bakteriellem Endotoxin (LPS) noch verstärkt. TNF- $\alpha$  ist daran offensichtlich beteiligt. Dies konnte durch gleichzeitige Gabe von Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  gezeigt werden, denn dabei wurde die gleiche niedrigere Apoptoserate erreicht wie durch alleinige Bestrahlung. LPS bzw. TNF- $\alpha$  wirken offensichtlich als Radiosensitizer. Allerdings wurde die strahleninduzierte Apoptose durch Gabe von TNF- $\alpha$ -Antikörpern allein weder verstärkt noch vermindert (Eissner 1995, S. 4186).

In der hier vorliegenden Untersuchung zeigte sich jedoch in der Gruppe, die neben der Bestrahlung mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab behandelt worden war, eine

erstaunlich ausgeprägte Verschlechterung der Nierenfunktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, aber auch im Vergleich zu den mit Erythropoietin behandelten Gruppen. In der In-vitro-Untersuchung von Eissner et al. wurde TNF- $\alpha$  erst in Anwesenheit von LPS exprimiert. Bestrahlung alleine reichte dazu nicht aus. Dadurch konnte der TNF- $\alpha$ -Antikörper auch nur bei Kombination von Bestrahlung und Gabe von LPS wirken, nicht jedoch bei alleiniger Bestrahlung. Bei den Versuchen für die vorliegende Arbeit wurde kein LPS eingesetzt. Der hier durch die Kombination von Bestrahlung und TNF- $\alpha$ -Antikörper verursachte Schaden ist demnach wohl nicht allein auf apoptotische Vorgänge im Endothel der Nierengefäße zurückzuführen. Vielmehr sind im In-vivo-Versuch erwartungsgemäß die Verhältnisse komplexer. Einige weitere Strukturen des Nierengewebes sind sicherlich mitbetroffen, so zum Beispiel das Tubulusepithel.

Aus der Betrachtung der Literatur ergibt sich zusammenfassend Folgendes:

1. TNF- $\alpha$  kann Endothelzellen schädigen.
2. TNF- $\alpha$  wird im Nierengewebe exprimiert, so gesehen bei der autoimmun medierten Glomerulonephritis.
3. Auf Endothelzellen und Tubuluszellen des Nierengewebes finden sich Rezeptoren für den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .
4. TNF- $\alpha$  kann radiosensibilisierend wirken, unter anderem bei Endothelzellen.
5. Die Expression von TNF- $\alpha$  kann in Tumorzellen und Normalgeweben durch Bestrahlung induziert werden. Offen bleibt in diesem Zusammenhang, ob TNF- $\alpha$  nach Bestrahlung auch in der Niere exprimiert wird, wie es beispielsweise im Lungengewebe der Fall ist.

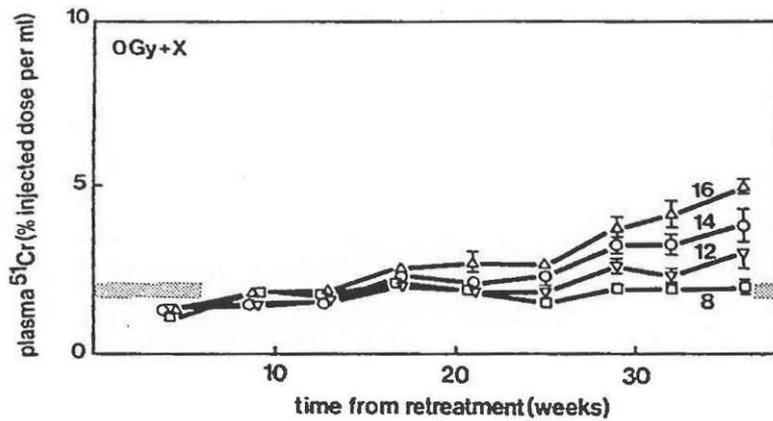
Diese Überlegungen führen zu der Annahme, dass eine Behandlung mit einem Inhibitor des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  wie Infliximab zur Prävention der Strahlennephropathie erfolgversprechend sein könnte.

### **4.3. Entwicklung der Nierenfunktion nach Bestrahlung**

Die einzeitige Bestrahlung der rechten Niere erfolgte mit den geringen bis mäßig hohen Strahlendosen von 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy. In der Nierenzintigraphie 50 Wochen nach Bestrahlung zeigte sich bei den Tieren der Kontrollgruppe eine beobachtbare, jedoch lediglich geringgradige Verschlechterung der Nierenfunktion im Vergleich zu den Ausgangswerten. Zu dem gleichen Ergebnis führten Untersuchungen von Stewart et al. zu Folgebestrahlungen. Hierbei wurden beide Nieren von C3H-Mäusen initial einzeitig mit Strahlendosen von 6 bis 12 Gy behandelt. Dadurch wurde im gleichen Nachbeobachtungszeitraum wie in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nur eine milde Verschlechterung der Nierenfunktion verursacht (Stewart 1988, S. 406).

Bei der Verwendung höherer Strahlendosen ist eine deutlichere Verschlechterung der Nierenfunktion zu erwarten. Tatsächlich gezeigt wurde dies ebenfalls durch Stewart et al. in mehreren Untersuchungen zu den Auswirkungen von Bestrahlung auf die Nierenfunktion. Bei fraktionierter Bestrahlung wurden Gesamtdosen von bis zu 50 Gy erreicht. In der Nachbeobachtung zeigte sich bei unbestrahlten Tieren keine signifikante Veränderung der Nierenfunktion mit steigendem Lebensalter. Das Ausmaß der Verschlechterung der Nierenfunktion bei den bestrahlten Tieren erwies sich als abhängig von der Strahlendosis. Bei höheren Strahlendosen traten die Nierenschäden bereits zu einem früheren Zeitpunkt auf als bei niedrigeren Dosen (Stewart 2001, S. 954).

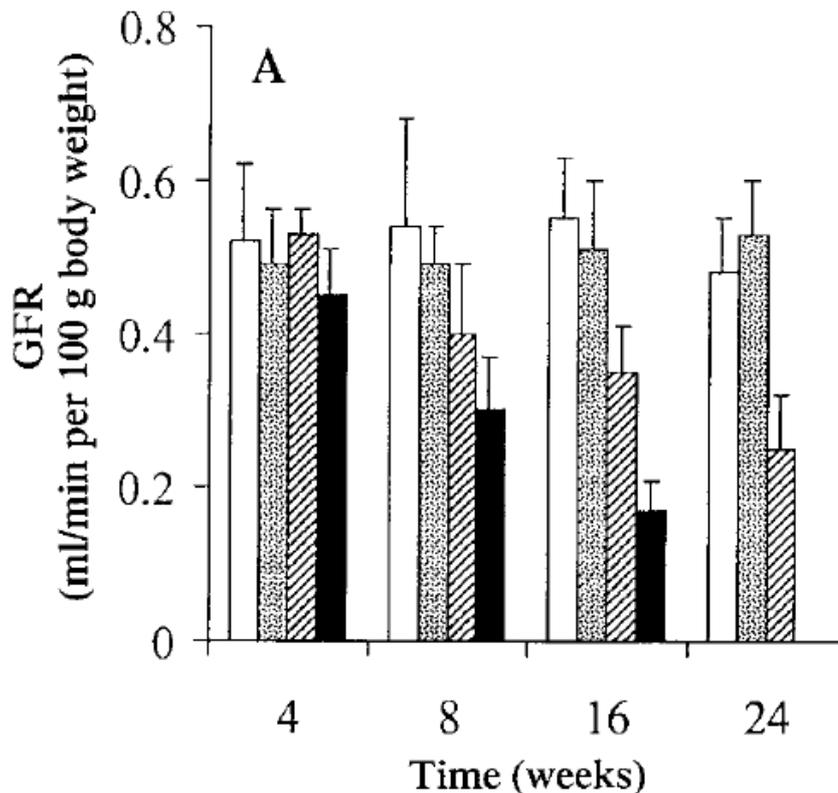
Auch bei Bestrahlung mit nur einer Fraktion entwickelte sich bei Dosen ab 10 Gy eine Verschlechterung der Nierenfunktion ab einem Zeitpunkt von etwa 20 Wochen nach Bestrahlung, die mit steigender Dosis deutlicher ausfiel (Stewart 1990, S. 536). Die folgende Grafik aus einer Arbeit von Stewart et al. (Abbildung 30) zu Folgebestrahlungen zeigt diese Entwicklung eines radiogen verursachten Nierenschadens bei Mäusen, deren Nieren beidseitig lediglich mit Einzeldosen von 8, 12, 14 und 16 Gy bestrahlt worden waren. Der Endpunkt lag bei 36 Wochen nach Bestrahlung.



**Abbildung 30**

Abgebildet ist die Entwicklung einer Nierenschädigung ohne Vorbestrahlung (0 Gy) und nach Behandlung mit unterschiedlichen Einzeldosen (X entspricht 8, 12, 14 und 16 Gy) bis zu einem Endpunkt bei 36 Wochen. Der schraffierte Bereich zeigt die über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant bleibende Nierenfunktion unbehandelter Mäuse (modifiziert nach Stewart et al. 1990).

