

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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

## **Pharmakologische Beeinflussung von strahleninduzierten Nierenfunktionsstörungen**

**Untersuchung der Effekte von p-Tyrosin und AVE 7688 im Tiermodell**

Friedemann H. Zengerling

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. U. Heemann

Die Dissertation wurde am 22.04.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.03.2010 angenommen.



<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINFÜHRUNG UND LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>2</b>
2.1	Einleitung	2
2.2	Strahlen und ihre Wirkung	4
2.3	Die Strahlenneuropathie	5
2.3.1	Vorkommen	5
2.3.2	Klinisches Erscheinungsbild	6
2.3.3	Histomorphologische Veränderungen	8
2.3.3.1	Histomorphologie der Strahlenneuropathie beim Menschen	8
2.3.3.2	Histomorphologie der Strahlenneuropathie bei der Maus	9
2.3.4	Mediatoren und Mechanismen der Strahlenneuropathie	9
2.4	Bisherige pharmakologische radioprotektive Ansätze	11
2.4.1	Klassische Radioprotektoren	11
2.4.2	Radioprotektoren der Strahlenneuropathie	11
2.4.2.1	ACE-Hemmer	11
2.4.2.2	Angiotensin II - Rezeptorantagonisten	12
2.5	Untersuchte Substanzen	13
2.5.1	P-Tyr (O-phospho-L-tyrosin)	13
2.5.2	AVE 7688	14
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>16</b>
3.1	Versuchstiere	16
3.1.1	Allgemeines	16
3.1.2	Tierhaltung	16
3.1.3	Tierfütterung	16
3.2	Studiendesign	17
3.2.1	Zeitlicher Ablauf	17
3.2.2	Gruppenaufteilung	17
3.2.2.1	Kontrolltiere	18
3.2.2.2	P-Tyr-Tiere	18
3.2.2.3	AVE7688-Tiere	19
3.3	Bestrahlung	20

<b>3.4</b>	<b>Nierenzintigraphie.....</b>	<b>23</b>
3.4.1	<sup>99m</sup> Tc-Technetium-Dimercaptosuccinat ( <sup>99m</sup> Tc-DMSA).....	23
3.4.2	Statische Nierenzintigraphie in der klinischen Anwendung.....	23
3.4.3	Durchführung der Nierenzintigraphie im Tierversuch .....	24
3.4.3.1	<sup>99m</sup> Tc-DMSA-Herstellung .....	24
3.4.3.2	<sup>99m</sup> Tc-DMSA-Applikation .....	24
3.4.3.2.1	Anästhesie.....	24
3.4.3.2.2	Injektion.....	25
3.4.3.3	Nierenzintigraphie-Aufnahme .....	26
3.4.3.3.1	Durchführung.....	26
3.4.3.3.2	Auswertung.....	28
<b>3.5</b>	<b>Statistische Datenanalyse .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Mortalität.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Nierenzintigraphiewerte .....</b>	<b>34</b>
4.2.1	Beurteilung des Therapieerfolges .....	34
4.2.2	Ausgangswerte .....	35
4.2.3	Einschlusskriterien .....	35
4.2.4	Verlaufswerte .....	36
4.2.4.1	Kontrollgruppen .....	36
4.2.4.1.1	Deskriptive Statistik.....	36
4.2.4.1.2	Induktive Statistik .....	37
4.2.4.1.3	Zusammenfassung .....	38
4.2.4.2	P-Tyrosin-Gruppen.....	39
4.2.4.2.1	Deskriptive Statistik.....	39
4.2.4.2.2	Induktive Statistik .....	40
4.2.4.2.3	Zusammenfassung .....	42
4.2.4.3	AVE 7688-Gruppen.....	43
4.2.4.3.1	Deskriptive Statistik.....	43
4.2.4.3.2	Induktive Statistik .....	46
4.2.4.3.3	Zusammenfassung .....	49
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
	Schlussfolgerung.....	58
	Ausblick .....	59
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>60</b>

<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>64</b>



# 1 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AMC	age-matched controls
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
BBI	Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor
d.h.	das heißt
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Gy	Gray
i.p.	intraperitoneal
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NEP	Neutrale Endopeptidase
PAI-1-mRNA	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-messenger-RNA
PTPase	Protein Tyrosin Phosphatase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNR	relative Nierenfunktion rechts
ROI	Region-of-Interest
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
s	Sekunde
sog.	sogenannte
VPI	Vasopeptidase-Inhibitor
z.B.	zum Beispiel

## 2 Einführung und Literaturübersicht

### 2.1 Einleitung

Die Strahlentherapie ist eine medizinische Therapieform, die unter Einsatz ionisierender Strahlung hauptsächlich der Bekämpfung bösartiger Neubildungen dient. Ihre Anfänge liegen im frühen 20. Jahrhundert als sie vornehmlich auf dermatologische und gynäkologische Erkrankungen angewendet wurde. War ihre Anwendung und Durchführung damals empirischer Natur, so brachten die Erkenntnisse aus der strahlenbiologischen und physikalisch-technischen Forschung sowie der Analyse klinischer Beobachtungsstudien in den folgenden Jahrzehnten große Fortschritte. Heute hat die Strahlentherapie neben der chirurgischen Therapie und der Chemotherapie einen festen Platz in der Behandlung zahlreicher onkologischer Erkrankungen. So werden mehr als die Hälfte aller Patienten mit bösartigen Tumoren bestrahlt, ob in kurativem oder palliativem Ansatz, als alleinige Therapie oder in Kombination mit anderen Therapieformen.

Trotz verbesserter Kenntnisse bezüglich Dosierung und Applikation der Strahlung, bleibt die Strahlentherapie neben ihrer wünschenswerten Wirkung auf den Tumor nicht ohne Nebenwirkungen auf umliegende Gewebe und Organe. So stellen unter anderem die Nieren in der strahlentherapeutischen Behandlung von Tumorpatienten ein dosislimitierendes Organ dar. Erhält die Niere eine zu große Dosis, kann es zu einer Strahlennephropathie, d.h. zu einer strahleninduzierten Schädigung der Niere kommen, die zu erheblichen Konsequenzen für den Patienten führen kann. Bei einer konventionellen fraktionierten Bestrahlung liegt die Schwellendosis für die Niere sehr niedrig. Die Toleranzdosis TD 5/5, also die Dosis bei der innerhalb von fünf Jahren in 5 Prozent der behandelten Patienten Komplikationen auftreten, liegt für die Niere mit 23 Gy deutlich niedriger als für andere Organe, wie das Gehirn (ca. 45 Gy) oder die Blase (ca. 65 Gy).

Ein Überschreiten der Schwellendosis kann bei der Planung von intraabdominell oder retroperitoneal gelegenen Tumoren Probleme bereiten. Auf der einen Seite muss die auf den Tumor gerichtete Gesamtdosis hoch genug sein, um eine ausreichend gute Tumorkontrollwahrscheinlichkeit gewährleisten zu können.



Andererseits darf die auf das Nierengewebe applizierte Dosis nicht so hoch sein, dass sie beim Patienten langfristige Schäden an der Niere hinterlässt, welche sich als dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz manifestieren können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erfassung des nierenspezifischen radioprotektiven Potentials von p-Tyrosin und AVE 7688 im Tiermodell.

P-Tyrosin hat sich in vorausgehenden experimentellen Studien als ein wirkungsvoller normalgewebsspezifischer Radioprotektor erwiesen. Diese Untersuchungen ergaben, dass p-Tyrosin in vitro die strahleninduzierte vorzeitige terminale Differenzierung von humanen Fibroblasten signifikant hemmen kann (21). Diese vorzeitige Ausdifferenzierung in adulte Fibrozyten mit hoher biosynthetischer Aktivität ist ein wichtiger pathogenetischer Schritt in der Entwicklung einer Strahlenfibrose. In vivo Versuche an der Maus zeigten eine signifikant reduzierte fibrotische Kontraktur eines bestrahlten Beines unter p-Tyrosin-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (43).

Für AVE 7688 konnte in einer tierexperimentellen Studie ein antifibrogener Effekt an COL4A3 <sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden. Diese Knockout-Mäuse weisen einen Gendefekt auf, der sich ähnlich dem Alportsyndrom beim Menschen als renale Fibrose manifestiert. Gross et al. kommen zu dem Schluss, dass AVE 7688 als wichtige therapeutische Option für die Behandlung chronisch fibrotischer Erkrankungen der Niere dienen könnte (24).

Beide Substanzen haben in Versuchen früherer Arbeitsgruppen einen positiven Effekt in der Pathogenese von fibrosierenden Prozessen gezeigt. Dies macht sie zu attraktiven Kandidaten für eine prophylaktische oder therapeutische Anwendung in der Strahlennephropathie.

## 2.2 Strahlen und ihre Wirkung

Die biologische Wirkung von ionisierenden Strahlen kommt durch lokale Energieübertragung auf das bestrahlte Gewebe zustande. Die Bestrahlung eines Gewebes führt hierbei zu einer Abfolge von Prozessen, die sich einer physikalischen, einer chemischen und einer biologischen Phase zuordnen lassen.

In der physikalischen Phase, die nur etwa  $10^{-18}$  bis  $10^{-12}$  s andauert, kommt es durch die Absorption von Strahlungsenergie im Gewebe zu einer Anregung oder zu einer Ionisation von Molekülen. Bei der Anregung wird ein Elektron auf eine höhere energetische Schale gehoben, bei der Ionisation werden ein oder mehrere Elektronen ausgestoßen, welche wiederum andere Moleküle anregen oder ionisieren können. Zusätzlich freiwerdende Schwingungsenergie wird in Wärme umgewandelt.

Die chemische Phase dauert bis zu  $10^{-3}$  s an, wobei man direkte von indirekten Molekülschäden unterscheidet.

Der direkte Schaden wird durch den strahlungsbedingten Verlust von Bindungselektronen in relevanten Biomolekülen wie z.B. der DNA hervorgerufen. Er führt zur Spaltung und zum Funktionsverlust des Biomoleküls.

Der indirekte Schaden kommt durch eine Reaktionskette zustande, die sich infolge der Anregung und Ionisation von Molekülen, besonders des Wassers, abspielt. Angeregte und insbesondere ionisierte Moleküle neigen zur Dissoziation, wodurch äußerst reaktionsfreudige freie Radikale entstehen. Diese führen zu Folgereaktionen untereinander oder mit anderen zellulären Komponenten. Ist Sauerstoff in ausreichender Menge vorhanden, wird der durch die Radikale verursachte Schaden fixiert. Diese indirekte Form der Zellschädigung macht etwa zwei Drittel des gesamten Strahlenschadens aus. Charakteristisch für die chemische Phase ist der Wettlauf zwischen neutralisierenden Reaktionen, etwa mit Sulfhydryl-Gruppen, die freie Radikale inaktivieren können, und fixierenden Reaktionen, die zu stabilen chemischen Veränderungen führen.

An die chemische Phase schließt sich die bis zu vielen Jahren andauernde biologische Phase an. Sie ist durch enzymatische und zellregulatorische Prozesse

gekennzeichnet, die sich infolge der vorausgehenden Molekülveränderungen abspielen.

Ein Großteil der Schäden an der zellulären DNA kann durch Reparaturenzyme erfolgreich repariert werden. Eine Minderheit der Schäden, v.a. DNA-Doppelstrangbrüche, können jedoch nicht repariert werden und persistieren als DNA-Mutationen. Sie können zur Apoptose der Zelle oder zur Entwicklung von Tumoren führen.

Biologische Veränderungen in bestrahltem Gewebe können in frühe und in späte Reaktionen unterteilt werden. Frühe Reaktionen, die nach Tagen bis Monaten auftreten, äußern sich v.a. in schnell proliferierenden Geweben, z.B. als Hautulzerationen, Entzündungen innerer Schleimhäute oder Schäden am Knochenmark. Histologisch sind sie überwiegend gekennzeichnet durch den Verlust von Stammzellen. Späte Reaktionen, die nach Monaten bis Jahren auftreten können, kommen eher in langsam proliferierenden Geweben wie Lunge, Niere, Leber und Herzmuskel vor. Vorherrschendes Merkmal ist hier eine kompensatorische Hyperproliferation der Zellen und eine mesenchymale Gewebsdifferenzierung, was sich häufig als Fibrosierung des Organgewebes äußert.

## **2.3 Die Strahlennephropathie**

### **2.3.1 Vorkommen**

Die Niere ist zusammen mit der Lunge eines der Organe, das am sensibelsten auf eine therapeutische Bestrahlung reagiert. Bestrahlt man die gesamte Niere mit einer ausreichenden Dosis, stellt sich bei ihr ein Funktionsverlust ein, der nach und nach zu einem Versagen der Niere führen kann. Dies wurde erstmals im Jahre 1906 beschrieben (22).

Mitte des 20. Jahrhunderts stellte die Strahlennephropathie ein häufiges Problem bei der Radiotherapie von Seminomen dar (46). Sie entwickelte sich bei 20 % der Patienten, wobei beide Nieren komplett in das Bestrahlungsfeld eingeschlossen waren. Durch die Definition einer Schwellendosis, den erfolgreicher Einsatz von

Chemotherapeutika und andere Weiterentwicklungen in der strahlentherapeutischen Praxis rückte die Strahlennephropathie zunächst wieder in den Hintergrund.

Erst der Einsatz der Ganzkörperbestrahlung als Vorbereitung auf eine Knochenmarkstransplantation hat die Strahlennephropathie Anfang der 1990er Jahre wieder vermehrt in den Blickpunkt rücken lassen. Weltweit werden zur Zeit etwa 15.000 Knochenmarkstransplantationen pro Jahr durchgeführt (67). Die Ganzkörperbestrahlung hat dabei die Funktion, einer Graft-versus-Host-Reaktion entgegenzuwirken. Sie führt aber auch zu einer Nierenschädigung, nicht zuletzt aufgrund der häufigen Kombination mit anderen nephrotoxischen Agentien wie Cyclosporin A. So schätzt man die Rate der Patienten, die 3 Monate nach einer Knochenmarkstransplantation eine Niereninsuffizienz entwickeln auf 26% (34), spätmanifestierende Nierenschäden beobachtet man in rund 20 % der Fälle (13).

Auch die Radioisotopentherapie als relativ neue Krebstherapieform kann als möglicher Verursacher einer Strahlennephropathie in Frage kommen. Cohen et al. beschreiben 8 Fälle, die durch radioaktive Yttrium-Konjugate verursacht wurden (15).

### **2.3.2 Klinisches Erscheinungsbild**

Die Strahlennephropathie kann sich in verschiedener Weise klinisch manifestieren. Luxton und Kunkler beobachteten 54 Patienten mit Strahlennephropathie und teilten sie nach klinischen und pathologischen Kriterien in vier Gruppen ein. (siehe Tabelle 1) (51).