Einzeldosen von 10 bis 20 Gy führten auch bei Bestrahlung der übrigen Niere von einseitig nephrektomierten Ratten zu einer dosisabhängigen, progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion, gemessen unter anderem an einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (Robbins 2001, S. 483). Abbildung 31 zeigt eine dosisabhängige Verminderung der glomerulären Filtrationsrate, die mit wachsendem zeitlichem Abstand zur Bestrahlung noch ausgeprägter wird. Der Endpunkt dieser Untersuchung lag bei 24 Wochen nach Bestrahlung.



**Abbildung 31**

Die Grafik zeigt bezogen auf die Wochen nach Bestrahlung die Veränderungen der glomerulären Filtrationsrate (ml/min pro 100 g Körpergewicht) der Restniere von einseitig nephrektomierten Ratten (modifiziert nach Robbins, 2001).

unbestrahlt (□), 10 Gy (▤), 15 Gy (▨), 20 Gy (■)

Beispiele für eine zeit- und dosisabhängige Verschlechterung der Nierenfunktion nach Bestrahlung finden sich in der Literatur in großer Zahl und bei unterschiedlichen Spezies. Dies lässt vermuten, dass die für die Strahlennephropathie verantwortlichen Mechanismen bei verschiedenen Spezies in ähnlicher Art und Weise ablaufen.

#### 4.3.1. Vorschädigung der Niere bereits bei geringen Strahlendosen

Geringe Einzeldosen unter 10 Gy verursachen zunächst nur eine schwer detektierbare und damit sehr geringe Strahlenreaktion der Niere. Dass jedoch auch durch solch kleine Dosen folgenreiche Schäden gesetzt werden, wird bei erneuter Bestrahlung der vorbehandelten Niere deutlich. Selbst wenn lange Zeiträume zwischen erster und zweiter Bestrahlung liegen und die erste Strahlenbehandlung keine er-

kennbare Verschlechterung der Nierenfunktion verursacht hat, führt die Folgebestrahlung zu einer verminderten Strahlentoleranz (Stewart 1994, S. 176).

In der vorliegenden Untersuchung war nach der geringen Verschlechterung der Nierenfunktion durch die verwendeten Strahlendosen in der Kontrollgruppe die Reaktion auf Bestrahlung in Kombination mit der Gabe von Erythropoietin bzw. Infliximab umso beeindruckender. Weder Erythropoietin, noch Infliximab allein gelten derzeit als nephrotoxisch.

#### **4.4. Einfluss von Erythropoietin auf die Nierenfunktion nach einzel- tiger Bestrahlung**

Die Gabe von Erythropoietin erfolgte an zwei Tagen um den Bestrahlungszeitpunkt herum. Dabei wurden zwei unterschiedliche Dosierungen eingesetzt: 500 U/kg KG und 2000 U/kg KG. Bestrahlt wurde einzzeitig mit den bereits bekannten Dosen von 6 Gy, 8 Gy und 10 Gy. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich ebenfalls eine zeit- und strahlendosisabhängige Verschlechterung der Nierenfunktion. Diese war bei den mit Erythropoietin behandelten Tieren noch ausgeprägter festzustellen als bei den unbehandelten Kontrolltieren. Zudem zeigte sich, dass die höhere Dosierung des Erythropoietin von 2000 U/kg KG die Nierenfunktion deutlicher beeinträchtigte als die kleinere Dosis von 500 U/kg KG. Zum Endpunkt der Untersuchungen 50 Wochen nach Bestrahlung war der Unterschied im Grad der Funktionsverschlechterung zwischen Kontrollen und medikamentös behandelten Tieren am größten. Ein Fortschreiten der Entwicklung wäre bei weiterer Beobachtung sicherlich zu erwarten gewesen.

Die Blutuntersuchungen zum Endpunkt der Studie zeigten keine pathologischen Werte für Harnstoff oder Hämatokrit.

In der vorliegenden Untersuchung konnte für den Wachstumsfaktor Erythropoietin kein radioprotektiver Effekt festgestellt werden. Ganz im Gegenteil scheint Erythropoietin vielmehr die Empfindlichkeit des Nierengewebes gegenüber ionisierender Strahlung erhöht zu haben. Dieser Effekt war dabei abhängig von der verabreichten Dosis des Wachstumsfaktors. Auch wenn hier nicht wie in vorangegangenen Studien an ischämisch oder toxisch geschädigten Nieren ein positiver Effekt von Erythropoietin gezeigt werden konnte, so scheint das Zytokin auch bei lediglich kurzzeitiger Applikation Einfluss auf die Spättoxizität ionisierender Strahlung zu nehmen. Wie der Vergleich mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe zeigt, kann die Verschlechterung der Funktion der rechten Niere nicht ausschließlich den relativ geringen Strahlendosen von 6, 8 und 10 Gy angelastet werden.

##### **4.4.1. Thrombogenes Potential von Erythropoietin**

Eine mögliche Erklärung für die Verschlechterung der Nierenfunktion unter Bestrahlung in Kombination mit der Gabe von Erythropoietin wäre die Bildung von Thrombo-

sen bei erhöhtem Hämatokrit und damit erhöhter Viskosität des Blutes. Eine Meta-Analyse von 57 randomisierten kontrollierten Studien ergab ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse bei Patienten, die mit Epoetin oder Darbepoetin behandelt worden waren (Bohlius 2006, S. 709). Das relative Risiko eines thromboembolischen Ereignisses war verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe in der behandelten Gruppe um 67 % erhöht (RR = 1,67, 95 % KI = 1,35 bis 2,06). In den hier analysierten Studien wurde die Wirkung von Epoetin und Darbepoetin mit Transfusion roter Blutzellen mit der Wirkung der Transfusion roter Blutzellen allein bei der Behandlung von Anämie bei Krebspatienten mit oder ohne antineoplastischer Therapie untersucht. Eine prospektive Multicenter-Studie zur Häufigkeit und Risikofaktoren der venösen Thrombembolie bei ambulanten Krebspatienten, die mindestens eine Zyklus Chemotherapie erhalten hatten, identifizierte Erythropoietin als Risikofaktor für venöse Thrombembolien (Khorana 2005, S. 2826). Eine weitere retrospektive Fall-Kontroll-Studie untersuchte 147 Patientinnen mit einem lokalisierten Karzinom der Cervix uteri oder der Vagina, die mit kombinierter Chemo- und Radiotherapie behandelt worden waren, auf das Auftreten einer symptomatischen Venenthrombose. Auch hier war die Gabe von Erythropoietin mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Venenthrombosen verbunden (Wun 2003, S. 1517). Allerdings existieren auch zahlreiche Studien, in denen durch die Verabreichung von Erythropoietin keine erhöhte Rate an thromboembolischen Ereignissen festgestellt werden konnte. Im Gegenteil: Erythropoietin kann durch eine Erhöhung des Hämoglobinspiegels bei anämischen Krebspatienten wesentlich zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen. In der Studie von Wun et al. konnte auch keine Assoziation zwischen dem Thromboserisiko und dem mittleren bzw. maximalen Hämoglobinwert gefunden werden (Wun 2003, S. 1519). Eine mögliche thrombogene Aktivität, möglicherweise vermittelt über eine Aktivierung von Endothelzellen, kann dem Erythropoietin jedenfalls nicht ganz abgesprochen werden (Stohlawetz 2000, S. 2987).

Gegen eine Verschlechterung der Funktion der rechten Niere nach Behandlung mit Erythropoietin durch thromboembolische Ereignisse spricht in der vorliegenden Untersuchung die kurze Behandlungsdauer mit dem Wachstumsfaktor, die kaum solch dramatische Folgen erwarten lassen würde. Der Effekt von Erythropoietin auf die Blutviskosität wäre dabei vorübergehend und nur kurzfristig. Die Verschlechterung der Nierenfunktion schritt jedoch die gesamte Beobachtungszeit über fort, wobei der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und den mit Erythropoietin behandelten Gruppen stetig größer wurde. 20 bis 40 Wochen nach Bestrahlung von Mäusenieren tre-

ten prothrombotische Veränderungen wie ein erhöhter Gehalt der Glomeruli an Von-Willebrand-Faktor auf, 4 bis 40 Wochen nach Bestrahlung auch eine erniedrigte glomeruläre Aktivität von ADPase, einem Hemmstoff der Plättchenaktivierung. Auch zeigte sich dabei eine vermehrte Zahl von Glomeruli mit Ablagerungen von Fibrinogen und Fibrin. Diese Veränderung sind aber im Gegensatz zur Strahlennephropathie anscheinend weder abhängig von der Strahlendosis noch von der Fraktionierung der Bestrahlung. Der Stellenwert von thrombotischen Veränderungen in der Entwicklung der Strahlennephropathie ist also noch unklar (Stewart 2001, S. 956).