Spricht man von einer akuten Strahlennephropathie in Form einer Nephritis, handelt es sich dabei nicht wirklich um ein akutes, während oder unmittelbar nach Bestrahlung auftretendes Krankheitsbild. Vielmehr entwickelt sich die akute Strahlennephritis nach einer Latenzzeit von 6-12 Monaten relativ plötzlich (44). Meist präsentieren sich die betroffenen Patienten ziemlich akut mit Symptomen eines Nierenversagens wie Hypertonie, Ödeme, Dyspnoe, Übelkeit, Kopfschmerzen und Abgeschlagenheit. Laborchemisch lassen sich im Blut eine deutliche normochrome normozytäre Anämie und eventuell ein erhöhter Kreatinin- und Harnstoffspiegel nachweisen. Im Urin kann man in vielen Fällen eine Mikrohämaturie, Proteinurie und Zylindrurie finden. Die Prognose der akuten Strahlennephritis ist schwer beurteilbar, da entsprechende verlässliche statistische Untersuchungen fehlen. Sie scheint aber von dem Ausmaß der hypertensiven Komponente abzuhängen.

Die chronische Form der Strahlenneuropathie kann sich sekundär aus der akuten Form oder primär nach einer längeren indolenten Latenzzeit entwickeln. Die klinischen Merkmale der chronischen Form unterscheiden sich im Wesentlichen nicht von denen eines chronischen Nierenversagens anderer Ursache. Es lassen sich häufig eine Proteinurie, Hypertonie, Azotämie und Anämie nachweisen. Die Prognose ist abhängig vom Ausprägungsgrad des Nierenversagens, im Vergleich zur akuten Strahlenneuropathie jedoch günstiger. Die Patienten überleben oft viele Jahre ohne große Einschränkung der Leistungsfähigkeit. Im Krankengut von Luxton und Kunkler waren von 22 Patienten mit chronischer Strahlenneuropathie nach 10 bis 14 Jahren noch 14 am Leben. Acht Patienten starben an chronischem Nierenversagen (5).

Es werden auch wenige Fälle beschrieben, in denen sich eine Maligne Hypertonie noch Monate bis Jahre nach abdomineller Bestrahlung entwickelte (50; 71; 72). Typisch für eine Maligne Hypertonie sind ein stark erhöhter Blutdruck (diastolischer Blutdruck > 130 mmHg), zusammen mit einem Papillenödem und retinalen Blutungen. In schweren Fällen können neurologische Symptome wie starke Kopfschmerzen, Erbrechen, Sehstörungen, vorübergehende Lähmungserscheinungen, Krämpfe sowie Bewusstlosigkeit auftreten (40). Dabei muss zunächst kein Nierenversagen vorliegen, in präterminalen Stadien beobachtet man es jedoch häufig (44).

Die sog. Benigne Hypertonie entwickelte sich bei 5 der 54 von Luxton und Kunkler beobachteten Patienten. Sie ähnelt klinisch einer benignen essentiellen Hypertonie mit einer Proteinurie unterschiedlicher Ausprägung. Bei längerer Beobachtung stellte sie sich aber aufgrund einer erhöhten Mortalität als weniger gutartig dar (5).

Syndrom	Latenzzeit
Akute Strahlenneuropathie (-nephritis)	6 – 12 Monate
Chronische Strahlenneuropathie	≥ 18 Monate
Maligne Hypertonie	12 - 18 Monate
Benigne Hypertonie	≥ 18 Monate

**Tabelle 1 Klinische Syndrome, die mit der Strahlenneuropathie assoziiert sind**

### **2.3.3 Histomorphologische Veränderungen**

In den vergangenen Jahrzehnten gab es umfassende Untersuchungen zu den histologischen Veränderungen bestrahlter Nieren. Sowohl Material aus Tierversuchen an Maus, Ratte, Hund, Schwein und Affe (23; 38; 52; 70; 76) als auch bioptisch gewonnenes Material vom Menschen (38) wurden licht- wie elektronenmikroskopisch untersucht.

Histologische Veränderungen bestrahlter Nieren lassen sich je nach ihrer funktionell-anatomischen Lokalisation in glomeruläre, vaskuläre, tubuläre und interstitielle Erscheinungen einteilen. Unter den untersuchten Spezies gibt es sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede bezüglich der Ausprägung und dem Verteilungsmuster der pathologischen Veränderungen. Im Folgenden soll nur auf die Morphologie der Strahlennephropathie des Menschen und der Maus, die in dieser Arbeit als Modellorganismus verwendet wurde, eingegangen werden.

#### ***2.3.3.1 Histomorphologie der Strahlennephropathie beim Menschen***

In den meisten Proben, die von Menschen mit einer Strahlennephropathie stammen, wurden komplexe Veränderungen der Glomeruli, der Tubuli und der Gefäße beobachtet. Sehr charakteristisch sind dabei die Veränderungen an den Glomeruli, die sich auch schon in frühen Stadien der Strahlennephropathie nachweisen lassen (69). Dabei kommt es zu einer Verdickung der Glomeruluskapillaren, die durch ein zelluläres Ödem der Endothelzellen sowie durch deren Ablösung von der Basalmembran zustande kommt (38). Der Schaden am Endothel äußert sich außerdem in einer Thrombosierung der Glomeruluskapillaren und in einer Verbreiterung des subendothelialen Raumes, der Ansammlungen von elektronenmikroskopisch hellem Material enthält (42). Daneben kommt es zu einer Ausweitung des Mesangiumraumes, entweder mit einer Vermehrung oder mit einer Verminderung der mesangialen Matrix, letzterer Prozess wird als Mesangiolyse bezeichnet (69). All diese Veränderungen können zu einer Lumeneinengung der Glomeruluskapillaren mit nachfolgender narbiger Degeneration der Glomeruli, einer sog. Glomerulosklerose führen.

Die tubulären, vaskulären und interstitiellen Veränderungen findet man vorzugsweise in Proben aus weiter fortgeschrittenen Stadien der Strahlennephropathie. Keane et al. (42) beschreiben einen Fall, bei dem 11 Monate

nach Bestrahlung in der Nierenbiopsie eine tubuläre Atrophie mit interstitieller Fibrose aufgefallen war. Das Gefäßsystem betreffend lassen sich v.a. Schädigungen im arteriellen Schenkel finden, die zu einer reduzierten Gefäßweite führen. So zeigen die größeren Arterien durch Proliferation myointimaler Zellen eine Verdickung der Intima, die kleinen Arterien und die Arteriolen können eine Hyperplasie der Tunica media oder thrombotische Läsionen entwickeln (69).

### ***2.3.3.2 Histomorphologie der Strahlennephropathie bei der Maus***

Das Nierenparenchym der Maus zeigt nach Bestrahlung sehr ähnliche Veränderungen wie beim Menschen, was ihren Wert als geeignetes Versuchstier unterstreicht. Aufgrund einer Vielzahl von experimentellen Studien an der Maus sind die Zeitpunkte, zu denen sich die jeweiligen histologischen Befunde manifestieren, besser bekannt als beim Menschen (69). Im Vordergrund stehen auch bei der Maus die glomerulären Veränderungen im Sinne einer Glomerulosklerose (~10 Monate). Weiterhin entwickelt sich bei ihr analog zum Menschen eine tubuläre Atrophie und eine interstitielle Fibrose (~6 Monate). Das Phänomen der Tubulolyse (~6 Wochen), einer Auflösung von Tubuluszellen unter Zurücklassung der nackten Basalmembran, kann dagegen nur bei der Maus beobachtet werden (35). Die vaskulären Veränderungen sind im Vergleich zum Menschen weniger ausgeprägt. Thrombotische Läsionen sind bei der Maus eher selten, chronische Gefäßverschlüsse durch eine Intima- oder Mediahyperplasie werden gar nicht berichtet.

### **2.3.4 Mediatoren und Mechanismen der Strahlennephropathie**

An den pathophysiologischen Abläufen, die eine Bestrahlung von Nierengewebe mit sich bringt, sind mehrere Zelltypen, v.a. glomeruläre Endothelzellen, Mesangiumzellen und Tubuluszellen beteiligt. Die Pathogenese der Strahlennephropathie vollzieht sich nicht nur als reine strahleninduzierte Apoptose oder Nekrose eines Teils der beteiligten Zellpopulationen. Es spielen auch die initial überlebenden Zellen eine wichtige Rolle, die mit kompensatorischer Proliferation, Ausschüttung von Mediatoren und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in

komplexer Weise reagieren. An dieser Stelle soll nur ein kurzer Überblick über die wichtigsten Einflussfaktoren gegeben werden.

Ein wichtiges, frühes Ereignis in der Entwicklung der Strahlennephropathie ist die Anlockung und Anheftung von neutrophilen Granulozyten an das Endothel der Glomeruluskapillaren (33). Die Endothelzellen vermitteln dies durch die Abgabe von chemotaktisch wirksamen Faktoren aus dem Lipoxigenasestoffwechsel und der vermehrten Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin und ICAM-1 (68; 75). Die Granulozyten rufen eine entzündliche Reaktion an den Glomeruluskapillaren hervor, was zu einer erhöhten Permeabilität mit Übertritt von Plasma und festen Blutbestandteilen in den subendothelialen bzw. mesangialen Raum führt. Dabei bildet sich ein perikapilläres Ödem mit Einengung des Glomeruluskapillarlumens und Reduktion der GFR. Weiterhin wird vermutet, dass die Permeabilitätssteigerung auch Initiator für eine Aktivierung und Proliferation der Mesangiumzellen ist. Dies führt zu einer fortschreitenden Ausdehnung und Sklerosierung des Mesangiumraumes, ein weiterer pathogenetischer Faktor der Strahlennephropathie (33).

Eine zusätzliche Rolle spielt nach Oikawa et al. (66) das fibrinolytische System. Sie zeigten im Tiermodell, dass nach Bestrahlung die glomeruläre Konzentration von PAI-1-mRNA erhöht ist, v.a. in den besonders stark von Mesangiolyse, Glomerulosklerose und Kapillarthrombose betroffenen Arealen. PAI-1 wird sowohl ein antifibrinolytischer, thrombogener als auch ein profibrotischer Effekt zugeschrieben. Letzterer lässt sich aus einer Hemmung der plasminvermittelten Matrixdegradation erklären, was zu einer Akkumulation von fibroseinduzierender extrazellulärer Matrix führt.

Datta et al. (16) konnten in glomerulären Lysaten, die aus bestrahlten Rattennieren in einer späteren Phase der Strahlennephropathie stammten, eine erhöhte TGF- $\beta$ 1-Produktion nachweisen. TGF- $\beta$ 1 kann durch Angiotensin II induziert werden und gilt als fibrosefördernder Faktor, indem es durch die Aktivierung von Fibroblasten die Synthese extrazellulärer Matrix stimuliert und ihre Degradation durch Änderung des Proteasen-Antiproteasen-Verhältnisses inhibiert (37). TGF- $\beta$ 1 ist nach einer Studie von Cohen et al. (14) weniger in der Pathogenese der früheren Glomerulosklerose als vielmehr in der später eintretenden tubulointerstitiellen Fibrose von Bedeutung.



## 2.4 Bisherige pharmakologische radioprotektive Ansätze

### 2.4.1 Klassische Radioprotektoren

Radioprotektoren lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Radikalfänger (Antioxidantien) und Zellantwortmodulatoren (17).

Unter den Radikalfängern gibt es natürlich vorkommende zelluläre Moleküle, wie z.B. Thiol-Verbindungen (Cystein, Cysteamin und Glutathion) oder die Superoxiddismutase, welche experimentell in der Lage sind, die deletären Effekte einer radiogenen Radikalbildung abzumildern. Zu den synthetisch hergestellten Verbindungen zählt der Aminothiolalkohol Amifostin, ein Radikalfänger mit besonderer klinischer Bedeutung. Er reichert sich in gesunden, tumorfreien Zellen in bis zu 100-fach höherer Konzentration als in Tumorzellen an. Dabei kann er die radikalvermittelte toxische Wirkung auf die DNA gesunder Zellen verringern (8). Der protektive Effekt von Amifostin erstreckt sich auch auf Schäden durch eine Reihe von Chemotherapeutika, unter ihnen auch das für seine Nephrotoxizität lang bekannte Cisplatin (9; 27). Über die Hochregulation antioxidativer Enzyme können auch Corticosteroide radioprotektiv wirken (31).

Die Zellantwortmodulatoren beeinflussen die Reparatur von DNA-Schäden bzw. die Reaktion der Zelle auf die Schäden. Zu dieser Gruppe gehören Eicosanoide (z.B. Misoprostol), Immunmodulatoren (z.B. Glukan), Interleukine (z.B. Interleukin 1) und Protease-Inhibitoren (z.B. Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor (BBI)). Verschiedene in vitro und tierexperimentelle Studien belegen den radioprotektiven Effekt dieser Substanzen (26; 43; 65).

### 2.4.2 Radioprotektoren der Strahlennephropathie

#### 2.4.2.1 ACE-Hemmer

Früher wurde die Strahlennephropathie als unausweichliche, fortschreitende und unbehandelbare Krankheit angesehen. Anfang der 1990er Jahre jedoch, konnte gezeigt werden, dass die Strahlennephropathie im Tierexperiment mit Captopril, einem thiolgruppentragenden Hemmer des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE-

Hemmer), behandelt werden kann (11). Neben dem therapeutischen Effekt belegten darauffolgende Studien auch einen prophylaktischen, wenn die Medikation als Dauereinnahme schon simultan zur Bestrahlung begonnen wurde (10; 57). ACE-Hemmer finden heutzutage breite klinische Anwendung in der Therapie der Hypertonie und der Herzinsuffizienz. Sie sind Analoga der C-terminalen Peptidkette des Angiotensin I und blockieren das ACE reversibel durch Bindung an das aktive Zentrum. Dadurch kommt es zur Unterdrückung der Synthese von Angiotensin II mit einer daraus folgenden blutdrucksenkenden Wirkung durch Verminderung der Vasokonstriktion und reduzierter Aldosteronsynthese. Ein anderer Teil der antihypertensiven Wirkung, der in letzter Zeit immer mehr an Beachtung gewinnt, ist auf die Funktion des ACE als Kininase zurückzuführen. Kinine wie z.B. Bradykinin und Kallidin können aus Endothelzellen die endogenen Vasodilatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) freisetzen. Eine pharmakologische Hemmung des ACE-vermittelten Abbaus dieser vasodilatatorisch wirkenden Kinine bewirkt somit einen additiven blutdrucksenkenden Effekt. Erhöhter Blutdruck ist eine wichtige Komponente im Bild der Strahlennephropathie, womit sich die Wirksamkeit der ACE-Hemmer durch Inhibition der Angiotensin II-Synthese erklären lässt (59). Wahrscheinlich gibt es auch blutdruckunabhängige radioprotektive Wirkungsmechanismen der ACE-Hemmer, wie z.B. die antiproliferative Wirkung von Captopril auf humane Mesangiumzellen durch Blockade der Angiotensin II-vermittelten Endothelinausschüttung (3). Diese Vermutung wird auch von der Tatsache unterstützt, dass andere Antihypertensiva wie Hydrochlorothiazid oder Verapamil trotz ihrer blutdrucksenkenden Wirkung keinen positiven Effekt auf die Strahlennephropathie haben (10; 36). Weitere Studien konnten zeigen, dass auch nicht-thiolgruppentragende ACE-Hemmer wie z.B. Enalapril präventiv wie therapeutisch wirksam sind (36; 59), Das spricht dafür, dass für die Effizienz von Captopril die Thiolgruppe nicht von entscheidender Bedeutung ist.

#### **2.4.2.2 Angiotensin II - Rezeptorantagonisten**

Die Unterdrückung der Angiotensin II-Synthese durch ACE-Hemmer lieferte eine schlüssige Erklärung für ihre Wirksamkeit. Jedoch haben ACE-Hemmer pleiotrope Effekte (Bradykinin-Erhöhung, antimittogene Aktivität von Captopril). Dies führte dazu, dass Moulder et al. (58; 59; 64) einen AT<sub>1</sub>-Rezeptorblocker im Tierversuch testeten, um zu sehen, inwiefern der radioprotektive Effekt der ACE-Hemmer von der

Angiotensin II-Synthesehemmung abhängt. Für die Strahlenneuropathie stellte sich dabei heraus, dass die Blockade des AT1-Rezeptors (Angiotensin II-Rezeptor vom Subtyp 1) allein ausreicht, um etwa denselben therapeutischen Effekt wie die ACE-Hemmer zu erreichen. In Studien zur Vorbeugung der Strahlenneuropathie waren die AT1-Rezeptorblocker den ACE-Hemmern sogar deutlich überlegen (58; 64). Das deutet darauf hin, dass die beiden Substanzklassen in der Therapie der Strahlenneuropathie auf andere Weise wirken als in der Prophylaxe (56). Von einer Blockade des AT2-Rezeptors, der eigentlich als Gegenspieler zum AT1-Rezeptor angesehen wird, erwartete man eine Exazerbation des Krankheitsbildes. Moulder et al. (61) fanden jedoch bei ihren Tierexperimenten zu einem AT2-Rezeptorblocker (PD123319), dass er gleichläufige Effekte zum AT1-Rezeptorblocker (Blutdrucksenkung, Antidiurese und reduzierte Proteinurie) zeigte und eine Kombination beider Rezeptorblocker einen größeren Benefit hatte als die Verabreichung der jeweiligen Einzelsubstanz.

## 2.5 Untersuchte Substanzen

### 2.5.1 P-Tyr (O-phospho-L-tyrosin)

P-Tyr ist eine modifizierte, von der aromatischen Aminosäure Tyrosin abgeleitete Aminosäure, bei der die Hydroxylgruppe des Seitenketten-Phenyls phosphoryliert wurde.

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) sind zelluläre Enzyme, welche die Phosphorylierung von Tyrosinresten an Zellproteinen katalysieren. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation unterschiedlichster Prozesse in der Säugetierzelle wie Zellteilung, Migration, Metabolismus, Proliferation und Differenzierung (73). Ein Beispiel für eine solche RTK ist der „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR). Er ist beim gesunden Menschen für das Zellwachstum zuständig, in der Tumorgenese werden ihm transformierende Eigenschaften zugeschrieben. Daneben gibt es den RTK gegenüber antagonistisch wirkende Enzyme. Sie neutralisieren das Rezeptorsignal, indem sie die Phosphatgruppe wieder abspalten (Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPasen)) (47).

Mishra et al. zeigten, dass PTPasen durch exogen zugeführte Phosphotyrosine wie dem p-Tyr aktiviert werden können (54). Bei humanen Mamma- und Nierenkarzinomzellen kam es dadurch zur Hemmung des EGFR-vermittelten Zellwachstums.

Neben diesen antiproliferativ-antikarzinogenen Eigenschaften fungiert p-Tyr aber auch als normalgewebsspezifischer Radioprotektor, wie Dittmann et al. (20) herausfanden. P53-Wildtyp-Zellen (d.h. Zellen, bei denen kein mutiertes p53 vorliegt), wie sie für Normalgewebe typisch sind, waren nach Vorbehandlung mit p-Tyrosin strahlenresistenter als unbehandelte. Neuere Experimente von Dittmann et al. zum molekularen Wirkmechanismus (18) lassen erkennen, dass p-Tyrosin mit der EGFR-assozierten Signaltransduktion interagiert. Dabei wird der EGFR verstärkt autophosphoryliert und internalisiert. Nach einer Bestrahlung mit simultaner p-Tyrosin Behandlung findet sich eine verstärkte Translokation des EGFR in den Zellkern. Simultan kommt es zu einer Komplexbildung mit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), die eine essentielle Rolle im Rahmen der DNA-Reparatur spielt. Die DNA-PK wird aktiviert, bindet vermehrt an die zelluläre DNA und führt zu einer verbesserten DNA-Reparatur sowie einem längeren Überleben der bestrahlten Zellen

### **2.5.2 AVE 7688**

AVE 7688 ist eine Substanz aus der Gruppe der Vasopeptidase-Inhibitoren (VPI). Diese Substanzen sind in der Lage, zwei Enzyme simultan zu hemmen: sowohl das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) als auch die Neutrale Endopeptidase (NEP).

Das ACE vermittelt die Aktivierung von Angiotensin I zu Angiotensin II und die Degradation von Kininen, v.a. dem Bradykinin (siehe Kapitel 2.4.2.1). AVE 7688 sollte hinsichtlich seiner ACE-blockierenden Eigenschaft die gleiche Wirkung haben wie ein herkömmlicher ACE-Hemmer (z.B. Captopril)

Die NEP ist eine endothelständige zinkhaltige Metallopeptidase, die hauptverantwortlich für den Abbau der Natriuretischen Peptide im Blut ist. Gleichzeitig stellt sie einen weiteren enzymatischen Abbauweg für Kinine dar (55). Zu den Natriuretischen Peptiden gehören das ANP (atriales natriuretisches Peptid),

das BNP (brain natriuretisches Peptid) und das CNP (C-Typ natriuretisches Peptid). Sie werden physiologischerweise bei Hypervolämie freigesetzt. Im Herz-Kreislaufsystem bewirken ANP und BNP eine Vasodilatation, Vorlast- und Blutdrucksenkung, CNP bewirkt eine stärkere Vasodilatation im venösen Schenkel (49). Über eine Hemmung der Renin- und Aldosteronsekretion und eine Erhöhung der GFR steigern die Natriuretischen Peptide die Wasser- und Natriumausscheidung in der Niere (48; 53; 84). In mehreren Arbeiten wurden den Natriuretischen Peptiden antimitogene Wirkungen auf Mesangiumzellen nachgewiesen (2; 7; 39; 74). was sich auch auf den Verlauf der Strahlennephropathie als mesangioproliferative Erkrankung günstig auswirken könnte. Eine Blockade der NEP durch AVE7688 führt also zu einer höheren Konzentration von Bradykinin und Natriuretischen Peptiden im Blut, was sich vasodilatativ, diuretisch und antiproliferativ auswirkt.

## **3 Material und Methodik**

### **3.1 Versuchstiere**

#### **3.1.1 Allgemeines**

Für den Versuch wurden weibliche C3H/N-Mäuse (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) verwendet. Sie waren bei Beobachtungsbeginn 12 bis 14 Wochen alt und ihr Körpergewicht betrug ungefähr 20 g. Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt, das Versuchsprotokoll wurde von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-99/02 genehmigt.

#### **3.1.2 Tierhaltung**

Die Haltung der Tiere erfolgte in dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der Abteilung für Experimentelle Onkologie des Klinikums Rechts der Isar, München. Alle Tiere waren in normierten Makrolonkäfigen (Makrolon Typ 4) untergebracht. Die Käfige waren mit StandardEinstreu für Labortiere gefüllt und beherbergten maximal 20 Tiere pro Käfig. In den Stallungen herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 40( $\pm$ 10)%, die Raumtemperatur betrug 23( $\pm$ 1) $^{\circ}$ C. Die Beleuchtung erfolgte in einem automatisierten Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden künstlichem Licht zu 12 Stunden Dunkelheit.

#### **3.1.3 Tierfütterung**

Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und herkömmlichem Nagetieralleinfuttermittel (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland).

Eine Ausnahme stellen die mit AVE 7688 behandelten Tiere dar, welche neben freiem Trinkwasserzugang ein speziell angefertigtes Futtermittel erhielten, das die Wirksubstanz in einer Konzentration von 0,0125 % enthielt. Geht man von einer täglichen Futteraufnahme von 5 % des Tierkörpergewichts aus, ergibt sich bei dieser prozentualen Arzneistoffeinmischung ins Futter eine der Studie von Gross et al.(24) analoge Dosis von 25 mg/kg KG/d.

## **3.2 Studiendesign**

### **3.2.1 Zeitlicher Ablauf**

Die Versuchstiere wurden im Alter von 12 bis 14 Wochen einer unfraktionierten Einzelnierenbestrahlung unterzogen (Ausnahme: unbestrahlte Kontrolltiere). 4( $\pm$ 2)Tage zuvor hatten sie eine erste Szintigraphiemessung („Ausgangsszintigraphie“, „Woche 0“) bekommen. Die nächste Szintigraphie folgte 19 Wochen nach der Nierenbestrahlung („Woche 19“). Die folgenden 4 Szintigraphien erfolgten jeweils im 6 Wochen-Abstand („Woche 25“, „Woche 31“, „Woche 37“ und „Woche 43“). Zur besseren Bewältigung des technischen und organisatorischen Aufwands wurden die Startzeitpunkte der Untersuchungsgruppen versetzt über 6 Wochen gewählt.

### **3.2.2 Gruppeneinteilung**

Die Studie umfasste insgesamt 121 Tiere. Sie wurden in Kontrollgruppen (n=33), p-Tyrosin-Gruppen (n=39) und AVE7688-Gruppen (n=49) aufgeteilt. Durch verschiedene Bestrahlungsdosen von 8, 11, 14 und 17 Gy sowie unbestrahlten Tieren bildeten sich innerhalb dieser drei Gruppen weitere Subgruppen. Eine genaue Aufstellung findet sich in Tabelle 2.

Gruppe	Medikation	Bestrahlungsdosis (Gy)	Anzahl der Tiere (n)
AMC	keine	0	6
8 Gy Kontrolle	keine	8	8
11 Gy Kontrolle	keine	11	9
14 Gy Kontrolle	keine	14	10
8 Gy p-Tyrosin	p-Tyr	8	10
11 Gy p-Tyrosin	p-Tyr	11	10
14 Gy p-Tyrosin	p-Tyr	14	11
17 Gy p-Tyrosin	p-Tyr	17	8
AVE only	AVE7688 early	0	5
8 Gy AVE early	AVE7688 early	8	8
11 Gy AVE early	AVE7688 early	11	8
14 Gy AVE early	AVE7688 early	14	9
11 Gy AVE late	AVE7688 late	11	9
14 Gy AVE late	AVE7688 late	14	10

**Tabelle 2: Gruppeneinteilung**

### **3.2.2.1 Kontrolltiere**

Die Kontrolltiere erhielten keine pharmakologisch wirksame Substanz.

Sie erhielten Bestrahlungsdosen von 0 Gy (n=6), 8 Gy (n=8), 11 Gy (n=9) und 14 Gy (n=10).

Die unbestrahlten Tiere (0 Gy) werden als „age-matched controls“(AMC) bezeichnet. Sie dienen der Beobachtung der Nierenfunktion im Verlauf des natürlichen Alterungsprozesses.

### **3.2.2.2 P-Tyr-Tiere**

Die p-Tyr-Tiere erhielten Bestrahlungsdosen von 8 Gy (n=10), 11 Gy (n=10), 14 Gy (n=11) und 17 Gy (n=8). Die Substanz wurde den Mäusen zweimal vor der Bestrahlung verabreicht. Dazu bekamen sie 0,14 mg p-Tyr gelöst in 0,2 ml isotoner Kochsalzlösung jeweils einmal 18 Stunden und einmal eine Stunde vor der



Nierenbestrahlung i.p. verabreicht. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 20 g pro Maus errechnet sich eine Dosis von 7 mg/kg KG.

### **3.2.2.3 AVE7688-Tiere**

Die AVE7688-Tiere erhielten Bestrahlungsdosen von 0 Gy (n=5), 8 Gy (n=8), 11 Gy (n=17) und 14 Gy (n=19).

Die unbestrahlten Tiere (0 Gy) erhielten AVE7688 ab einem Lebensalter von 12 bis 14 Wochen, analog zu den bestrahlten Tieren. Sie bilden eine Gruppe, die im Folgenden als „AVE only“ bezeichnet wird.

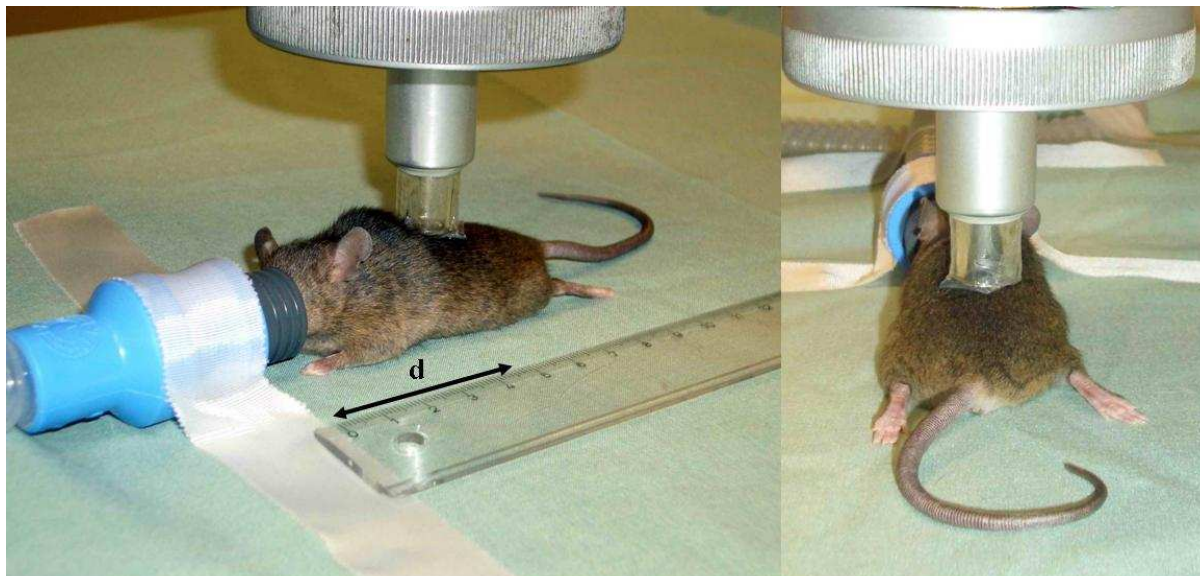
Die bestrahlten Tiere wurden bezüglich des Zeitraums der Verabreichung von AVE7688 in zwei Gruppen unterteilt:

Drei Gruppen erhielten AVE7688 lebenslänglich ab dem Tag der Nierenbestrahlung, d.h. mit einem Lebensalter von 12 bis 14 Wochen. Sie werden im Folgenden als „AVE early“-Gruppen bezeichnet. Diese Gruppen sollen die klinische Situation einer nephroprotektiven Pharmakoprophylaxe simulieren.

Die anderen zwei Gruppen erhielt AVE7688 ab einem Lebensalter von 38 bis 40 Wochen, d.h. 26 Wochen nach der Nierenbestrahlung für den Rest der Nachbeobachtungszeit. Sie werden im Folgenden als „AVE late“-Gruppen bezeichnet. Diese Gruppen sollen die klinische Situation der Therapie einer bereits manifesten Nierenfunktionsstörung nach Strahlentherapie simulieren.