#### **4.4.2. Mitogene Aktivität von Erythropoietin**

Eine weitere Erklärung für den negativen Effekt der Erythropoietin-Gabe auf die Funktion der bestrahlten Mäuseniere liegt in der mitogenen Wirkung des Wachstumsfaktors auf Endothel- und Tubuluszellen. Anagnostou et al. fanden bei Kulturen von humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis und von bovinen Endothelzellen von Nebennierenkapillaren nach Gabe von rekombinantem humanem Erythropoietin eine dosisabhängige Proliferation (Anagnostou 1990, S. 5979). Proximale Tubuluszellen der Maus proliferierten bei einer In-vitro-Studie von Westenfelder et al. nach Gabe von Epo ebenfalls dosisabhängig (Westenfelder 1999, S. 818). Diese Zellen spielen bei der Entstehung der Strahlennephropathie eine herausragende Rolle. Dass das Kapillarendothel von ionisierender Strahlung in besonderem Maße betroffen wird, konnten beispielsweise Jaenke et al. bei einer Untersuchung an Schweinen zeigen, bei denen beide Nieren einzeitig mit einer Dosis von 9,8 Gy bestrahlt worden waren. Bereits sechs Wochen nach Bestrahlung fanden sich im Lichtmikroskop aktivierte Kapillarendothelzellen mit aufgedunsenen Kernen und aufgequollenem Zytoplasma (Jaenke 1993, S. 398). Veränderungen am Endothel der kleinen Nierengefäße treten also schon relativ früh nach Bestrahlung auf. Dies gilt auch für Reaktionen des Tubulusepithels (Cohen 2003, S. 490).

Zellen in Proliferation reagieren sensibler auf ionisierende Strahlung als Zellen, die sich gerade in einer Ruhephase des Zellzyklus befinden. Als besonders strahlenempfindlich gelten dabei Zellen in der G2-Phase und während der Mitose. Danach nimmt die Empfindlichkeit in der folgenden Reihenfolge ab: Zellen in der G1-Phase, der frühen S-Phase und schließlich in der späten S-Phase (Sinclair 1966, S. 473). Werden Endothelzellen und Tubuluszellen der Nieren durch Behandlung mit Erythropoietin zur Proliferation angeregt, so mag daraus eine erhöhte Strahlenempfindlich-

keit resultieren. Befinden sich die Zellen also nach Stimulation durch den Wachstumsfaktor in größerer Zahl als ohne mitogenen Reiz in der Phase der Zellteilung oder in einer anderen radiosensitiven Phase des Zellzyklus, so würde bei gleichzeitiger Bestrahlung deren Wirkung potentiert. Ergebnis wäre ein früher und größerer Gewebsschaden. Genauere Untersuchungen auf Zellebene zum Einfluss von Erythropoietin auf den Zellzyklus unter der Einwirkung ionisierender Strahlung wären zur weiteren Klärung des Sachverhalts wünschenswert.

#### **4.4.3. Konsequenzen für die klinische Anwendung von Erythropoietin in Kombination mit Strahlentherapie**

In der Klinik findet Erythropoietin im Zusammenhang mit Bestrahlung Anwendung bei Krebspatienten zur Behandlung von Anämien. Die Beseitigung der Anämie verbessert laut einiger Studien die Lebensqualität der Patienten. Es gibt Hinweise, dass Erythropoietin auch eine verstärkte Oxygenierung von Tumorgewebe bewirkt, was wiederum dessen Strahlensensibilität erhöht.

In letzter Zeit finden sich aber auch Anhaltspunkte dafür, dass Krebspatienten, die zusätzlich mit Erythropoietin behandelt worden waren, ein schlechteres Gesamtüberleben aufweisen als unbehandelte Patienten. In einer randomisierten Placebo-kontrollierten Phase-III-Studie zur Strahlentherapie an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zeigte sich ein schlechteres locoregional progressionsfreies Überleben der mit Epoetin- $\beta$  behandelten Gruppe (Henke 2003, S. 1257). Eine weitere Erkenntnis lässt es ratsam erscheinen, Vorsicht im Umgang mit Erythropoietin bei der Behandlung von Krebspatienten walten zu lassen. Erythropoietin kann über seinen Rezeptor zumindest in vitro zahlreiche Tumoren zu verstärktem Wachstum anregen (Yasuda 2003, S. 1026). Eine randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie sollte bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom den Einfluss eines durch die Gabe von Erythropoietin normalisierten Hämoglobinspiegels auf das Überleben untersuchen. Erythropoietin wurde in diesem Rahmen neben der Chemotherapie verabreicht. Weil sich jedoch in der mit Erythropoietin behandelten Gruppe eine höhere Mortalität zeigte, wurde die Studie vorzeitig abgebrochen (Leyland-Jones 2003, S. 459). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte Mortalität der Krebspatienten wäre auch das vermehrte Auftreten von thromboembolischen Ereignissen wie beispielsweise Lungenembolien (Bohlius 2006, S. 711).

Es ist also immer noch fraglich, welche Rolle Erythropoietin in der begleitenden Behandlung von Krebspatienten wirklich spielt. In der vorliegenden experimentellen Untersuchung jedenfalls konnte kein radioprotektiver Effekt des Wachstumsfaktors gezeigt werden. Dagegen wurde der Schaden durch ionisierende Strahlung an Normalgewebe sogar verstärkt. Sorgfalt und Umsicht ist in jedem Fall im Umgang mit der Substanz im klinischen Alltag gefragt. Unter Umständen muss bei der Behandlung von Anämien dann auch auf Alternativen wie der Transfusion roter Blutzellen zurückgegriffen werden.

#### **4.5. Einfluss von Infliximab auf die Nierenfunktion nach einzeitiger Bestrahlung**

Am Tag vor, einen und fünf Tage nach der Bestrahlung erhielten einige Tiere den TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab in der Dosis 8 mg/kg KG. Bestrahlt wurde in einer Sitzung mit 8 Gy und 10 Gy im dorsalen Stehfeld.

Unter beiden Strahlendosen entwickelte sich eine mit wachsendem Abstand zum Bestrahlungszeitpunkt progrediente Verschlechterung der Nierenfunktion, die 50 Wochen nach Bestrahlung maximal ausgeprägt war. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich zum Endpunkt der Untersuchungen ein signifikanter Unterschied im Grad der Nierenfunktion unter beiden Strahlendosen ( $p = 0,001$  bei 8 Gy und  $p = 0,024$  bei 10 Gy nach Mann und Whitney). Dabei war die Nierenfunktion bei den mit Infliximab behandelten Tieren also signifikant stärker vermindert als in der Kontrollgruppe.

Auch für den TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab konnte damit in dieser Untersuchung kein positiver Effekt im Hinblick auf die Entwicklung einer Strahlennephropathie festgestellt werden. Vielmehr scheint die Gabe des Antikörpers zu einer noch ausgeprägteren, progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion nach Bestrahlung geführt zu haben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der TNF- $\alpha$ -Antikörper hier als Radiosensitizer gewirkt hat.

##### **4.5.1. TNF- $\alpha$ als Radioprotektor und deletärer Effekt von TNF- $\alpha$ -Antikörpern**

In der Literatur wird tatsächlich auch dem Tumornekrosefaktor ein radioprotektiver Effekt zugeschrieben. Laut Urbaschek et al. kann die Letalität von C3H-Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung durch die Gabe von Tumornekrosefaktor von einer LD 75/30 (Strahlendosis, die 75 % der Mäuse innerhalb von 30 Tagen tötet) auf eine LD 40/30 gesenkt werden (Urbaschek 1987, S. 181).

Negative Auswirkungen der Gabe von TNF- $\alpha$ -Antikörpern zeigten sich auch in einer Studie von Neta et al. Dabei wurden CD2F1-Mäuse einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen und erhielten 20 Stunden vor oder eine Stunde nach Bestrahlung den TNF- $\alpha$ -Antikörper „TN3 19.12“. Daraufhin sank die Überlebensrate gegenüber der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe (Neta 1991, S. 1178). Der

Tumornekrosefaktor scheint also auch für die Erholung von radiogen verursachten Organschäden von Bedeutung zu sein. Wird TNF ausgeschaltet, so wirken möglicherweise andere Zytokine ohne radioprotektive Eigenschaften wie zum Beispiel TGF- $\beta$  oder IL-6 als Radiosensitizer (Neta 1991, S. 1180).

Im Gegensatz zu der Arbeit von Neta et al. wurde in dem vorliegenden Projekt freilich keine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt, die eine massive Schädigung des blutbildenden Knochenmarks zur Folge gehabt hätte. Trotzdem wäre es durchaus denkbar, dass im Nierengewebe der Mäuse ganz ähnliche Vorgänge ablaufen wie im Knochenmark. Es ist anzunehmen, dass die Bestrahlung auch im Nierengewebe zu einer erhöhten Expression von TNF- $\alpha$ -mRNA und zu einer vermehrten Ausschüttung des Genproduktes TNF- $\alpha$  führt. Wird die radioprotektive Wirkung des Zytokins inhibiert, resultiert nach Neta et al. eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit des Gewebes. Unter der Voraussetzung, dass TNF- $\alpha$  unter den Umständen der vorliegenden Untersuchung als Radioprotektor gewirkt hätte, würden diese Überlegungen eine Erklärung für die ernüchternden Ergebnisse dieser Arbeit liefern.