### 3.3 Bestrahlung

Die Mäuse wurden zur Durchführung der Bestrahlung mit einem Isofluran/Sauerstoff-Gemisch (3 ml Isofluran(Forene®)/min, 500 ml Sauerstoff/min) aus einem Kleintier-Narkosegerät (Fa. Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland) narkotisiert. Die Bestrahlung der Tiere erfolgte in Bauchlage als Einzelfeldbestrahlung. Als Strahlungsquelle wurde ein Röntgen-Weichstrahlgerät (Philips RT 100) verwendet. Das kreisförmige Bestrahlungsfeld hatte einen Durchmesser von 15 mm und war paravertebral auf die rechte Niere gerichtet (siehe Abbildung 2). Bei einer maximalen Längsausdehnung einer gesunden Niere von 10 mm darf also von einem Sicherheitssaum von ca. 2,5 mm ausgegangen werden. Um eine Überlagerung mit der linken Niere möglichst gering zu halten wurde ein 2,0 mm dickes Bleischild über dem medialen Teil des Bestrahlungsfeldes angebracht.



**Abbildung 1: Nierenbestrahlung**

**d: Abstand von Schnauzenspitze zur rechten Niere ( siehe auch Abbildung 3)**

Das tatsächliche Bestrahlungsfeld ist in Abbildung 2 dargestellt. Um die Position der zu bestrahlenden rechten Niere genauer zu ermitteln, wurden die Bilder der Ausgangsszintigraphie herangezogen. (siehe Abbildung 3) Darauf war zu erkennen, dass der auf die Medianlinie projizierte Abstand  $d$  zwischen der Schnauzenspitze der

Maus und dem rechten Nierenzentrum zwischen 4,5 und 4,9 cm lag. Mittels dieser Information konnte eine möglichst genaue Positionierung des Zentrums des Bestrahlungsfeldes auf das Zentrum der rechten Niere erreicht werden.

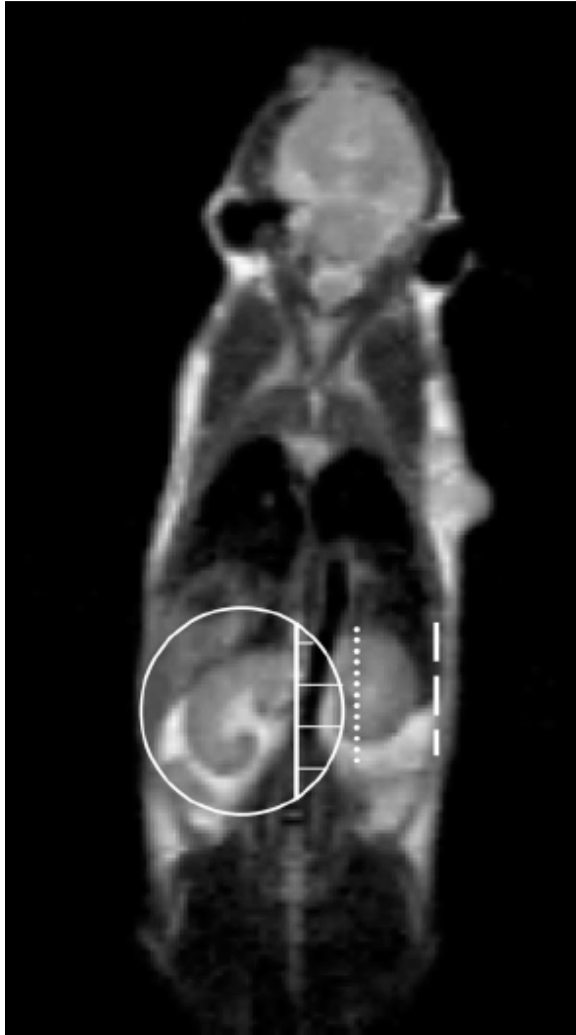


Abbildung 2: Bestrahlungsfeld

T2-gewichtete MR-Aufnahme einer Maus mit schematischer Darstellung des Bestrahlungsfeldes. Die weiße Linie im Feld repräsentiert die mediale Feldgrenze. Die schraffierte Fläche rechts von dieser Linie war durch ein Bleischild abgedeckt. Die gepunktete Linie zeigt die 10%-Isodosenlinie der für die kontralaterale Niere relevanten Streustrahlung ( die gestrichelte 5%-Isodosenlinie liegt ausserhalb der Niere)

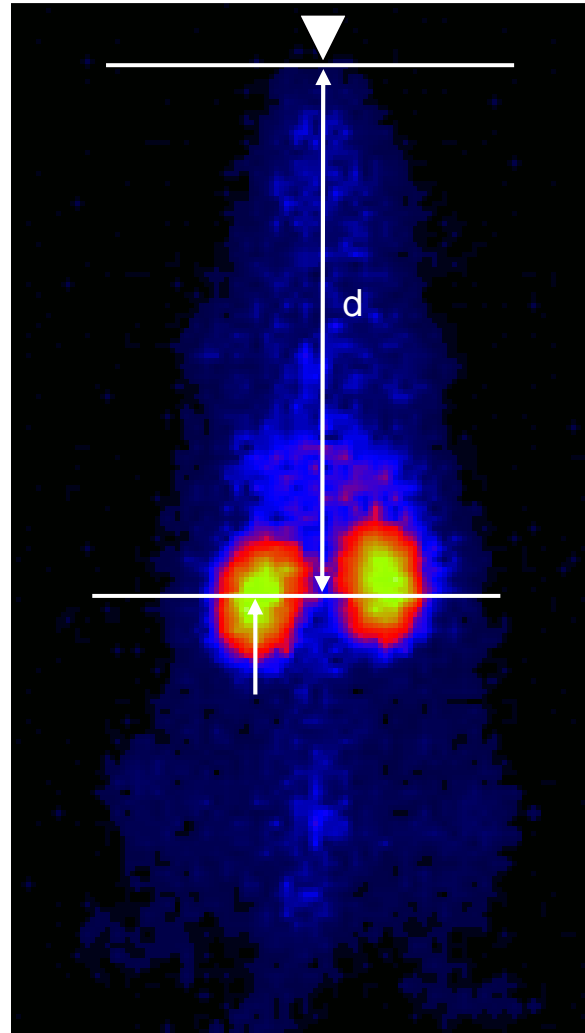


Abbildung 3: Ausgangsszintigraphie

Zur genaueren Positionierung des Bestrahlungsfeldes wurden die Bilder der Ausgangsszintigraphie vermessen:

- ▼ : Schnauzenspitze
- ↑ : Zentrum der rechten Niere
- ↕ : auf die Medianlinie projizierter Abstand  $d$  von Schnauzenspitze zu rechter Niere

Die Kathodenspannung des Bestrahlungsgerätes wurde auf 70 kV eingestellt, der Abstand der Strahlenquelle zur Oberfläche des Versuchstiers betrug ungefähr 10 cm. Bei einer Dosisdeposition von 6 Gy pro min ergaben sich definierte Bestrahlungszeiten (siehe Tabelle 3).

Bestrahlungsdosis	Bestrahlungszeit	Kathodenspannung
8 Gy	1,43 min	70 kV
11 Gy	1,97 min	70 kV
14 Gy	2,51 min	70 kV
17 Gy	3,05 min	70 kV

**Tabelle 3: Bestrahlungszeiten**

Gemäß der Bedienungsanleitung des RT100 befindet sich die 10%-Isodosenlinie 0,4 cm außerhalb des Bestrahlungsfeldes. Dadurch kommt es zu einer ungewollten Exposition des medialen Anteils der linken Niere von ungefähr 10% der applizierten Dosis. Die 5%-Isodosenlinie liegt 1 cm außerhalb des Bestrahlungsfeldes. Die restlichen Anteile der linken Niere sind dadurch etwa 5% der applizierten Dosis ausgesetzt.

Die Bestrahlung erfolgte unfraktioniert zu Dosen a 8, 11, 14 und 17 Gy, sowohl bei den medikamentös behandelten wie auch bei den Kontrolltieren. Diese Bestrahlungsdosen wurden ausgewählt aufgrund früherer Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (45; 79), wo sie relevante Langzeitschäden am bestrahlten Organ hinterließen.

## 3.4 Nierenzintigraphie

### 3.4.1 $^{99m}\text{Tc}$ -Dimercaptosuccinat ( $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA)

$^{99m}\text{Tc}$ -Dimercaptosuccinat ( $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA) ist die Substanz, die zur Erfassung der Nierenfunktion verwendet wurde. Sie ist ein Komplex aus  $^{99m}\text{Tc}$  und Dimercaptobernsteinsäure (Dimercaptosuccinic acid, DMSA).

$^{99m}\text{Tc}$  ist ein metastabiles Isotop des Technetiums. Es befindet sich in einem angeregten Zustand und zerfällt mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von 6 Stunden, wobei es unter Aussendung von Gammastrahlung in  $^{99}\text{Tc}$  übergeht.  $^{99m}\text{Tc}$  ist ein häufig verwendetes Radionuklid in der nuklearmedizinischen Diagnostik. Die Halbwertszeit im Stundenbereich gewährleistet schon bei kleinen Nuklidmengen eine hohe Signalintensität am Tag der Untersuchung. Die emittierte Gammastrahlung lässt sich gut mit einer geeigneten Kamera messen.

Dimercaptobernsteinsäure (Dimercaptosuccinic acid, DMSA) ist eine organische Dicarbonsäure mit zwei Thiolgruppen. Sie ist in der Lage mit Schwermetallatomen Komplexe einzugehen. Diese Eigenschaft macht sie im Bereich der Toxikologie interessant als mögliches Antidot bei Blei- und Arsenvergiftungen (1; 86). In der Nuklearmedizin wird sie als  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Komplex zur Nierenfunktionsdiagnostik (statische Nierenzintigraphie) eingesetzt.

### 3.4.2 Statische Nierenzintigraphie in der klinischen Anwendung

Bei der statischen Nierenzintigraphie wird  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA als Tracer verwendet. Nach intravenöser Injektion wird es v.a. in proximale Tubuluszellen aufgenommen und dort gespeichert (25). Eine normale Nierenaufnahme mit der Gammakamera zeigt eine homogene Aufnahme des Tracers in das Nierengewebe mit einer geringeren Signalintensität im Bereich des Kelchsystems.  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Nierenzintigraphien können eingesetzt werden, um anatomische Normvarianten (Hufeisennieren, ektipe Nieren, Doppelanlagen usw.) zu identifizieren. Größere parenchymatöse Schädigungen wie z.B. eine kortikale Vernarbung aufgrund eines refluxiven Harnableitungssystems lassen sich als verminderter Uptake darstellen. Die Abgrenzung zu anderen Differentialdiagnosen wie der akuten Pyelonephritis fällt jedoch schwer.

Mit einer statischen Nierenzintigraphie kann auch die seitengetrennte Funktion beider Nieren bestimmt werden (Normwert für eine Niere: 45-55%), was in vorliegender Arbeit für die Erfassung der radiogenen Funktionsveränderungen ausgenutzt wurde.

### **3.4.3 Durchführung der Nierenzintigraphie im Tierversuch**

#### **3.4.3.1 <sup>99m</sup>Tc-DMSA-Herstellung**

Die <sup>99m</sup>Tc-DMSA-Lösung wurde am Morgen des jeweiligen Aufnahmetages in der Nuklearmedizinischen Klinik hergestellt. Dabei wurde ein Radionuklidgenerator verwendet, der <sup>99</sup>Mo als Mutternuklid enthält und <sup>99m</sup>Tc in Form des <sup>99m</sup>Tc-Pertechnetat (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) in wässriger Lösung abgeben kann. Von dieser Lösung wurde ein Volumen, das 500 MBq entspricht, abgemessen und in eine Ampulle eines DMSA-Kits (TechneScan® DMSA, Mallinckrodt Medical BV, Petten, Niederlande, DRN 4341) gegeben und mit einer isotonen Natriumchloridlösung ad fünf ml gemischt. Somit ergab sich in diesem Gemisch eine Konzentration von 100 MBq pro ml. Nach einer Inkubationszeit von 15 min stand die <sup>99m</sup>Tc-DMSA-Lösung zur Injektion bereit.

#### **3.4.3.2 <sup>99m</sup>Tc-DMSA-Applikation**

##### **3.4.3.2.1 Anästhesie**

Zur Narkose wurden die Mäuse in einen gläsernen Standzylinder mit etwa 15 cm Durchmesser gesetzt. In diesem befanden sich einige mit Ether (Diethylether, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O, Merck KGaA, Darmstadt) getränkte Zellstofflagen. Nach Inhalation der Etherdämpfe wurden die Tiere innerhalb von 10 bis 15 Sekunden bewusstlos und konnten für die nachfolgende Injektion aus dem Glasbehälter entnommen werden, wobei die volle anästhesierende Wirkung nur für etwa 10 Sekunden anhielt. Weiterhin wurden 1-2 Lagen ethergetränkter Zellstoff in ein offenes 20ml Szintillationsfläschchen gegeben. Diese Etherquelle wurde im Bedarfsfall zur längeren Aufrechterhaltung der Narkose vor der Schnauze des Tieres platziert (siehe Abbildung 4).

### 3.4.3.2.2 Injektion

Die  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Lösung wurde hinter einer mit Plexiglas gefensterten Bleiabschirmung auf 1ml-Insulinspritzen (BD Micro-Fine+; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) aufgezogen. Jede Maus erhielt pro Szintigraphie 10MBq (entspricht 100  $\mu\text{l}$ ) der  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Lösung über eine laterale Schwanzvene injiziert. Dies entspricht 4 Units auf der Insulinspritze, die auf 40 Units a 25  $\mu\text{l}$  skaliert ist. Um eine bessere Venenfüllung zu erreichen, wurde der Schwanz der anästhesierten Maus kurz vor der Injektion für 1-2 Sekunden in etwa 35°C warmes Wasser getaucht. Dieser Schritt lies eine präzisere und schnellere Injektion zu, was einer kürzeren Narkosedauer der Maus zugute kam. Im Bedarfsfall wurde hierfür noch zusätzlich die Schwanzvene wurzelnah durch eine Assistentenperson gestaut. Nach Abklingen der Narkose wurden die Tiere in einem Ruheraum innerhalb des Strahlenschutzbereichs bis zur Durchführung der Nierenszintigraphieaufnahme verwahrt.