#### **4.5.2. Immunreaktion durch transmembranales TNF- $\alpha$**

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit basiert auf den Ergebnissen von Scallon et al. Der IgG1-Isotyp des monoklonalen TNF- $\alpha$ -Antikörpers cA2, eben Infliximab, bindet in vitro an transmembranales TNF- $\alpha$  auf der Zelloberfläche von T-Zellen und Makrophagen. Über antikörpervermittelte Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) und Komplementbindung werden diese TNF- $\alpha$ -positiven Zellen effektiv zerstört (Scallon 1995, S. 254). Führt also Bestrahlung von kritischen Zellen des Nierengewebes zur Expression von transmembranalem TNF- $\alpha$ , so könnte daraus nach Bindung von Infliximab eine für die Zellen tödliche Immunreaktion resultieren, die sich, wie in der vorliegenden Untersuchung geschehen, nur auf die Niere als strahlenexponiertes Gewebe beschränken würde. Epithelzellen der Nierentubuli exprimieren in vitro nach Stimulation durch LPS oder IL-1 $\alpha$  auf ihrer Zelloberfläche tatsächlich TNF- $\alpha$ , sie sezernieren es auch, sowohl in vitro, als auch in vivo bei C3H-Mäusen, die mit LPS behandelt wurden (Jevnikar 1991, S. 207). Fraglich ist jedoch einerseits, ob auch ionisierende Strahlung einen Stimulus zur Expression von membranständigem TNF- $\alpha$  darstellt, andererseits, ob die mögliche Immunreaktion zu einer progressiven Nierenfunktionsverschlechterung führen würde, wie sie bei den für

diese Arbeit durchgeführten Versuchen zu sehen war. Die Behandlungszeit mit dem Zytokin war relativ kurz. Die folgende Immunreaktion mag selbstlimitierend ablaufen.

#### **4.5.3. Konsequenzen für die Strahlentherapie bei Patienten unter Behandlung mit Infliximab**

Letztlich ist noch nicht vollkommen klar, welchen Einfluss der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  auf die Vorgänge im komplexen Gefüge von Strahlenschaden und Reparaturmechanismen ausübt. Ist seine Rolle in der des Radioprotektors oder doch eher in der des Radiosensitizers zu sehen? Abhängig von den jeweiligen Bedingungen, vom Zusammenspiel mit anderen Zytokinen etwa, scheint er beide Rollen auszufüllen. Diese Bedingungen müssen jedoch noch geklärt werden. Ein besonderes Augenmerk muss deshalb auf Patienten gerichtet werden, die unter laufender Behandlung mit Infliximab einer Strahlentherapie unterzogen werden sollen. Die vorliegende Untersuchung bezieht sich natürlich lediglich auf die Niere. Leider konnte hier keinerlei radioprotektive Wirkung des TNF- $\alpha$ -Inhibitors festgestellt werden, sondern vielmehr eine deutliche Verschlechterung der Nierenfunktion. Die deletäre Wirkung der Substanz in Kombination mit ionisierender Strahlung blieb dabei auf das Nierengewebe beschränkt.

Im klinischen Alltag findet der TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab in immer stärkerem Maße Anwendung, nicht nur bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, sondern auch in der Krebstherapie. Immer häufiger werden deshalb Strahlentherapeuten mit entsprechend vorbehandelten Patienten konfrontiert sein. Mit wachsender Erfahrung im Umgang mit den offensichtlich recht potenten TNF- $\alpha$ -Inhibitoren werden sich möglicherweise auch immer mehr unerwünschte Wirkungen der Therapie zeigen.

## **4.6. Methodenkritik**

### **4.6.1. Verlaufsbeobachtung**

Die Analyse von Verlaufskurven wirft statistische Probleme auf. Der Vergleich zu jedem einzelnen Messzeitpunkt liefert im Grunde keine völlig korrekten Ergebnisse. Als Kenngröße zur Analyse dient im vorliegenden Fall der am Endpunkt der Untersuchungen gemessene Wert zur Funktion der rechten Niere. Er ist als Maximalwert zum zuvor bestimmten Endzeitpunkt bei wie erwartet kontinuierlich ansteigenden Kurven gut verwertbar. Möglich wäre jedoch auch der Vergleich der Flächen unter den einzelnen Kurven, um diese in ihrem Gesamtverlauf besser zu erfassen.

### **4.6.2. Fallzahl**

Bei kleinen Fallzahlen nehmen Ausreißer besonders großen Einfluss auf das Endergebnis. Durch Todesfälle bei den mit 10 Gy bestrahlten Tieren verkleinerten sich die Gruppen noch zusätzlich. In der Verlaufsbeobachtung nimmt dadurch die Ungenauigkeit der Ergebnisse zum Endpunkt der Untersuchungen hin zu.

### **4.6.3. Bestrahlung**

Todesfälle traten lediglich bei mit 10 Gy bestrahlten Tieren auf. Diese waren vermutlich durch gastrointestinale Komplikationen bedingt. Gleichzeitig waren die Veränderungen der Nierenfunktion bei Tieren, die mit niedrigeren Strahlendosen behandelt worden waren nur sehr diskret. Eine mit der hier angewandten szintigraphischen Methode deutlich detektierbare Verschlechterung der Nierenfunktion ist erst ab Dosen zwischen 8 und 10 Gy zu erwarten.

Wünschenswert wäre in diesem Zusammenhang folglich die Bestrahlung der Niere mit Dosen von mindestens 8 Gy, jedoch ohne eine Steigerung der Mortalität durch gastrointestinale Komplikationen in Bereichen höherer Strahlendosen.

Dieses Ziel ist nicht ganz problemlos zu erreichen, ohne das Setting des Experiments grundlegend zu verändern. Die hier angewandte Methode basiert auf der statischen Nierenszintigraphie und darauf, dass die Funktion der geschädigten Niere zu der Gesamtfunktion beider Nieren ins Verhältnis gesetzt wird. Dies macht die Messung unabhängig von schwankenden Größen wie etwa der Aktivität des  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-

Präparates, der verabreichten Substanzmenge bei paravasaler Injektion, der Zeitdauer zwischen Injektion und Aufnahme, sowie der Harnausscheidungsrate des Versuchstieres. Voraussetzung ist jedoch, dass nur eine Niere bestrahlt und geschädigt wird.

Die Bestrahlung einer Niere ließ sich durch den dorsoanterioren Strahlengang und zusätzliche Abschirmung der anderen Niere realisieren. Eine Affektion des Intestinums konnte dabei jedoch nicht ganz verhindert werden.

Liao et al. bestrahlten beide Nieren zugleich tangential von lateral. Sie konstruierten spezielle Käfige, bei denen das Abdomen der Maus durch eine Öffnung im Käfigboden aus dem Strahlenfeld herausfiel (Liao 1994, S. 291). Zur Beurteilung der Nierenfunktion untersuchten sie aus der Schwanzvene gewonnene Blutproben auf Harnstoff und Hämatokrit.

Stewart et al. bestrahlten ebenfalls beide Nieren zugleich über zwei laterale, tangentielle Felder. Die Nierenfunktion wurde über die indirekte Clearance von  $^{51}\text{CrEDTA}$  bestimmt. Dazu wurden nach einmaliger intraperitonealer Injektion der radioaktiven Substanz Blutproben aus dem Retroorbitalplexus der Mäuse genommen und die Abnahme der Plasmakonzentration von  $^{51}\text{CrEDTA}$  gemessen.

Eleganter als meist schwierig zu bewerkstelligende und für die Tiere belastende Blutentnahmen ist sicher die in dieser Arbeit verwendete szintigraphische Methode zur Bestimmung der Nierenfunktion, die jedoch bei beidseitiger Nierenbestrahlung nicht mehr sinnvoll anwendbar ist.

#### **4.7. Fazit und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass Bestrahlung in Kombination mit der Gabe von Erythropoietin bzw. des TNF- $\alpha$ -Inhibitors Infliximab an der Niere eine irreversible und progrediente Schädigung hervorruft, die sich als ausgeprägter erwies als unter alleiniger Bestrahlung. Die Verschlechterung der Nierenfunktion fiel unter Behandlung mit Infliximab deutlicher aus als bei Verabreichung von Erythropoietin. Das Resultat überrascht insofern, als den beiden Wachstumsfaktoren bisher vor allem gewebeprotective Eigenschaften zugeschrieben worden waren.

Die Mechanismen, die zu diesen Ergebnissen führten, wurden in diesem Projekt nicht untersucht. Sie sind bis heute noch nicht geklärt. Bereits seit Jahrzehnten bekannt und in großer Fülle vorhanden sind Untersuchungen zu histologischen Befunden der Strahlenneuropathie. Dagegen existieren viele widersprüchliche Angaben zu den beteiligten Botenstoffen. Bei besserem Verständnis der Vorgänge bei Bestrahlung der Niere auf Proteinebene könnten potentiell radioprotective Substanzen gezielter ausgewählt werden. Vorteilhaft dabei ist, dass die Entwicklung der Strahlenneuropathie bei unterschiedlichen Spezies in weitgehend derselben Art und Weise abzulaufen scheint.

Im Falle des Wachstumsfaktors Erythropoietin bieten sich Untersuchungen sowohl zur thrombogenen Aktivität als auch zum Einfluss der Substanz auf den Zellzyklus an. Im Rahmen der Strahlenneuropathie wurden bei Tierversuchen Mikrothrombosen der Nierenkapillaren nachgewiesen. Treten diese unter Behandlung mit Erythropoietin vermehrt auf? Es konnte gezeigt werden, dass Erythropoietin zu Zellproliferation führt. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dieser Proliferation und einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit der Zellen?