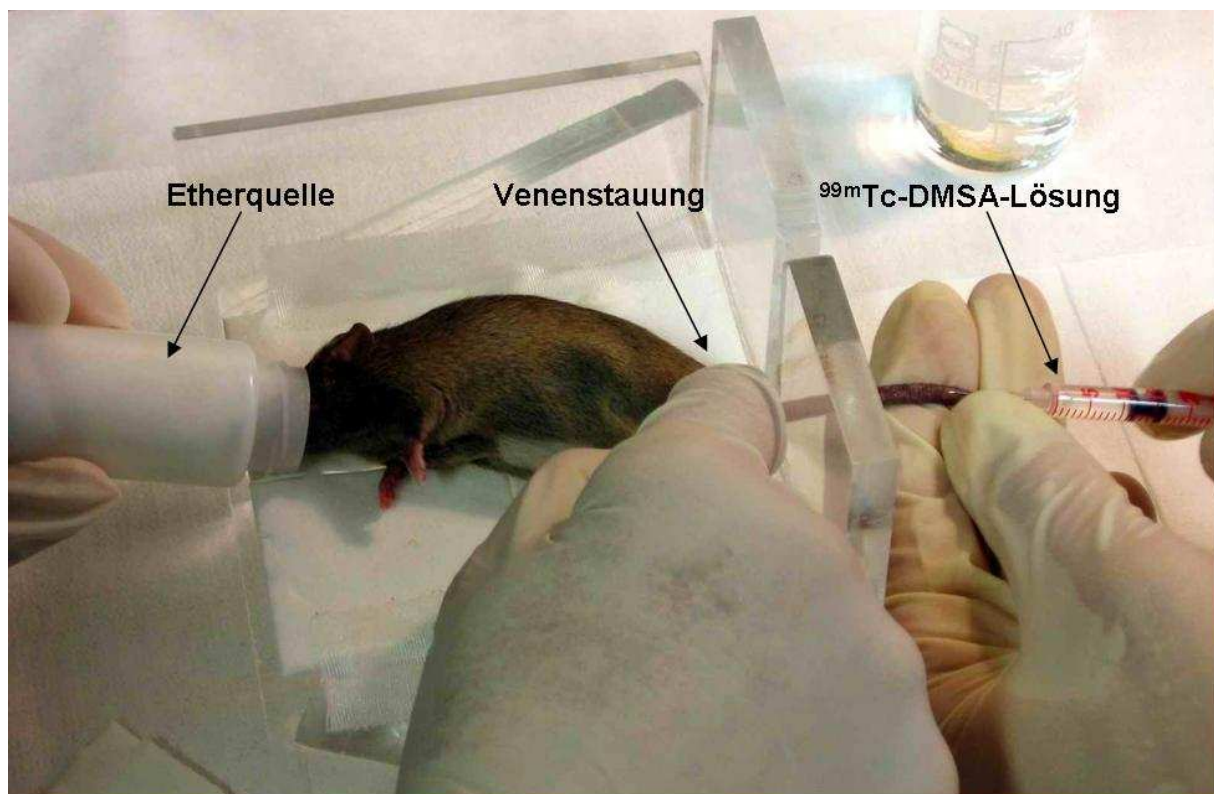


Abbildung 4:  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Injektion

Die Injektion der  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Lösung in die Schwanzvene erfolgte unter Zuhilfenahme einer Assistentenperson. Im Bedarfsfall unterhielt sie die Narkose mittels einer Etherquelle und sorgte für eine Venenstauung an der Schwanzwurzel.



### 3.4.3.3 Nierenszintigraphie-Aufnahme

#### 3.4.3.3.1 Durchführung

Nach einer Wartezeit von  $4,5(\pm 0,5)$  Stunden, die für eine gute  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Anreicherung nötig ist, wurden die Nierenszintigramme angefertigt. Um eine gute Signalqualität ohne Bewegungsartefakte zu erreichen, war für die Dauer der Aufnahme (ca. 15 min incl. Vorbereitung) eine Narkose notwendig. Diese erfolgte als Standardnarkose mittels einer intraperitoneal (i.p.) injizierten Narkoselösung (Xylazin/Ketamin-Gemisch, siehe Abbildung 5). Diese Narkoseform garantierte eine ausreichende Narkosedauer (ca. 30 min) und -tiefe. Nach einsetzender Narkosewirkung wurde wegen des fehlenden Lidschlusses eine Augengel (Vidisic<sup>®</sup>, Dr. Mann Pharma, Berlin) auf die Korneae der Tiere gegeben.



**8% Rompun<sup>®</sup>**  
(enthält 2% Xylazinhydrochlorid;  
Fa. Bayer, Leverkusen)

**10% Ketavet<sup>®</sup>**  
(enthält 100 mg/ml Ketamin;  
Fa. Pharmacia GmbH,  
Karlsruhe)

**82% isotone  
Kochsalzlösung**  
(enthält 0,9% Natriumchlorid;  
Fa. B.Braun, Melsungen)

**Abbildung 5: Injektionsnarkose**

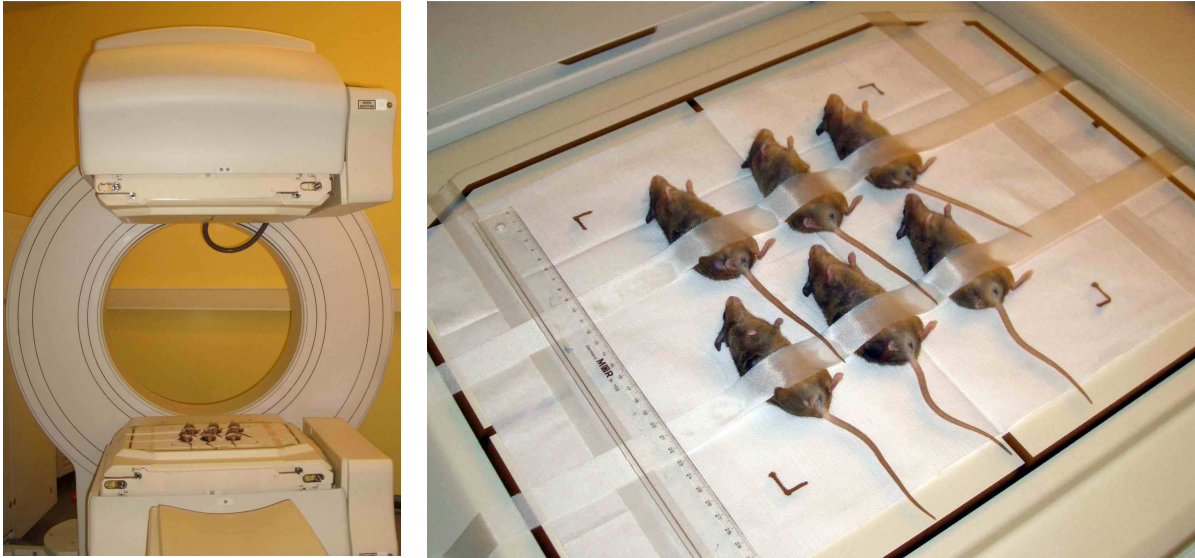
**links: i.p. Injektion der Narkoselösung**

**rechts: Zusammensetzung der Narkoselösung**

Die Szintigramme wurden in Form einer Fünf-Minuten-Sumptionsaufnahme an einer Gammakamera (Philips FORTE<sup>™</sup> Doppelkopfkamera; siehe Abbildung 6, links) erstellt. Als Kollimator wurde ein VXHR (Vertex High Resolution)-Kollimator verwendet. Die Tiere wurden in Rückenlage auf der Detektorplatte platziert und mit einem weißen Fixierpflaster für die Dauer der Aufnahme fixiert (siehe Abbildung 6 rechts). In dieser Technik konnten bis zu 10 Tiere gleichzeitig untersucht werden.



Das war für eine möglichst genaue Einhaltung des Intervalls zwischen  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Injektion und Szintigramm von Bedeutung. Die Programmeinstellungen an der Gammakamera entsprechen denen einer statischen Knochenszintigraphie und sind in Tabelle 4 wiedergegeben.



**Abbildung 6: Durchführung der Nierenszintigraphie**

**links: Philips FORTE™ Doppelkopfkamera**

**rechts: Positionierung der Tiere in Rückenlage auf der unteren Detektorplatte**

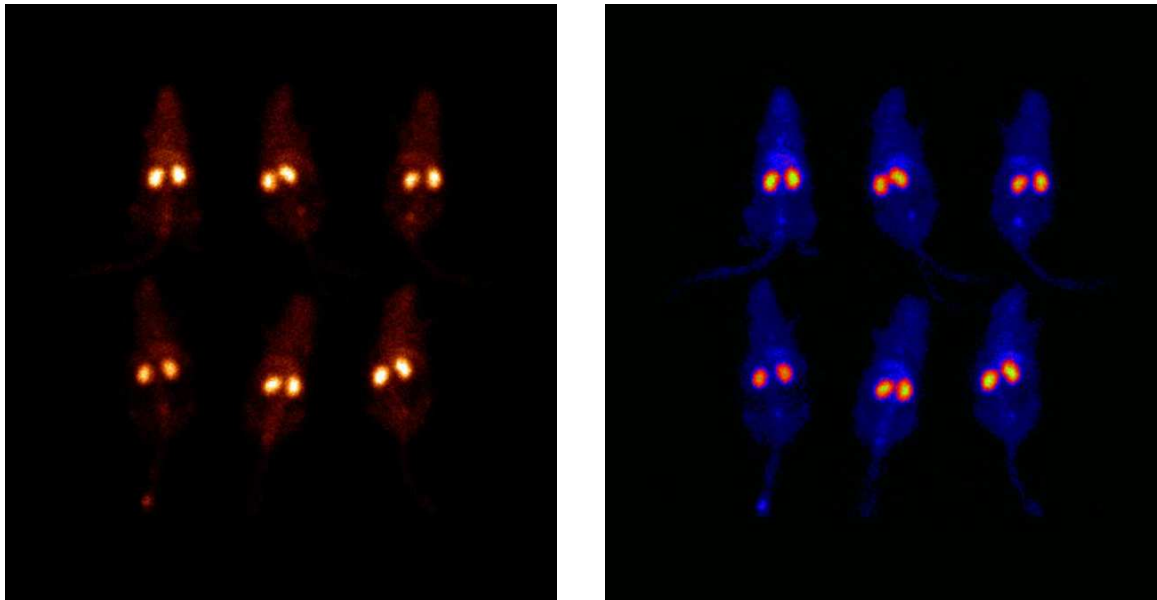
Procedure ID	KS Knochen Spaet
Matrix Size	256x256
Time	300 sec.
Collimator	VXHR
Detector Mask	Center 25,4 Square
Energy	140 keV

**Tabelle 4: Einstellungen and der Gammakamera**

### 3.4.3.3.2 Auswertung

Die Quantifizierung der Szintigramme erfolgte mittels einer Region-of-Interest (ROI)-Analyse durch das ADAC Multiple Region Programm Pegasys-X. Eine ROI ist eine von einer Linie umrandete Fläche. Alle Gammaquanten (=Counts), die innerhalb einer bestimmten Zeit auf diese Fläche treffen, werden registriert und der entsprechenden ROI als dimensionsloser Wert zugewiesen.

Zur besseren Darstellung wurden die Anzahl der Counts (auf die Detektorplatte treffende Photonen) farbkodiert wiedergegeben (siehe Abbildung 7).

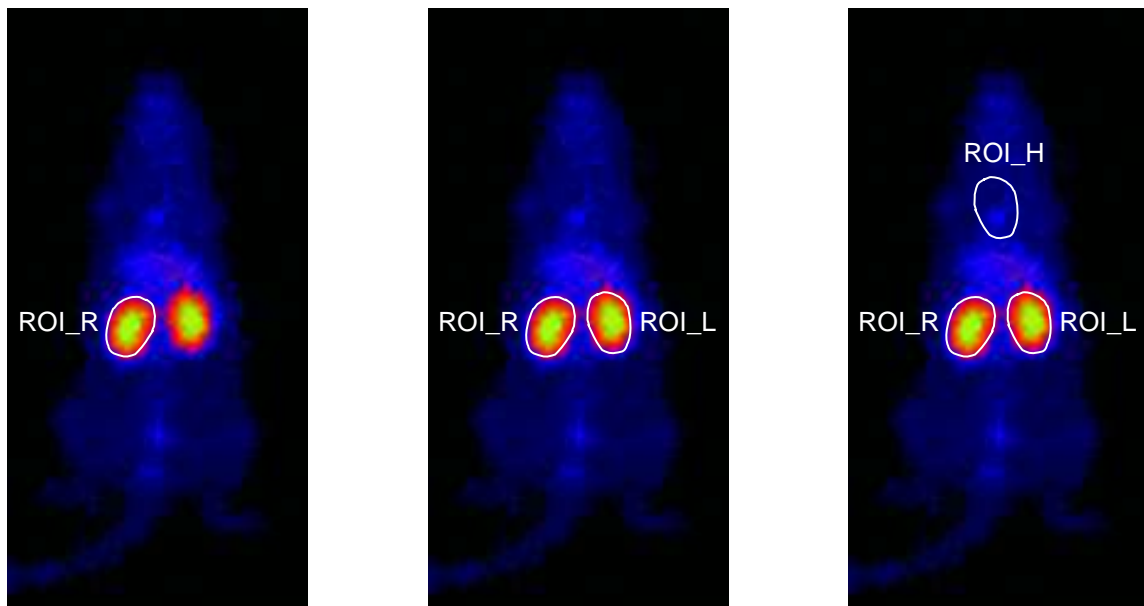


**Abbildung 7: Szintigraphieaufnahme**

**Links: Wiedergabe im Thermal-Bildmodus**

**Rechts: Wiedergabe im farbkodierten Blue/Red/Yellow-Bildmodus**

Zuerst wurde eine ROI, die über der Projektion der rechten Nierenfläche liegt, eingezeichnet (ROI\_R). Die Rahmen dieser ROI wurde dann kopiert, gespiegelt und über die Projektion der linken Niere gelegt (ROI\_L). Durch Verschieben und Rotation der neuen ROI wurde versucht eine möglichst exakte Überlagerung mit der linken Niere zu erreichen. Zur Messung eines Hintergrundwerts wurde diese ROI dann dupliziert und über die Projektion des Mediastinums gelegt (ROI\_H).



**Abbildung 8: Bestimmung der Regions-of-Interest**

**Schritt 1: Freihändiges Einzeichnen der ROI\_R**

**Schritt 2: Spiegeln, Verschieben und Rotieren der ROI\_R ergibt die ROI\_L**

**Schritt 3: Verschiebung der ROI\_L auf das Mediastinum ergibt die ROI\_H**

Zur Quantifizierung der relativen Nierenfunktion rechts (bestrahlte Niere bzw. Placebo) wurde eine Formel verwendet (siehe Abbildung 9). Dabei werden unter Berücksichtigung des Hintergrundwertes die Counts der ROI\_R ins Verhältnis zur Anzahl der Counts beider Nieren gesetzt.

$$\text{Nierenfunktion rechts} = \frac{(\text{ROI}_R - \text{ROI}_H)}{(\text{ROI}_R - \text{ROI}_H) + (\text{ROI}_L - \text{ROI}_H)} \quad [\%]$$

**Abbildung 9: Formel für die relative Nierenfunktion**

### 3.5 Statistische Datenanalyse

Die aus der ROI-Analyse gewonnenen Daten wurden in das Datenverarbeitungsprogramm EXCEL für Windows eingegeben. Nach Exportieren in das Programmsystem SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows (Version 12.0) erfolgte die statistische Auswertung.

Alle Daten wurden zunächst deskriptiv analysiert und auf fehlerhafte Eingaben, Extremwerte und Ausreißer untersucht. Für quantitative Merkmale wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte sowie der Median angegeben.

Die Prüfung quantitativ stetiger Merkmale auf Normalverteilung erfolgte mit dem Lilliefors-Test.