Den TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab betreffend sind Fortschritte möglicherweise durch weitere immunhistochemische Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung zu erwarten. Widersprüche gibt es hier besonders bei der Bewertung der Rolle des Tumornekrosefaktors  $\alpha$ . Einerseits wurde ein radioprotectiver Effekt des Zytokins gefunden, andererseits jedoch auch eine radiosensibilisierende Wirkung. Wichtig zu klären wäre die Frage, ob TNF- $\alpha$  nach Bestrahlung im Nierengewebe vermehrt exprimiert wird.

Weitere Antworten finden sich vermutlich in der äußerst komplexen und bisher nur unzureichend geklärten Pathogenese der Strahlenneuropathie.

## 5. Zusammenfassung

Die niedrige Strahlentoleranz der Niere führt bei der Planung und adäquaten Durchführung abdomineller Bestrahlungen zu Problemen. Mit einer Latenz von einigen Monaten droht die Entwicklung der sogenannten Strahlennephropathie mit allen Zeichen der Niereninsuffizienz bis hin zur Dialysepflichtigkeit.

Eine Prävention der Strahlennephropathie durch chemische Radioprotektoren stellt eine interessante Option dar, ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob mit Hilfe von Erythropoietin bzw. Infliximab eine Verbesserung der Nierenfunktion erreicht bzw. einer Niereninsuffizienz vorgebeugt werden könnte.

Weibliche C3H-Mäuse wurden einer einzeitigen Bestrahlung der rechten Niere mit Strahlendosen von 6, 8 und 10 Gy unterzogen. Um den Bestrahlungszeitpunkt herum wurde den Tieren Erythropoietin in zwei unterschiedlichen Dosen bzw. Infliximab verabreicht. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich bestrahlt. Die Bestimmung der Nierenfunktion erfolgte durch statische Nierenszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA. Die Nachbeobachtungszeit betrug ab Bestrahlung insgesamt 50 Wochen. Bei den mit Erythropoietin behandelten Tieren wurde zum Endpunkt der Untersuchung zusätzlich eine Blutentnahme mit Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff und Hämatokrit durchgeführt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fiel die Verschlechterung der Nierenfunktion bei den mit Erythropoietin bzw. Infliximab behandelten Tieren deutlicher aus. Je höher die gewählte Strahlendosis und je größer der zeitliche Abstand zur Bestrahlung, desto geringer wurde der Anteil der rechten Niere an der Gesamtfunktion beider Nieren. Die höhere Dosis von Erythropoietin bewirkte zudem eine stärkere Abnahme der Nierenfunktion als die niedrigere Dosis. Bei den mit Infliximab behandelten Tieren war die Niereninsuffizienz schließlich am stärksten ausgeprägt.

Ein radioprotektiver Effekt konnte hier weder für Erythropoietin, noch für Infliximab gezeigt werden. Den Hinweisen auf deletäre Wirkungen auf die Nierenfunktion unter Bestrahlung sollte wegen möglicher Konsequenzen für die Patientenbehandlung weiter nachgegangen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Al-Lamki, R. S.**, Wang, J., Skepper, J. N., Thiru, S., Pober, J. S., Bradley, J. R.  
Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants.  
Lab. Invest. 81 (2001) 1503 – 1515
- Anagnostou, A.**, Lee, E. S., Kessimian, N., Levinson, R., Steiner, M.  
Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 5978 – 5982
- Bagnis, C.**, Beaufils, H., Jacquiaud, C., Adabra, Y., Jouanneau, C., Le Nahour, G., Jaudon, M. C., Bourbouze, R., Jacobs, C., Deray, G.  
Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat.  
Nephrol. Dial. Transplant. 16 (2001) 932 – 938
- Baud, L.**, Oudinet, J.-P., Bens, M., Noe, L., Peraldi, M.-N., Rondeau, E., Etienne, J., Ardaillou, R.  
Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide.  
Kidney Int. 35 (1989) 1111 – 1118
- Beutler, B.**, Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y.-C.-E., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A.  
Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin.  
Nature 316 (1985) 552
- Bevilacqua, M. P.**, Pober, J. S., Majeau, G. R., Fiers, W., Cotran, R. S., Gimbrone, M. A. Jr.  
Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: Characterization and comparison with the actions of interleukin 1  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 4533 – 4537
- Bohle, A.**, Mackensen-Haen, S., von Gise, H., Grund, K. E., Wehrmann, M., Batz, C., Bogenschütz, O., Schmitt, H., Nagy, J., Müller, C., Müller, G.  
The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies.  
Pathol. Res. Pract. 186 (1990) 135 – 144
- Bohlius, J.**, Wilson, J., Seidenfeld, J., Piper, M., Schwarzer, G., Sandercock, J., Trelle, S., Weingart, O., Bayliss, S., Djulbegovic, B., Bennet, C. L., Langensiepen, S., Hyde, C., Engert, A.  
Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients.  
J. Natl. Cancer Inst. 98 (2006) 708 – 714
- Boswell, J. M.**, Yui, M. A., Burt, D. E., Kelley, V. E.  
Increased tumor necrosis factor and IL-1 beta gene expression in the kidneys of mice with lupus nephritis.  
J Immunol 141 (1988) 3050 – 3054
- Brandau, W.**, Becker, W., Meyer, G.-J.  
Radiochemie.  
In: „Nuklearmedizin“,  
Büll, U., Schicha, H., Georg Thieme Verlag,  
Stuttgart-New York, 1999, 3. Auflage, 81-82
- Brines, M. L.**, Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N. C., Cerami, C., Itri, L. M., Cerami, A.  
Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 10526 – 10531
- Buemi, M.**, Vaccaro, M., Sturiale, A., Galeano, M. R., Sansotta, C., Cavallari, V., Floccari, F., D'Amico, D., Torre, V., Calapai, G., Frisina, N., Guarneri, F., Vermiglio, G.  
Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps.

Acta Derm. Venerol. 82 (2002) 411 – 417

**Calvillo, L.**, Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., Brines, M.  
Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury  
and promotes beneficial remodeling.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 4802 - 4806

**Carswell, E. A.**, Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B.  
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 3666

**Chung, I. Y.**, Benveniste, E. N.  
Tumor necrosis factor- $\alpha$  production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN- $\gamma$  and  
IL-1 $\beta$ .  
J. Immunol. 144 (1990) 2999 – 3007

**Cohen, E. P.**, Moulder, J. E., Fish, B. L., Hill, P.  
Prophylaxis of experimental bone marrow transplant nephropathy.  
J. Lab. Clin. Med. 124 (1994) 371 – 380

**Cohen, E. P.**, Moulder, J. E., Robbins, M. E. C.  
Radiation nephropathy caused by yttrium 90.  
Lancet 358 (2001) 1102 – 1103

**Cohen, E. P.**, Robbins M. E. C.  
Radiation Nephropathy.  
Sem. In Nephrol. 23 (2003) 486 – 499

**Coley, W. B.**  
The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas; with a report of ten  
original cases.  
Am. J. Med. Sci. 105 (1893) 487

**Crummy, A. B.**, Hellman, S., Stansel, H. C., Hukill, P. B.  
Renal hypertension secondary to unilateral radiation damage relieved by nephrectomy.  
Radiology 84 (1965) 108 – 111

**De Bandt, M.**, Sibilia, J., Le Loët, X., Prouzeau, S., Fautrel, B., Marcelli, C., Boucquillard, E., Siame,  
J. L., Mariette, X.  
Systemic lupus erythematosus induced by anti-tumour necrosis factor alpha therapy: a French  
national survey.  
Arthr. Res. Ther. 7 (2005) R545 – R551

**Djeu, J. Y.**, Serbousek, D., Blanchard, D. K.  
Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes.  
Blood 76 (1990) 1405 – 1409

**Dubravec, D. B.**, Spriggs, D. R., Mannick, J. A., Rodrick, M. L.  
Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis fac-  
tor  $\alpha$ .  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 6758 – 6761

**Duchesne, G. M.**, Stenning, S. P., Aass, N., Mead, G. M., Fosså, S. D., Oliver, R. T., Horwich, A.,  
Read, G., Roberts, I. T., Rustin, G., Cullen, M. H., Kaye, S. B., Harland, S. J., Cook, P. A.  
Radiotherapy after chemotherapy for metastatic carcinoma – a diminishing role.  
Eur. J. Cancer 33 (1997) 829 – 835

**Echigoya, M. H.**, Obikane, K., Nakashima, T., Sasaki, S.  
Glomerular localization of erythropoietin receptor mRNA and protein in neonatal and mature  
mouse kidney.  
Nephron Exp. Nephrol. 100 (2005) e21 – e29

**Eck, M. J.**, Sprang, S. R.

- The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6 Å resolution.  
J. Biol. Chem. 264 (1989) 17595 – 17605
- Eck, M. J.**, Ultsch, M., Rinderknecht, E., de Vos A. M., Sprang, S. R.  
The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor- $\beta$ ) at 1.9-Å resolution.  
J. Biol. Chem. 267 (1992) 2119 – 2122
- Eckardt, K.-U.**, Koury, S. T., Tan, C. C., Schuster, S. J., Kaissling, B., Ratcliffe, P. J., Kurtz, A.  
Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia.  
Kidney Int. 43 (1993) 815 – 823
- Eissner, G.**, Kohlhuber, F., Grell, M., Ueffing, M., Scheurich, P., Hieke, A., Multhoff, G., Bornkamm, G. W., Holler, E.  
Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor- $\alpha$  in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin.  
Blood 86 (1995) 4184 - 4193
- Emami, B.**, Lymna, J., Brown, A., Coia, L., Goitein, M., Munzenrider, J. E., Shank, B., Solin, L. J., Wesson, M.  
Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation.  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 21 (1991) 109 – 122
- Erbayraktar, S.**, de Lanerolle, N., de Lotbinière, A., Knisely, J. P. S., Erbayraktar, Z., Yilmaz, O., Cerami, A., Coleman, T. R., Brines, M.  
Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically induced brain injury.  
Mol. Med. 12 (2006) 74 – 80
- Glatstein, E.**, Fajardo, L. F., Brown, J. M.  
Radiation Injury in the mouse kidney – a sequential light microscopic study.  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2 (1977) 933 – 943
- Gómez-Reino, J. J.**, Carmona, L., Valverde, V. R., Mola, E. M., Montero, M. D.  
Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk.  
Arthr. Rheum. 48 (2003) 2122 – 2127
- Gordon, J. R.**, Galli, S. J.  
Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin.  
Nature 346 (1990) 274 – 276
- Gray, P. W.**, Aggarwal, B. B., Benton, C. V., Bringman, T. S., Henzel, W. J., Jarrett, J. A., Leung, D. W., Moffat, B., Ng, P., Svedersky, L. P., Palladino, M. A., Nedwin, G. E.  
Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity.  
Nature 312 (1984) 721 – 724
- Hallahan, D. E.**, Spriggs, D. R., Beckett, M. A., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R.  
Increased tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA after cellular exposure to ionizing radiation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10104 – 10107
- Henke, M.**, Laszig, R., Rube, C., Schäfer, U., Haase, K.-D., Schilcher, B., Mose, S., Beer, K. T., Burger, U., Dougherty, C., Frommhold, H.  
Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial.  
Lancet 362 (2003) 1255 – 1260
- Hulbert, W. C.**, Ettinger, L. J., Wood, B. P., Anderson, V. M., Putnam, T. C., Rabinowitz, R.  
Hyperreninemic hypertension secondary to radiation nephritis in a child.  
Urology 26 (1985) 153 – 156
- Jaenke, R. S.**, Robbins, M. E. C., Bywaters, T., Whitehouse, E., Rezvani, M., Hopewell, J. W.  
Capillary endothelium – Target site of renal radiation injury.  
Lab. Invest. 68 (1993) 396 – 405

- Jevnikar, A. M.**, Brennan, D. C., Singer, G. G., Heng, J. E., Maslinski, W., Wuthrich, R. P., Glimcher, L. H., Rubin Kelley, V. E.  
Stimulated kidney tubular epithelial cells express membrane associated and secreted TNF $\alpha$ .  
Kidney Int. 40 (1991) 203 – 211
- Kawamura, J.**, Hitoshi, I., Yoshida, O., Fujita, T., Torizuka, K.  
In vivo estimation of renal volume using a rotating gamma camera for 99mTc-dimercaptosuccinic acid renal imaging.  
Eur. J. Nucl. Med. 9 (1984) 168 – 172
- Khorana, A. A.**, Francis, C. W., Culakova, E., Lyman, G. H.  
Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study.  
Cancer 104 (2005) 2822 – 2829
- Köck, A.**, Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., Luger, T. A.  
Human keratinocytes are a source of tumor necrosis factor  $\alpha$ : evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light.  
J. Exp. Med. 172 (1990) 1609 – 1614
- Kunkler, P. B.**, Farr, R. F., Luxton, R. W.  
The limit of renal tolerance to x-rays.  
Br. J. Radiol. 25 (1952) 190 – 201
- Lee, S. H.**, Li, C., Lim, S. W., Ahn, K. O., Choi, B. S., Kim, Y. S., Moon, I. S., Kim, J., Bang, B. K., Yang, C. W.  
Attenuation of interstitial inflammation and fibrosis by recombinant human erythropoietin in chronic cyclosporine nephropathy.  
Am. J. Nephrol. 25 (2005) 64 – 76
- Leist, M.**, Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen, J., Gerwien, J., Kallunki, P., Larsen, A. K., Helboe, L., Christensen, S., Pedersen, L. O., Nielsen, M., Torup, L., Sager, T., Sfacteria, A., Erbayraktar, S., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., Yilmaz, O., Cerami-Hand, C., Xie, Qiao-wen, Coleman, T., Cerami, A., Brines, M.  
Derivates of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic.  
Science 305 (2004) 239 – 242
- Le Hir, M.**, Eckardt, K.-U., Kaissling, B., Koury, S. T., Kurtz, A.  
Structure-function correlations in erythropoietin formation and oxygen sensing in the kidney.  
Klin. Wochenschr. 69 (1991) 567 – 575
- Leyland-Jones, B.**, BEST Investigators and Study Group  
Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly.  
Lancet Oncol. 4 (2003) 459 – 460
- Liao, Z. X.**, Travis, E. L.  
Unilateral nephrectomy 24 hours after bilateral kidney irradiation reduces damage to the function and structure of the remaining kidney.  
Radiat. Res. 139 (1994) 290 - 299
- Lovett, D. H.**, Hänsch, G. M., Goppelt, M., Resch, K., Gemsa, D.  
Activation of glomerular mesangial cells by the terminal membrane attack complex of complement.  
J. Immunol. 138 (1987) 2473 – 2480
- Lovett, D. H.**, Larsen, A.  
Cell cycle-dependent interleukin 1 gene expression by cultured glomerular mesangial cells.  
J. Clin. Invest. 82 (1988) 115 – 122
- Luxton, R. W.**  
Radiation nephritis.  
Q. J. Med. 22 (1953) 215 – 242

**Luxton, R. W.**

Radiation nephritis. A long-term study of 54 patients.  
Lancet 2 (1961) 1221 – 1224

**Mallinckrodt Medical Katalog Nr.: DRN 4341**

TechneScan® DMSA Germany, Gebrauchsinformation und Fachinformation

**Meßmer, U. K., Briner, V. A., Pfeilschifter, J.**

Tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells.  
Kidney Int. 55 (1999) 2322 – 2337

**Moon, C., Krawczyk, M., Ahn, D., Ahmet, I., Paik, D., Lakatta, E. G., Talan, M. I.**

Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 11612 – 11617

**Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P.**

Impact of angiotensin II type 2 receptor blockade on experimental radiation nephropathy.  
Radiat. Res. 161 (2004) 312 – 317

**Nash, P. T., Florin, T. H. J.**

Tumour necrosis factor inhibitors.  
MJA 183 (2005) 205 – 208

**Neta, R., Oppenheim, J. J., Schreiber, R. D., Chizzonite, R., Ledney, G. D., MacVittie, T. J.**

Role of cytokines (interleukin 1, tumor necrosis factor and transforming growth factor  $\beta$ ) in natural and lipopolysaccharide-enhanced radioresistance.  
J. Exp. Med. 173 (1991) 1177 – 1182

**Nieder, C., Price, R. E., Rivera, B., Andratschke, N., Ang, K. K.**

Experimental data for insulin-like growth factor-1 and basic fibroblast growth factor in prevention of radiation myelopathy.  
Strahlenther. Onkol. 178 (2002) 147 – 152

**O'Malley, E. W., Achinstein, B., Shear, M. J.**

Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide and induced tolerance.  
JNCI 29 (1962) 1169

**Otsuka, M., Meistrich, M. L.**

Cell proliferation and abnormal nuclei induced by radiation in renal tubule epithelium as an early manifestation of late damage.  
Radiat. Res. 123 (1990) 285 – 291

**Otsuka, M., Meistrich, M. L.**

Radiation-induced proliferation in contralateral unirradiated kidneys.  
Radiat. Res. 134 (1993) 247 – 250

**Patel, N. S. A., Sharples, E. J., Cuzzocrea, S., Chatterjee, P. K., Britti, D., Yaqoob, M. M., Thiemermann, C.**

Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo.  
Kidney Int. 66 (2004) 983 – 989

**Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., Goeddel, D. V.**

Human tumour necrosis factor – precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.  
Nature 312 (1984) 724 – 729

**Petrides, P. E.**

Blut.