Um Unterschiede quantitativer Größen zwischen zwei abhängigen Stichproben zu prüfen wurde als nicht parametrisches Verfahren der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest verwendet.

Für die Analyse von Longitudinaldaten wurden lineare gemischte Modelle berechnet. Dieser Modellansatz erlaubt, als Vorteil gegenüber dem herkömmlichen linearen Modell, die Berücksichtigung zufälliger individuenspezifischer Effekte und Autokorrelationen die bei Longitudinaldaten eine erhebliche Rolle für die Schätzung von Kovariableneinflüssen spielen. Bei diesen Modellen wird davon ausgegangen, dass wiederholte Messungen innerhalb der Individuen korreliert sind, wohingegen die Beobachtungen zwischen verschiedenen Individuen als unabhängig betrachtet werden. Die Korrelation innerhalb der Individuen kann über die Annahme einer Korrelationsstruktur, je nach Datenlage und Fragestellung, präspezifiziert werden. Bei Longitudinaldaten stehen hier insbesondere so genannte „autoregressive“ (AR) Prozesse im Fordergrund, welche auch bei den Analysen in dieser Arbeit verwendet wurden.

Für die Analyse von Überlebenszeiten wurden Kaplan-Meier-Schätzungen für die Überlebensraten berechnet und als Treppenfunktionen dargestellt (Kaplan-Meier-Kurven). Vergleiche von Ereigniszeiten zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Gehan-Test vorgenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mortalität

Am Ende der Nachbeobachtungszeit von 43 Wochen waren einige Tiere verstorben. Führende Ursache hierfür waren radiogene Nebenwirkungen am Darm. Obduktionen an den verstorbenen Tieren ergaben häufig das makroskopische Bild eines mechanischen Ileus. Dabei war die Stenose entweder durch eine Schrumpfung des Dünndarmsegments selbst bedingt oder von außen durch peritoneale Bridenbildung mit konsekutiver Einklemmung.

Abbildung 10 zeigt die Abnahme der Gesamtzahl der Versuchstiere über die Zeit. Nach 43 Wochen waren 45 der 121 Tiere verstorben, was einer Gesamtmortalität von 37,2% entspricht.

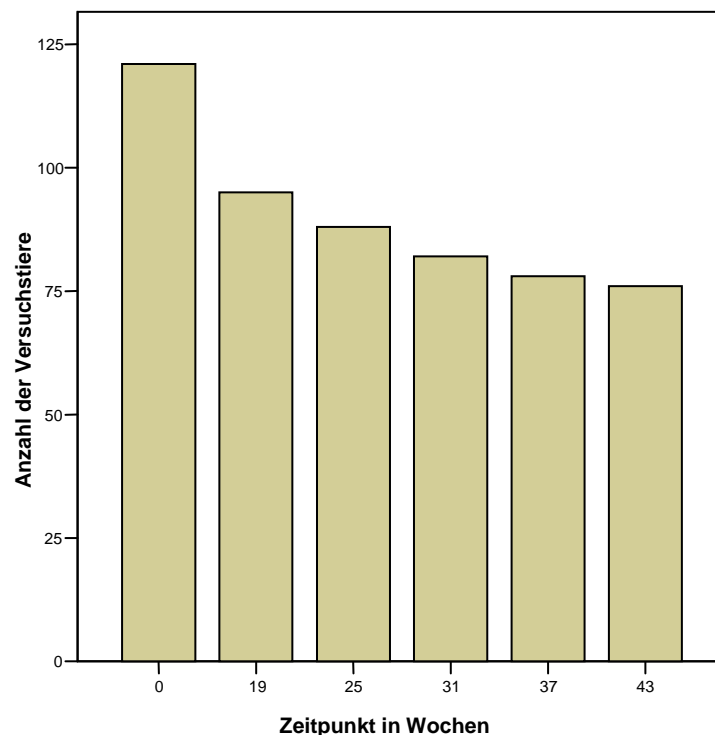


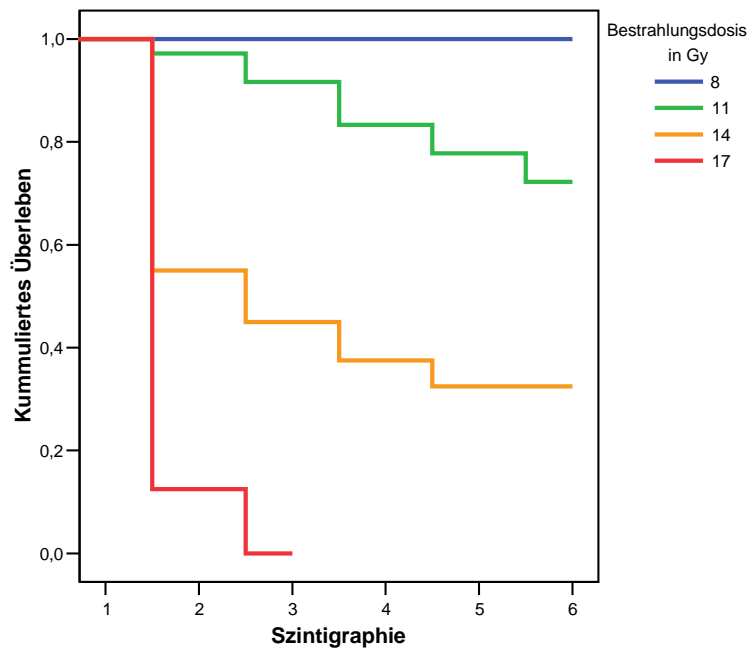
Abbildung 10: Versuchstierzahl

Der stärkste Einflussfaktor auf die Mortalität war die applizierte Stahldosis, unabhängig von der medikamentösen Behandlung.

Über den Beobachtungszeitraum von 43 Wochen betrug sie für alle unbestrahlten Tiere ( $n=11$ ) 0% (0/11). Für alle mit 8 Gy ( $n=26$ ) bestrahlten Tiere betrug sie ebenfalls 0% (0/26).

Mittels einer sterbetafelbasierten paarweisen Überlebensanalyse wurden die 11, 14 und 17 Gy Gruppen auf Unterschiede zur 8 Gy Gruppe untersucht. Für das Kollektiv der 11 Gy Tiere ( $n=36$ ) betrug die Mortalität 27,8% (10/36;  $p<0,004$ ), für das Kollektiv der 14 Gy Tiere ( $n=40$ ) 67,5% (27/40;  $p<0,001$ ) und für das der 17 Gy Tiere ( $n_0=8$ ) 100% (8/8;  $p<0,001$ ).

Es sei darauf hingewiesen, dass die Medikation als Kofaktor nicht zu gleichen Teilen auf alle Bestrahlungsgruppen verteilt war.



**Abbildung 11: Überlebensfunktion nach applizierter Strahlendosis**

Für die Medikation als Einflussgröße wurde auf die gleiche Weise eine sterbetafelbasierte paarweise Überlebensanalyse mit Wilcoxon-Gehan-Signifikanztestung durchgeführt. Bei den Tieren ohne Medikation ergab sich eine Mortalität über den Beobachtungszeitraum von 27,3% (9/33). Im Vergleich hierzu zeigten die p-Tyrosin-Tiere (Mortalität: 29,0% (9/31);  $p=0,684$ ) und die AVE 7688-Tiere aus den beiden AVE early und AVE late-Gruppen (Mortalität: 38,8% (19/49);  $p=0,189$ ) keinen signifikanten Unterschied.

Auf die ungleiche Verteilung der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen auf die Medikationsgruppen sei auch hier hingewiesen.

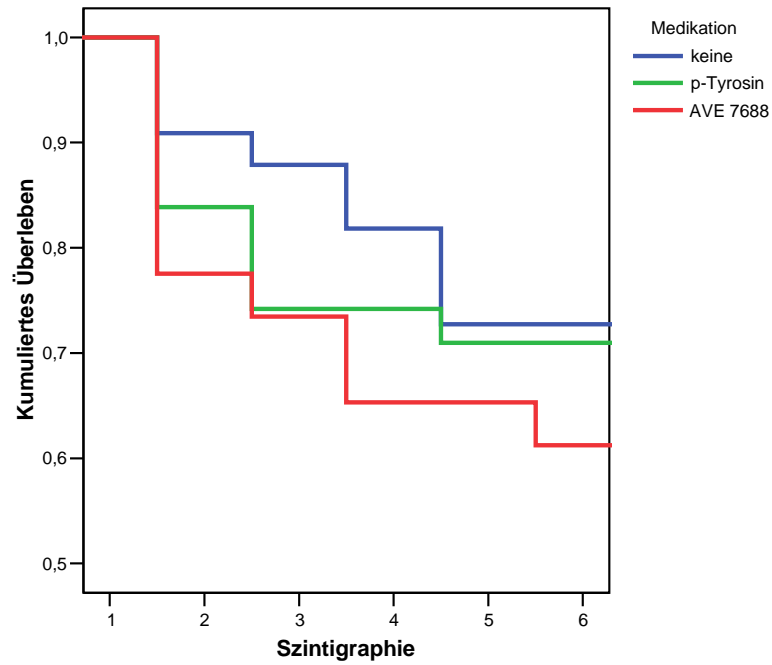
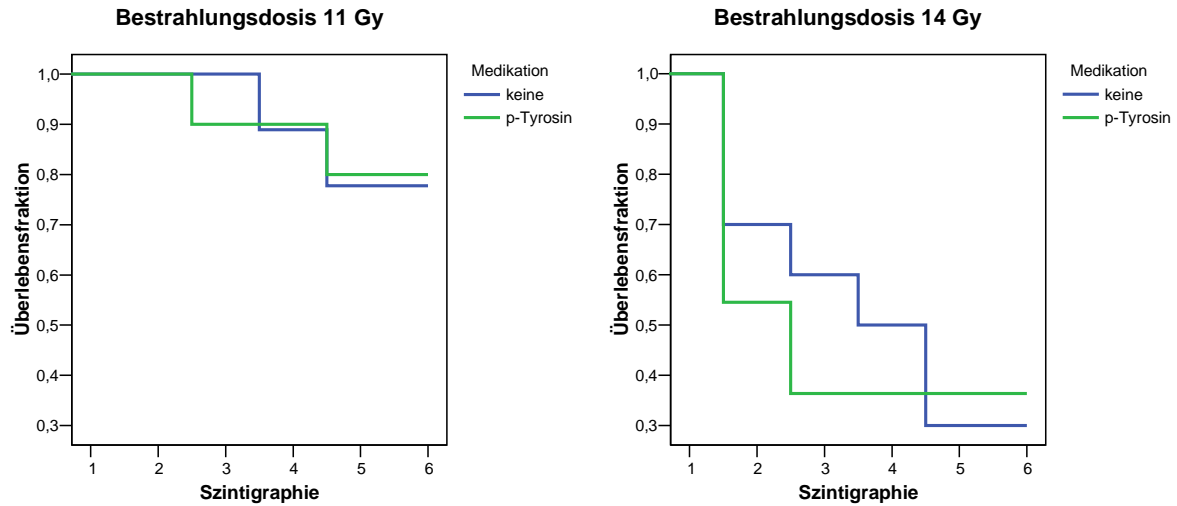


Abbildung 12: Überlebensfunktion nach Medikation



**Abbildung 13: Überleben der Kontrolltiere und p-Tyrosin-Tiere im Vergleich**  
 ( bei der Bestrahlungsdosis von 8 Gy überlebten alle Tiere den Beobachtungszeitraum)  
 links: bei der Bestrahlungsdosis von 11 Gy  
 rechts: bei der Bestrahlungsdosis von 14 Gy

## 4.2 Nierenszintigraphiewerte

### 4.2.1 Beurteilung des Therapieerfolges

Zur Beurteilung des Therapieerfolges wurden Nierenszintigraphien angefertigt, die funktionelle Vergleiche von bestrahlten Nieren mit unbestrahlten Nieren, sowie bestrahlter Nieren untereinander ermöglichen. Eine Bestrahlung wurde stets an der rechten Niere durchgeführt, die linke Niere blieb unbestrahlt. Damit fiel im Normalfall während der Nachbeobachtungszeit der Anteil der bestrahlten rechten Niere an der Gesamtnierenfunktion ab. Eine erfolgreiche medikamentöse Therapie müsste somit zu einem geringeren Abfallen der Nierenfunktion rechts, d.h. höheren Szintigraphiewerten der rechten Niere führen. Ein Vergleich dieser Werte mit denen der jeweiligen Gruppe ohne Medikation jedoch gleicher Dosis erlaubt eine Beurteilung des medikamentösen Therapieerfolges.



### 4.2.2 Ausgangswerte

Die Ausgangswerte wurden in der 1. Szintigraphie (Woche 0), d.h. 4( $\pm$ 2)Tage vor der Bestrahlung ermittelt. Sie sind als relative Werte der Nierenfunktion rechts zur Gesamtfunktion angegeben (in Prozent). Der Mittelwert betrug hierbei 53,8% bei einer Standardabweichung von 3,1%. Der kleinste Wert betrug 45,7%, der größte Wert 61,2%. Für den Ausgangswert konnte die Normalverteilungsannahme nach dem Lilliefors-Test, beibehalten werden (siehe auch Abbildung 14)

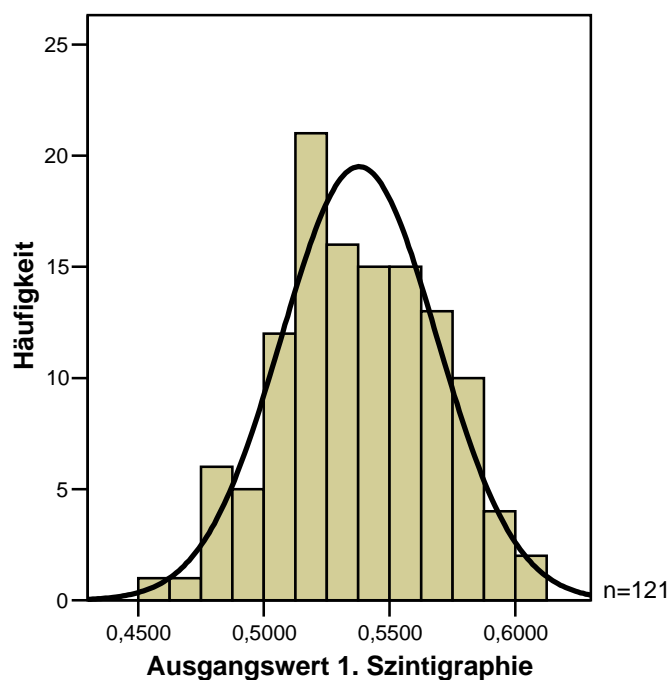


Abbildung 14: Normalverteilungsdigramm der Nierenszintigraphieausgangswerte

x-Achse: relative Nierenfunktion rechts; y-Achse: Anzahl der Tiere

### 4.2.3 Einschlusskriterien

Für das vorliegende Versuchsmodell war es von Bedeutung, dass alle Versuchstiere zwei normal entwickelte Nieren besitzen. Bei keinem der Tiere sollte eine Nierenfehlbildung wie z.B. eine Doppelniere, Hufeisenniere, ektope oder hypo-/hyperplastische Niere vorliegen. Für den Ausgangswert der rechten Niere wurde gefordert, dass er mindestens 1/3, jedoch höchstens 2/3 der Gesamtfunktion beider Nieren ausmacht. Diese Kriterien waren bei allen Versuchstieren erfüllt.

#### 4.2.4 Verlaufswerte

Nach der Messung des Ausgangswertes wurde die relative Funktion der rechten Niere (RNR) erstmals wieder 19 Wochen nach Bestrahlung gemessen, danach erfolgten 4 Messungen alle 6 Wochen.

##### 4.2.4.1 Kontrollgruppen

###### 4.2.4.1.1 Deskriptive Statistik

Die Gruppengröße lag in den Kontrollgruppen zu Beobachtungsbeginn zwischen 6 und 10 Tieren. Zum jeweiligen Szintigraphiezeitpunkt wurde aus den RNR-Werten der vorhandenen Individuen einer Gruppe der Mittelwert, Median, die Standardabweichung (s), Minima und Maxima berechnet. Diese Werte sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Gruppe		1. Szinti- graphie (Woche 0)	2. Szinti- graphie (Woche 19)	3. Szinti- graphie (Woche 25)	4. Szinti- graphie (Woche 31)	5. Szinti- graphie (Woche 37)	6. Szinti- graphie (Woche 43)
0 Gy Kontrolle	n	6	6	6	6	6	6
	Mittelwert	53,28%	53,61%	51,76%	54,97%	53,29%	51,77%
	Median	52,60%	53,86%	51,80%	54,63%	52,15%	52,21%
	s	4,87%	1,31%	1,84%	1,58%	3,95%	1,69%
	Minimum	48,27%	51,94%	48,85%	53,27%	48,96%	49,72%
	Maximum	60,98%	55,52%	54,52%	56,95%	58,71%	53,38%
8 Gy Kontrolle	n	8	8	8	8	8	8
	Mittelwert	52,16%	52,71%	49,02%	47,37%	47,19%	44,64%
	Median	51,25%	51,95%	48,83%	46,92%	46,82%	44,83%
	s	3,43%	2,29%	2,92%	2,38%	3,00%	3,31%
	Minimum	49,39%	50,70%	45,43%	43,91%	42,98%	39,04%
	Maximum	59,86%	57,57%	54,07%	51,40%	51,18%	47,97%
11 Gy Kontrolle	n	9	9	9	8	7	7
	Mittelwert	53,05%	47,81%	45,93%	37,77%	36,81%	35,23%
	Median	51,76%	49,09%	48,84%	44,08%	40,62%	38,95%
	s	2,45%	4,72%	10,20%	14,45%	11,79%	11,35%
	Minimum	50,71%	39,32%	19,67%	14,31%	11,02%	10,54%
	Maximum	57,43%	52,46%	54,14%	50,00%	45,90%	43,10%
14 Gy Kontrolle	n	10	7	6	5	3	3
	Mittelwert	53,80%	47,94%	42,38%	44,10%	40,39%	38,81%
	Median	53,58%	47,90%	42,34%	46,25%	43,33%	38,59%
	s	1,73%	3,56%	9,98%	5,70%	7,43%	8,24%
	Minimum	51,27%	43,35%	25,81%	33,98%	31,94%	30,68%
	Maximum	56,75%	54,20%	54,75%	47,61%	45,90%	47,16%

Tabelle 5: Lage- und Streuungsmaße der Kontrollgruppen

Eine graphische Darstellung der Verteilung und des Verlaufs der RNR-Werte liefert Abbildung 15. Das Boxplot-Diagramm enthält sechs Cluster entsprechend der sechs Szintigraphiezeitpunkte mit jeweils 4 Boxplots, deren Farbcodierung die unterschiedlichen Bestrahlungsdosen widerspiegeln

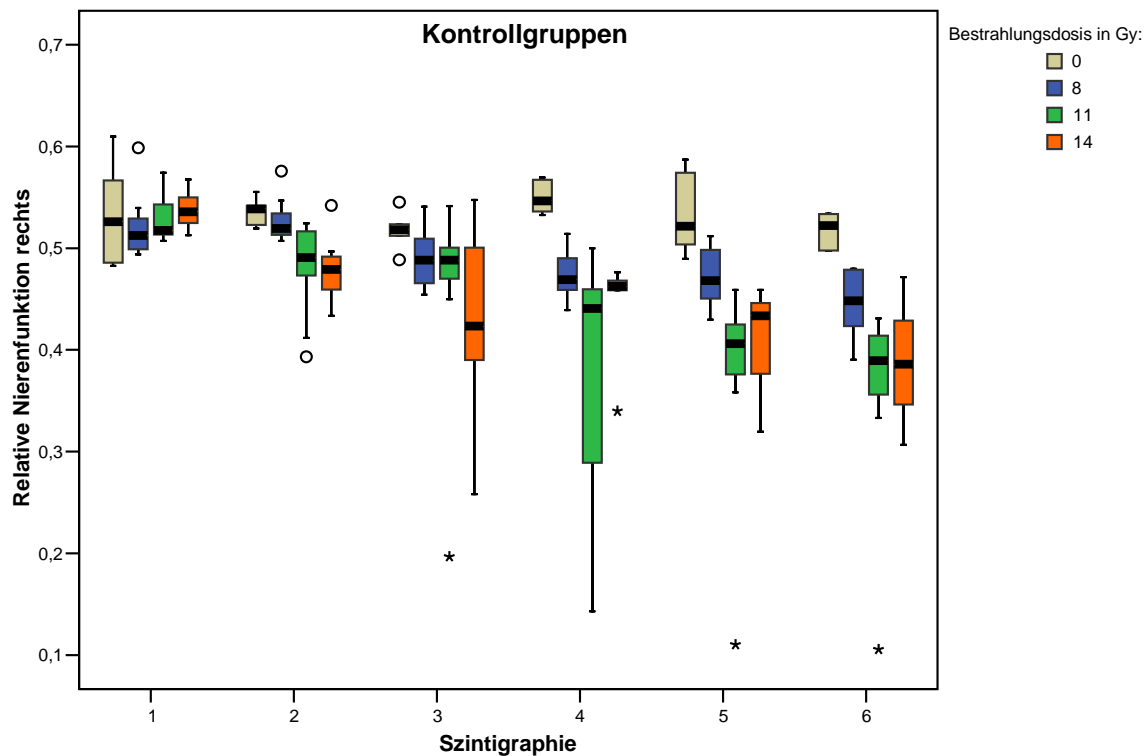


Abbildung 15: Kontrollgruppen - Boxplot-Diagramm

Es zeigt den Verlauf der RNR für jede der vier Kontrollgruppen von der Ausgangsszintigraphie (1) bis zur letzten Nachbeobachtungsszintigraphie. Kreise markieren Ausreißer, Sterne markieren Extremwerte.

#### 4.2.4.1.2 Induktive Statistik

Zunächst wurde untersucht, ob es in den Kontrollgruppen nach Bestrahlung zu einer signifikanten Abnahme der RNR kam. Dazu wurden getrennt nach Bestrahlungsdosis die Abweichungen der Werte der Nachbeobachtungsszintigraphien von den Ausgangsszintigraphien ermittelt. Diese Differenzen wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest für verbundene Stichproben auf Signifikanz überprüft (siehe Tabelle 6):

In der unbestrahlten Kontrollgruppe (0 Gy) fanden sich erwartungsgemäß keine signifikanten Veränderungen der RNR im Verlauf der Nachbeobachtungszeit. Die

8 Gy Gruppe zeigte von der 31. Woche an signifikante Abnahmen der Ausgangs-RNR (-4,79% nach 31 Wochen, -4,97% nach 37 Wochen, -7,52% nach 43 Wochen). Bei der 11 Gy Gruppe war dies schon nach 19 Wochen der Fall (-5,24% nach 19 Wochen, -7,12% nach 25 Wochen, -15,28% nach 31 Wochen, -16,24% nach 37 Wochen, -17,82% nach 43 Wochen). Die 14 Gy Gruppe zeigte in der ersten Nachbeobachtungsszintigraphie nach 19 Wochen eine signifikante Abweichung nach unten (-5,86%). Im weiteren Verlauf setzte sich dies jedoch nicht fort, was vermutlich an der dosisbedingten Mortalität der Versuchstiere mit konsekutiver Dezimierung des Stichprobenumfanges von 10 auf 3 liegt.

Kontrollgruppen		2. Szintigraphie (19 Wochen)	3. Szintigraphie (25 Wochen)	4. Szintigraphie (31 Wochen)	5. Szintigraphie (37 Wochen)	6. Szintigraphie (43 Wochen)
		- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)
Signifikanzen (p-Wert)	0 Gy	↑ 0,688(n=6)	↓ 0,563(n=6)	↑ 0,563(n=6)	↑ 1,000(n=6)	↓ 1,000(n=6)
	8 Gy	↑ 0,641(n=8)	↓ 0,148(n=8)	↓ <b>0,023</b> (n=8)	↓ <b>0,039</b> (n=8)	↓ <b>0,008</b> (n=8)
	11 Gy	↓ <b>0,008</b> (n=9)	↓ <b>0,008</b> (n=9)	↓ <b>0,008</b> (n=8)	↓ <b>0,016</b> (n=7)	↓ <b>0,016</b> (n=7)
	14 Gy	↓ <b>0,016</b> (n=7)	↓ 0,094(n=6)	↓ 0,063(n=5)	↓ 0,250(n=3)	↓ 0,250(n=3)

**Tabelle 6: Statistik des Wilcoxon-Vorzeichenrangtests für die Kontrollgruppen**

Angegeben sind die p-Werte auf 3 Dez. gerundet sowie der Stichprobenumfang n. Fett markiert sind auf einem Signifikanzniveau von 5% ( $p < 0,05$ ) signifikante Werte. Die Pfeilrichtung symbolisiert die Abweichung der RNR nach oben(↑) bzw. unten(↓).

#### 4.2.4.1.3 Zusammenfassung

Die unbestrahlte 0 Gy Kontrollgruppe zeigte im Zeitverlauf keine relevanten Schwankungen des Aktivitätsverhältnisses der rechten Niere zur linken Niere.

Die bestrahlten Kontrollgruppen zeigten ein dosis- und zeitabhängiges Änderungsverhalten der RNR.

So war der RNR-Median bei den Nachbeobachtungsszintigraphien in überwiegender Mehrheit kleiner gegenüber dem vorhergehenden Wert.

Mit steigender Dosis wurde die Abnahme in der RNR tendentiell stärker, wobei die Dosissteigerung von 11 auf 14 Gy die RNR keine große Änderung mehr hervorrief.

Ein Problem stellt die mit der Bestrahlungsdosis ansteigende Mortalität dar. Sie reduzierte den Stichprobenumfang in der 14 Gy-Gruppe im Zeitverlauf auf nur drei Versuchstiere.

#### 4.2.4.2 P-Tyrosin-Gruppen

##### 4.2.4.2.1 Deskriptive Statistik

Die Gruppengröße lag in den p-Tyrosin-Gruppen bei Beobachtungsbeginn zwischen 8 und 11 Tieren. Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen (s), Minima und Maxima sind aus Tabelle 7 ersichtlich. In der 17 Gy p-Tyrosin-Gruppe war im Zusammenhang mit der hohen dosisbedingten Toxizität bei der ersten Nachbeobachtungsszintigraphie nur noch ein, ab der zweiten gar kein Versuchstier mehr am Leben.

Gruppe		1. Szinti- graphie (Woche 0)	2. Szinti- graphie (Woche 19)	3. Szinti- graphie (Woche 25)	4. Szinti- graphie (Woche 31)	5. Szinti- graphie (Woche 37)	6. Szinti- graphie (Woche 43)
8 Gy p-Tyrosin	n	10	10	10	10	10	10
	Mittelwert	53,50%	52,53%	50,75%	48,78%	48,71%	46,35%
	Median	52,19%	52,39%	51,37%	48,59%	48,32%	47,58%
	s	3,55%	2,22%	4,04%	4,31%	7,23%	7,87%
	Minimum	49,81%	49,71%	42,64%	40,88%	36,67%	29,54%
	Maximum	59,13%	56,69%	56,89%	57,48%	63,57%	59,67%
11 Gy p-Tyrosin	n	10	10	9	9	8	8
	Mittelwert	52,86%	48,31%	45,43%	41,01%	36,99%	34,45%
	Median	52,60%	48,00%	47,08%	43,67%	41,54%	39,12%
	s	3,43%	3,89%	4,94%	11,44%	11,23%	12,89%
	Minimum	47,46%	40,99%	37,83%	21,54%	16,53%	9,50%
	Maximum	58,12%	54,18%	52,55%	53,15%	47,68%	48,93%
14 Gy p-Tyrosin	n	11	6	4	4	4	4
	Mittelwert	53,08%	49,35%	44,73%	43,59%	43,88%	42,75%
	Median	53,45%	50,15%	46,58%	45,77%	46,09%	43,04%
	s	3,02%	2,95%	5,49%	5,81%	7,44%	5,65%
	Minimum	48,49%	43,66%	36,92%	35,24%	33,47%	35,61%
	Maximum	57,40%	51,91%	48,82%	47,61%	49,86%	49,33%
17 Gy p-Tyrosin	n	8	1	0	0	0	0
	Mittelwert	52,62%	(46,71%)	---	---	---	---
	Median	52,70%	(46,71%)	---	---	---	---
	s	3,48%	---	---	---	---	---
	Minimum	45,72%	46,71%	---	---	---	---
	Maximum	57,02%	46,71%	---	---	---	---

**Tabelle 7: Lage- und Streuungsmaße der p-Tyrosin-Gruppen**

Die graphische Darstellung der RNR-Werte für die p-Tyrosin-Gruppen findet sich als Boxplot-Diagramm in Abbildung 16. Für die 17 Gy p-Tyrosin-Gruppe sind ab der dritten Szintigraphie keine Boxplots mehr angegeben, da aufgrund der hohen Toxizität der 17 Gy-Dosis die Versuchstierzahl n=0 betrug.