- In: „Biochemie und Pathobiochemie“,  
Löffler, G., Petrides, P. E., Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 1997, 5. Auflage,  
879 – 947
- Pichler, W. J.**, Peter, H.-H.  
Immunsystem.  
In: „Klinische Pathophysiologie“  
Siegenthaler, W. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 2001, 8. Auflage, 487 –  
562
- Piguet, P. F.**, Grau, F. E., Vassalli, P.  
Subcutaneous perfusion of tumor necrosis factor induces local proliferation of fibroblasts, cap-  
illaries and epidermal cells or massive tissue necrosis.  
Am. J. Pathol. 136 (1990) 103 – 110
- Pohlman, T. H.**, Stanness, K. A., Beatty, P. G., Ochs, H. D., Harlan, J. M.  
An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1 and  
tumor necrosis factor-  $\alpha$  increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism.  
J. Immunol. 136 (1986) 4548 – 4553
- Robaye, B.**, Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J. E., Galand, P.  
Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in  
vitro.  
Am. J. Pathol. 138 (1991) 447 – 453
- Robbins, M. E. C.**, Soranson, J. A., Wilson, G. D., Bywaters, T., Rezvani, M., Golding, S. J., Morris,  
G. M., Whitehouse, E., Hopewell, J. W.  
Radiation-induced changes in the kinetics of glomerular and tubular cells in the pig kidney.  
Radiat. Res. 138 (1994) 107 – 113
- Robbins, M. E. C.**, O'Malley Y., Zhao, W., Davis, C. S., Bonsib, S. M.  
The role of the tubulointerstitium in radiation-induced renal fibrosis.  
Radiat. Res. 155 (2001) 481 – 489
- Rubin, B. Y.**, Anderson, S. L., Sullivan, S. A., Williamson, B. D., Carswell, E. A., Old, L. J.  
Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis  
factor.  
J. Exp. Med. 164 (1986) 1350 – 1355
- Rübe, C. E.**, Wilfert, F., Palm, J., König, J., Burdak-Rothkamm, S., Liu, L., Schuck, A., Willich, N., Rübe,  
C.  
Irradiation induces a biphasic expression of pro-inflammatory cytokines in the lung.  
Strahlenther. Onkol. 7 (2004) 442 - 448
- Santucci, M. A.**, Pierce, J. H., Zannini, S., Fortuna, A., Frezza, G., Babini, L., Rosenstein, M. M.,  
Greenberger, J. S.  
Erythropoietin increases the radioresistance of a clonal hematopoietic progenitor cell line ex-  
pressing a transgene for the erythropoietic receptor.  
Stem Cells 12 (1994) 506 – 513
- Sawada, M.**, Kondo, N., Suzumura, A., Marunouchi, T.  
Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by microglia and astrocytes in culture.  
Brain Res. 491 (1989) 394 – 397
- Scallon, B. J.**, Moore, M. A., Trinh, H., Knight, D. M., Ghayeb, J.  
Chimeric anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF- $\alpha$  and  
activates immune effector functions.  
Cytokine 7 (1995) 251 – 259
- Schicha, H.**, Schober, O.  
Radiopharmazeutische Chemie, Konventionelle Radionuklide.  
In: „Nuklearmedizin, Basiswissen und klinische Anwendung“,

Schicha, H., Schober, O., Schattauer-Verlagsges., Stuttgart – NewYork, 2003, 5. Auflage, 20 – 54

**Senzer, N.**

Rationale for a phase III study of erythropoietin as a neurocognitive protectant in patients with lung cancer receiving prophylactic cranial irradiation.  
Sem. Oncol. 29 (2002) 47 – 52

**Shalaby, M. R.**, Aggarwal, B. B., Rinderknecht, E., Svedersky, L. P., Finkle, B. S., Palladino, M. R., Jr.  
Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor.  
J. Immunol. 135 (1985) 2069 – 2073

**Sharma, M.**, Sharma, R., Ge, X. L., Fish B. L., McCarthy, E. T., Savin, V. J., Cohen, E. P., Moulder, J. E.  
Early detection of radiation-induced glomerular injury by albumin permeability assay.  
Radiat. Res. 155 (2001) 474-480

**Sharples, E. J.**, Patel, N., Brown, P., Stewart, K., Mota-Philippe, H., Sheaff, M., Kieswich, J., Allen, D., Harwood, S., Raftery, M., Thiemermann, C., Yaqoob, M. M.  
Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion.  
J. Am. Soc. Nephrol. 15 (2004) 2115 – 2124

**Shear, M. J.**, Turner, F. C., Perrault, A., Shovelton, T.  
Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrates.  
J. Nat. Cancer Inst. 4 (1943) 81 – 97

**Shear, M. J.**

Chemical treatment of tumors. IX. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide.  
J. Nat. Cancer Inst. 4 (1944) 461 – 476

**Sherman, M. L.**, Datta, R., Hallahan, D. E., Weichselbaum, R. R., Kufe, D. W.  
Regulation of tumor necrosis factor gene expression by ionizing radiation in human myeloid leukemia cells and peripheral blood monocytes.  
J. Clin. Invest. 87 (1991) 1794 – 1797

**Sinclair, W. K.**, Morton, R. A.

X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured chinese hamster cells.  
Radiat. Res. 29 (1966) 450 - 474

**Sirén, A.-L.**, Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., Capobianco, A., Mennini, T., Heumann, R., Cerami, A., Ehrenreich, H., Ghezzi, P.  
Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 4044 – 4049

**Socher, S. H.**, Martinez, D., Carig, J. B., Kuhn, J. G., Oliff, A.

Tumor necrosis factor not detectable in patients with clinical cancer cachexia.  
J. Natl. Cancer Inst. 80 (1988) 595 – 598

**Spriggs, D. R.**, Imamura, K., Rodriguez, C., Sariban, E., Kufe, D. W.

Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines.  
J. Clin. Invest. 81 (1988) 455 – 460

**Stahl, R. A. K.**

Niere und ableitende Harnwege.

In: „Klinische Pathophysiologie“

Siegenthaler, W. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 2001, 8. Auflage, 905 – 973

- Steffen, M.**, Ottmann, O., Moore, M.  
Simultaneous production of tumor necrosis factor- $\alpha$  and lymphotoxin by normal T cells after induction with IL-2 and anti-T3.  
*J. Immunol.* 140 (1988) 2621 – 2624
- Stevens, G.**, Joiner, B., Johns, H., Denekamp, J.  
Early detection of damage following bilateral renal irradiation in the mouse.  
*Radiother. Oncol.* 20 (1991) 124 - 131
- Stewart, F. A.**, Lebesque, J. V., Hart, A. A. M.  
Progressive development of radiation damage in mouse kidneys and the consequences for reirradiation tolerance.  
*Int. J. Radiat. Biol.* 53 (1988) 405 – 415
- Stewart, F. A.**, Luts, A., Lebesque, J. V.  
The lack of long-term recovery and reirradiation tolerance in the mouse kidney.  
*Int. J. Radiat. Biol.* 56 (1989) 449 – 462
- Stewart, F. A.**, Oussoren, Y.  
Re-irradiation of mouse kidneys: a comparison of re-treatment tolerance after single and fractionated partial tolerance doses.  
*Int. J. Radiat. Biol.* 58 (1990) 531 – 544
- Stewart, F. A.**, Oussoren, Y., van Tinteren, H., Bentzen, S. M.  
Loss of reirradiation tolerance in the kidney with increasing time after single or fractionated partial tolerance doses.  
*Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1994) 169 – 179
- Stewart, F. A.**  
Radiation nephropathy after abdominal irradiation or total-body irradiation.  
*Radiat. Res.* 143 (1995) 235 – 237
- Stewart, F. A.**, Te Poele, J. A. M., Van der Wal, A. F., Oussoren, Y. G., Van Kleef, E. M., Kuin, A., Verheij, M., Dewit, L. G. H.  
The link between functional damage and vascular mediated inflammatory and thrombotic changes.  
*Acta Oncologica* 40 (2001) 952 – 957
- Stohlawetz, P.**, Dzirlo, L., Hergovich, N., Lackner, E., Mensik, C., Eichler, H. G., Kabma, E., Geissler, K., Jilma, B.  
Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans.  
*Blood* 95 (2000) 2983 – 2989
- Taylor, A.**, Kipper, M., Witztum, K.  
Calculation of relative glomerular filtration rate and correlation with delayed technetium-99m DMSA imaging.  
*Clin. Nucl. Med.* 11 (1986) 28 – 31
- Torrise, J. R.**, Dritschilo, A., Harter, K. W., Helfrich, B., Berg, C. D., Whitfield, G., Stablein, D., Alijani, M.  
A randomized study of the efficacy of adjuvant local graft irradiation following renal transplantation.  
*Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 18 (1990) 1027 – 1031
- Urbascsek, R.**, Mannel, D. N., Urbascsek, B.  
Tumor necrosis factor induced stimulation of granulopoiesis and radioprotection.  
*Lymphokine Res.* 6 (1987) 179 – 186
- Vassalli, P.**  
The pathophysiology of tumor necrosis factor.  
*Annu. Rev. Immunol.* 10 (1992) 411 – 452
- Vesey, D. A.**, Cheung, C., Pat, B., Endre, Z., Gobé, G., Johnson, D. W.

- Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury.  
Nephrol. Dial. Transplant. 19 (2004) 348 – 355
- Vielhauer, V.**, Stavrakis, G., Mayadas, T. N.  
Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis.  
J. Clin. Invest. 115 (2005) 1199 - 1209
- Warner, S. J. C.**, Libby, P.  
Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor.  
J. Immunol. 142 (1989) 100 – 109
- Weichselbaum, R. R.**, Kufe, D. W., Hellman, S., Rasmussen, H. S., Richter-King, C., Fischer, P. H., Mauceri, H. J.  
Radiation-induced tumour necrosis factor- $\alpha$  expression: clinical application of transcriptional and physical targeting of gene therapy.  
Lancet Oncol. 3 (2002) 665 – 671
- Weiss, Ch.**, Jelkmann, W.  
Funktionen des Blutes.  
In: „Physiologie des Menschen“,  
Schmidt, R. F., Thews, G., Lang, F. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 2000, 28. Auflage, 411 – 447
- Westenfelder, C.**, Biddle, D. L., Baranowski, R. L.  
Human, rat and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors.  
Kidney Int. 55 (1999) 808 – 820
- Westenfelder, C.**  
Unexpected renal actions of erythropoietin.  
Exp. Nephrol. 10 (2002) 294 – 298
- White, D. C.**  
The histo-pathologic basis for functional decrements in late radiation injury in diverse organs.  
Cancer 37 (1976) 1126 – 1143
- Wong, G. H.**, Goeddel, D. V.  
Tumour necrosis factor  $\alpha$  and  $\beta$  inhibit virus replication and synergize with interferons.  
Nature 323 (1986) 819 – 822
- Wong, G. H.**, McHugh, T., Weber, R., Goeddel, D. V.  
Tumor necrosis factor  $\alpha$  selectively sensitizes human immunodeficiency virus-infected cells to heat and radiation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 4372 – 4376
- Wun, T.**, Law, L., Harvey, D., Sieracki, B., Scudder, S. A., Ryu, J. K.  
Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation and erythropoietin.  
Cancer 98 (2003) 1514 – 1520
- Yang, C. W.**, Li, C., Jung, J. Y., Shin, S. J., Choi, B. S., Lim, S. W., Sun, B. K., Kim, Y. S., Kim, J., Chang, Y. S., Bang, B. K.  
Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney.  
FASEB J. 17 (2003) 1754 – 1755
- Yasuda, Y.**, Fujita, Y., Matsuo, T., Koinuma, S., Hara, S., Tazaki, A., Onozaki, M., Hashimoto, M., Musha, T., Ogawa, K., Fujita, H., Nakamura, Y., Shiozaki, H., Utsumi, H.  
Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies.  
Carcinogenesis 24 (2003) 1021 – 1029

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1</i> .....	20
<i>Abbildung 2</i> .....	24
<i>Abbildung 3</i> .....	25
<i>Abbildung 4</i> .....	26
<i>Abbildung 5</i> .....	27
<i>Abbildung 6</i> .....	28
<i>Abbildung 7</i> .....	30
<i>Abbildung 8</i> .....	31
<i>Abbildung 9</i> .....	32
<i>Abbildung 10</i> .....	33
<i>Abbildung 11</i> .....	34
<i>Abbildung 12</i> .....	35
<i>Abbildung 13</i> .....	36
<i>Abbildung 14</i> .....	43
<i>Abbildung 15</i> .....	45
<i>Abbildung 16</i> .....	46
<i>Abbildung 17</i> .....	47
<i>Abbildung 18</i> .....	49
<i>Abbildung 19</i> .....	54
<i>Abbildung 20</i> .....	56
<i>Abbildung 21</i> .....	58
<i>Abbildung 22</i> .....	60
<i>Abbildung 23</i> .....	61
<i>Abbildung 24</i> .....	63
<i>Abbildung 25</i> .....	67
<i>Abbildung 26</i> .....	69
<i>Abbildung 27</i> .....	70
<i>Abbildung 28</i> .....	71
<i>Abbildung 29</i> .....	73
<i>Abbildung 30</i> .....	84
<i>Abbildung 31</i> .....	85

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1</i> .....	7
<i>Tabelle 2</i> .....	21
<i>Tabelle 3</i> .....	22
<i>Tabelle 4</i> .....	37
<i>Tabelle 5</i> .....	44
<i>Tabelle 6</i> .....	49
<i>Tabelle 7</i> .....	50
<i>Tabelle 8</i> .....	52
<i>Tabelle 9</i> .....	55
<i>Tabelle 10</i> .....	57
<i>Tabelle 11</i> .....	59
<i>Tabelle 12</i> .....	61
<i>Tabelle 13</i> .....	63
<i>Tabelle 14</i> .....	64
<i>Tabelle 15</i> .....	64
<i>Tabelle 16</i> .....	68
<i>Tabelle 17</i> .....	71
<i>Tabelle 18</i> .....	78

## 8. Danksagung

Zur Entstehung dieser Doktorarbeit haben einige Menschen beigetragen, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Carsten Nieder, der mir das Thema dieser Doktorarbeit überlassen, sowie die Materialien zur Verfügung gestellt hat. Er war es auch, der mit mir zusammen die Bestrahlungen durchgeführt hat. Darüber hinaus stand er mir bei Fragen stets geduldig Rede und Antwort und hat es verstanden mich immer wieder neu zu motivieren. Gleiches gilt für Herrn Doktor Nikolaus Andratschke. Auch er war für mich zu jeder Zeit ein hilfreicher Ansprechpartner und hat mich außerdem bei den Versuchen mit Erythropoietin und Infliximab mit Rat und Tat unterstützt. Herrn Professor Molls danke ich sehr für die freundliche und völlig unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, nachdem Professor Nieder die Fakultät verlassen hatte.

Meiner Mit-Doktorandin Frau Doktor Lu Cai danke ich für die Einführung in die praktischen Angelegenheiten der Arbeit und den ermutigenden Gedankenaustausch. Den richtigen Umgang mit den Mäusen zeigte mir die Tierärztin Frau Doktor Jeanette Carlsen. Auch ihr gilt dafür und für die guten und netten Gespräche im Labor mein herzlicher Dank.

Die Zubereitung der  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Lösung sowie die Bedienung der Gammakamera lag in den Händen der medizinisch technischen Assistenten der Nuklearmedizinischen Klinik der TU München. Mit einigem Enthusiasmus unterstützt haben mich dabei besonders Frau Constanze Büst und Herr Martin Finke. Vielen Dank!

Recht herzlich bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei den Tierpflegern des Instituts für experimentelle Onkologie am Klinikum rechts der Isar. „Meine Mäuse“ befanden sich bei ihnen stets in den allerbesten Händen.

## 9 Lebenslauf

Name: Andrea Barbara Schnaiter

Adresse: Waldtruderinger Str. 25 a  
81827 München  
Tel.: 089 4392373  
Email: andrea.schnaiter@t-online.de

Geburtsdatum und –ort: 27. April 1982 in München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1988 – 1992 Grundschule München  
1992 – 2001 Ernst-Mach-Gymnasium Haar

Schulabschluss: Abitur im Juni 2001  
allgemeine Hochschulreife (Note 1,0)

Studium: ab WS 2001/02 Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München  
Physikum im Herbst 2003 (Note 2,0)  
ab WS 2003/04 Humanmedizin, Technische Universität München  
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Frühjahr 2008 (Note 1,0)

Aktivitäten während des Studiums: ab WS 2002/03 Mitglied der Anamnesegruppen München  
ab SS 2003 Anamnesegruppen-Tutorin  
SS 2005 bis WS 2005/06 Leitende Tutorin der Anamnesegruppen München  
SS 2003 Histologie-Assistentin im Anatomischen Institut der Universität München bei Prof. Dr. med. U. Welsch

Praktische Tätigkeiten: **Praktika:**

- Juli/August 2001 Pflegepraktikum, Klinikum rechts der Isar der TU München, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie
- August/September 2002 Pflegehelferin, Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen, 3. Med. Abt. - Angiologie, Endokrinologie u. Diabetologie
- März 2002 und Februar 2003 chirurgische Hospitation in der Dr. Erler-Klinik in Nürnberg, Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie bei PD Dr. med. B. Eibl-Eibesfeldt

**Famulaturen:**

- März 2004 Herzchirurgie in der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie am Deutschen Herzzentrum München

- Juli/August 2004 Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
- Februar/März 2005 Allgemeinmedizin in der Praxis von Dr. med. Bruno Schöpfer, Allgemeinarzt in München
- September 2005 Innere Medizin am Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne

**Praktisches Jahr 2006/07:**

- Chirurgie im Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen
- Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum rechts der Isar der TU München
- Innere Medizin am Universitätsspital Basel

Berufliche Tätigkeit:

seit August 2008 Assistenzärztin in der 3. Medizinischen Klinik am Universitätsklinikum Ulm

Doktorarbeit:

"Prävention strahleninduzierter Nierenfunktionsstörungen durch Behandlung mit Erythropoietin und Infliximab im Mausmodell"  
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München  
Betreuer: Prof. Dr. med. C. Nieder (Universität Tromsø), Prof. Dr. med. M. Molls (TU München)

Publikationen:

Schnaiter, A., Cai, L., Andratschke, N., Schill, S., Weber, W. A., Molls, M., Schwaiger, M., Nieder, C. Evaluation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and erythropoietin (EPO) in a model of experimental kidney irradiation (meeting abstract, 27. Deutscher Krebskongress, Berlin, März 2006)

Andratschke, N., Schnaiter, A., Weber, W. A., Cai, L., Schill, S., Wiedenmann, N., Schwaiger, M., Molls, M., Nieder, C. Preclinical evaluation of erythropoietin administration in a model of radiation-induced kidney dysfunction. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. (April 2006)

Nieder, C., Schnaiter, A., Weber, W. A., Schill, S., Andratschke, N., Schwaiger, M., Molls, M. Detrimental effects of an antibody directed against tumor necrosis factor alpha in experimental kidney irradiation. Anticancer Res. (August 2007)