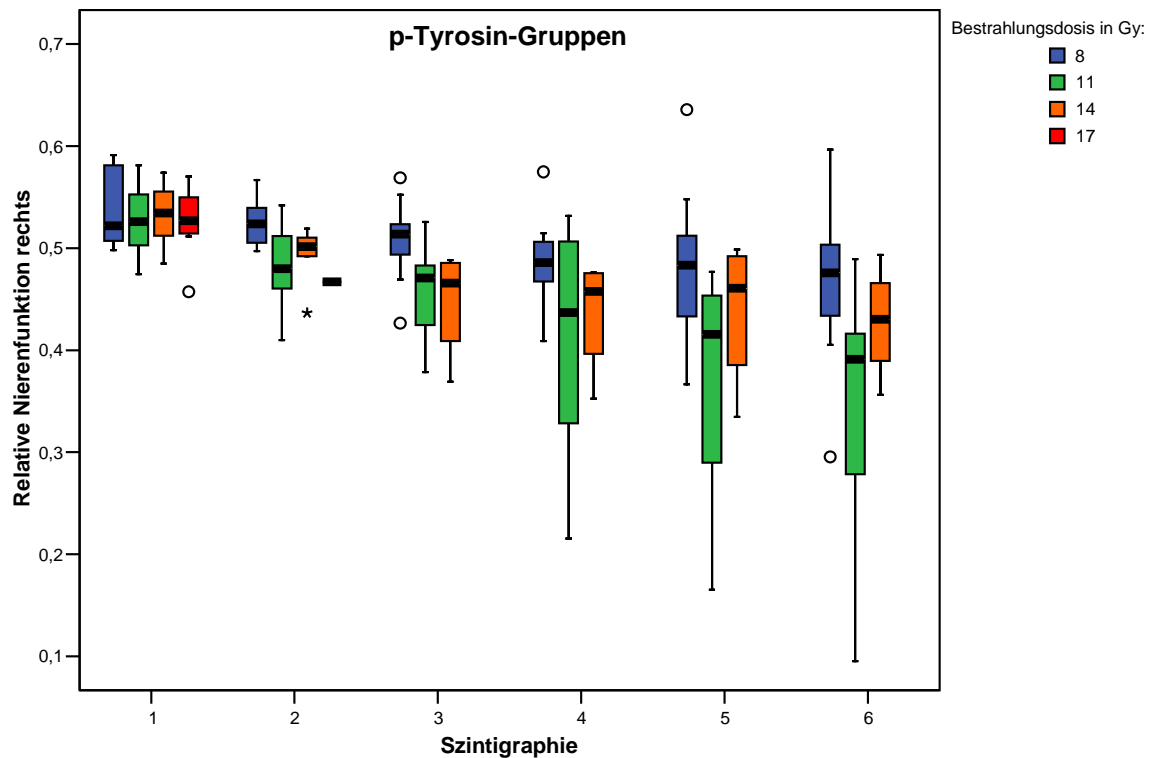


Abbildung 16: p-Tyrosin-Gruppen - Boxplot-Diagramm

Es zeigt den Verlauf der RNR für jede der vier p-Tyrosin-Gruppen. Kreise markieren Ausreißer, Sterne markieren Extremwerte.

#### 4.2.4.2.2 Induktive Statistik

Die Überprüfung mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest auf Signifikanz der Abnahmen der RNR im Vergleich zum Ausgangswert ergab ein inhomogenes Bild (siehe Tabelle 8).

Die 17 Gy-Gruppe entzog sich der statistischen Analyse aufgrund der hohen und früh auftretenden Mortalität komplett.

In der 8 Gy und der 11 Gy-Gruppe waren schon nach der zweiten Nachbeobachtungsszintigraphie deutlich signifikante RNR-Abnahmen messbar.

Die 14 Gy-Gruppe hingegen lieferte keine signifikanten Abnahmen der RNR. Bei dem reduzierten Stichprobenumfang von 6 bzw. 4 Tieren ist eine radioprotektive Wirkung des p-Tyrosins in dieser Bestrahlungsgruppe statistisch nicht sicher.

p-Tyrosin-Gruppen		2. Szintigraphie (19 Wochen)	3. Szintigraphie (25 Wochen)	4. Szintigraphie (31 Wochen)	5. Szintigraphie (37 Wochen)	6. Szintigraphie (43 Wochen)
		- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)	- 1. Szintigraphie (0 Wochen)
Signifikanzen (p-Wert)	8 Gy	↓ 0,232(n=10)	↓ <b>0,027</b> (n=10)	↓ <b>0,002</b> (n=10)	↓ <b>0,049</b> (n=10)	↓ <b>0,006</b> (n=10)
	11 Gy	↓ <b>0,006</b> (n=10)	↓ <b>0,004</b> (n= 9)	↓ <b>0,004</b> (n= 9)	↓ <b>0,008</b> (n= 8)	↓ <b>0,008</b> (n= 8)
	14 Gy	↓ 0,438(n= 6)	↓ 0,250(n= 4)	↓ 0,125(n= 4)	↓ 0,250(n= 4)	↓ 0,250(n= 4)
	17 Gy	↓ --- (n= 1)	--- (n= 0)	--- (n= 0)	--- (n= 0)	--- (n= 0)

**Tabelle 8: Statistik des Wilcoxon-Vorzeichenrangtests für die p-Tyrosin-Gruppen**

Angegeben sind die p-Werte auf 3 Dez. gerundet sowie der Stichprobenumfang n. Fett markiert sind auf einem Signifikanzniveau von 5% ( $p < 0,05$ ) signifikante Werte. Die Pfeilrichtung symbolisiert die Abweichung der RNR nach oben(↑) bzw. unten(↓).

Zur Beurteilung, ob sich unter p-Tyrosin-Gabe ein Therapieerfolg einstellt, wurde eine Varianzanalyse mit Kovariablenberücksichtigung durchgeführt. Mit diesem Ansatz ist es möglich, mehrere Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen und zu untersuchen, ob sich diese Fallgruppen in den Durchschnittswerten einzelner Variablen voneinander unterscheiden. Als abhängige Variable wurde der Szintigraphiewert [Szintigraphie] gewählt, als Faktor die Gruppe und als Kovariate die Zeit. Das dabei verwendete linear gemischte Modell zur Analyse wiederholter Messungen ergab folgende Ergebnisse (Tabelle 9; die 17 Gy p-Tyrosin-Gruppe wurde in Ermangelung einer Kontrollgruppe weggelassen):

Die Zeit als Kovariate hatte einen signifikanten ( $p < 0,001$ ) Einfluss auf den Szintigraphiewert in allen drei Bestrahlungsgruppen. Demnach beträgt für die Szintigraphiewerte der Nachbeobachtungsszintigraphien die durchschnittliche Abnahme pro Woche 0,12% (8 Gy-Gruppe) bis 0,40% (11 Gy-Gruppe).

Der Vergleich der 8, 11 und 14 Gy p-Tyrosin-Gruppen mit ihren jeweiligen Kontrollgruppen als Referenz liefert hingegen keine signifikanten Unterschiede des RNR-Verlaufs. Für die 8 Gy p-Tyrosin-Gruppe ergab sich bei der Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied in der RNR im Vergleich zur 8 Gy Kontrollgruppe (+1,4%,  $p = 0,439$ ). Gleiches gilt für die 11 Gy p-Tyrosin-Gruppe (+0,4%,  $p = 0,891$ ) und die 14 Gy p-Tyrosin-Gruppe (+0,9%,  $p = 0,586$ ). Somit konnte für den Verlauf der Nierenszintigraphiewerte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den p-Tyrosin medizierten und den Kontrollgruppen nachgewiesen werden.

## Schätzung von festen Effekten

Bestrahlungsdosis in Gy	Parameter	Schätzung	Signifikanz	Konfidenzintervall 95%	
				Untergrenze	Obergrenze
8	Konstanter Term	,5147009	,000	,4842793	,5451225
	Zeit	-,0012138	<b>,000</b>	-,0017970	-,0006305
	p-Tyrosin-Gruppe	,0139481	<b>,439</b>	-,0233114	,0512076
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.
11	Konstanter Term	,5254025	,000	,4726894	,5781156
	Zeit	-,0039916	<b>,000</b>	-,0052667	-,0027166
	p-Tyrosin-Gruppe	,0041515	<b>,891</b>	-,0578521	,0661551
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.
14	Konstanter Term	,5275326	,000	,4996540	,5554111
	Zeit	-,0028068	<b>,000</b>	-,0036572	-,0019563
	p-Tyrosin-Gruppe	,0091230	<b>,586</b>	-,0249009	,0431469
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.

a. Dieser redundante Parameter wird auf null gesetzt.

b. Abhängige Variable: Szintigraphie .

**Tabelle 9: Varianzanalyse der p-Tyrosin-Gruppen**

#### 4.2.4.2.3 Zusammenfassung

Die p-Tyrosin-Tiere wurden mit vier verschiedenen Dosisstufen bestrahlt, wobei die 8 Gy und die 11 Gy-Gruppe signifikante Abnahmen zum Ausgangswert zeigten. Für die beiden Gruppen mit 14 und 17 Gy konnte kein signifikanter Rückgang gezeigt werden. Dies liegt jedoch wahrscheinlich an der mortalitätsbedingten Reduzierung der Fallzahl in diesen Gruppen.

Die Varianzanalyse mit Kovariablenberücksichtigung konnte für keine der p-Tyrosin-Gruppen einen signifikanten Unterschied auf die RNR im Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe feststellen. Das bedeutet, dass p-Tyrosin in diesem Tiermodell die Aktivität der bestrahlten Nieren nicht nachweisbar positiv oder negativ beeinflusst.



### **4.2.4.3 AVE 7688-Gruppen**

#### *4.2.4.3.1 Deskriptive Statistik*

Die Gruppengröße lag in den AVE 7688 - Gruppen zwischen 5 und 10 Tieren. Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen (s), Minima und Maxima sind aus Tabelle 10 ersichtlich. Auch bei den AVE 7688 - Gruppen trat in den 14 Gy Gruppen eine hohe Mortalität auf, sodass am Ende des Beobachtungszeitraumes nur noch 4 (AVE early) bzw. 2 (AVE late) Versuchstiere auswertbar waren.

Die RNR-Werte für die AVE 7688-Gruppen sind als Boxplot-Diagramme in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

Gruppe		1. Szinti- graphie (Woche 0)	2. Szinti- graphie (Woche 19)	3. Szinti- graphie (Woche 25)	4. Szinti- graphie (Woche 31)	5. Szinti- graphie (Woche 37)	6. Szinti- graphie (Woche 43)
0 Gy AVE 7688	n	5	5	5	5	5	5
	Mittelwert	55,65%	51,22%	52,65%	53,23%	51,18%	50,57%
	Median	54,63%	51,82%	52,88%	52,56%	51,22%	49,53%
	s	3,28%	1,44%	2,77%	1,94%	2,56%	2,20%
	Minimum Maximum	52,43% 59,43%	48,72% 52,32%	49,62% 56,50%	51,72% 56,63%	47,94% 54,44%	48,41% 53,28%
8 Gy AVE 7688 early	n	8	8	8	8	8	8
	Mittelwert	53,30%	46,60%	45,22%	46,25%	47,43%	45,30%
	Median	53,92%	46,94%	45,77%	45,76%	48,64%	47,10%
	s	3,28%	5,23%	5,77%	5,08%	5,92%	6,44%
	Minimum Maximum	48,64% 57,84%	37,02% 52,62%	36,59% 53,09%	40,49% 53,53%	39,20% 56,64%	35,73% 53,56%
11 Gy AVE 7688 early	n	8	8	8	7	7	7
	Mittelwert	55,64%	43,49%	40,21%	40,44%	41,08%	39,29%
	Median	55,12%	48,01%	45,16%	42,61%	44,86%	40,63%
	s	3,09%	8,71%	8,93%	9,51%	10,69%	9,58%
	Minimum Maximum	52,19% 61,17%	31,05% 51,08%	27,37% 48,28%	26,93% 52,18%	27,44% 53,82%	27,36% 52,23%
14 Gy AVE 7688 early	n	9	4	4	4	4	4
	Mittelwert	55,49%	49,01%	49,88%	48,14%	48,38%	47,81%
	Median	56,47%	47,49%	49,88%	46,98%	47,69%	47,39%
	s	3,09%	4,93%	2,99%	4,91%	4,86%	4,24%
	Minimum Maximum	48,01% 58,48%	45,32% 55,75%	46,31% 53,44%	43,80% 54,80%	43,24% 54,90%	43,22% 53,21%
11 Gy AVE 7688 late	n	9	8	7	6	6	4
	Mittelwert	54,94%	50,19%	46,09%	40,62%	39,55%	44,82%
	Median	55,08%	50,94%	46,92%	45,38%	45,67%	44,95%
	s	1,92%	2,92%	7,14%	13,39%	14,29%	4,47%
	Minimum Maximum	50,84% 57,60%	43,27% 52,47%	31,93% 55,72%	13,80% 50,24%	11,18% 49,26%	39,25% 50,15%
14 Gy AVE 7688 late	n	10	5	4	2	2	2
	Mittelwert	54,35%	46,20%	39,78%	39,65%	37,76%	33,43%
	Median	54,04%	47,17%	39,41%	39,65%	37,76%	33,43%
	s	2,22%	3,46%	8,46%	12,01%	10,65%	12,88%
	Minimum Maximum	51,98% 57,77%	41,30% 50,09%	30,68% 49,63%	31,16% 48,14%	30,23% 45,29%	24,32% 42,54%

Tabelle 10: Lage- und Streuungsmaße der AVE 7688-Gruppen

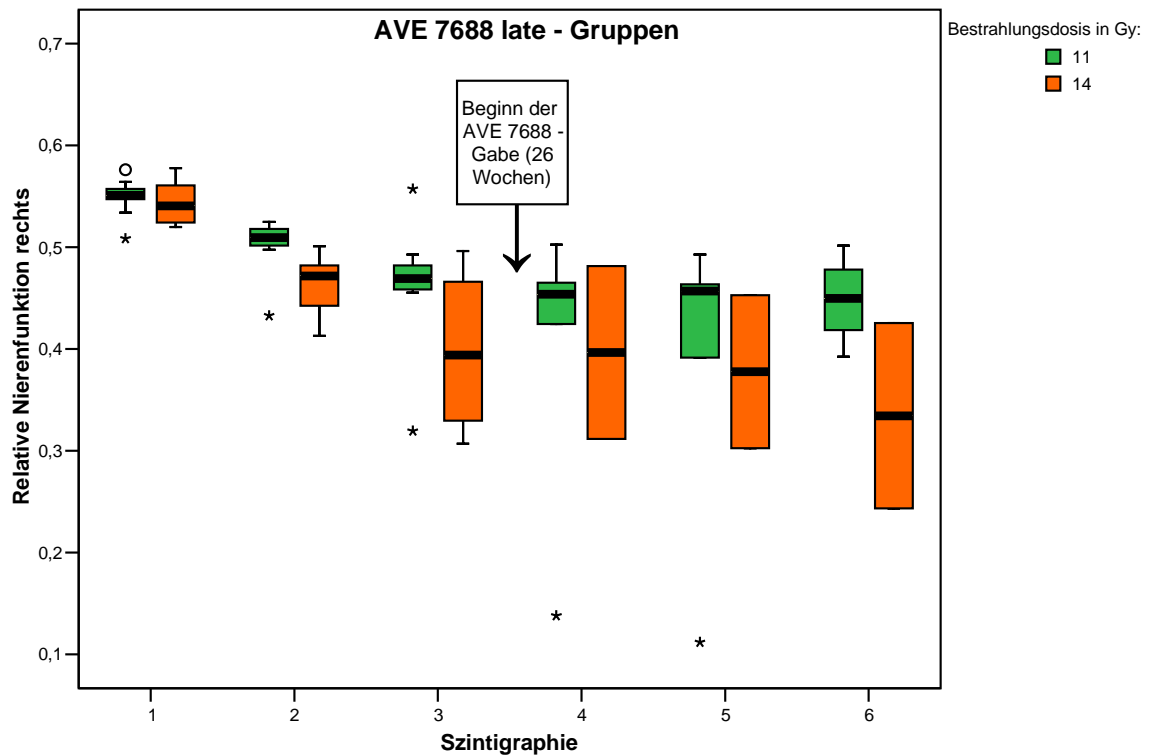
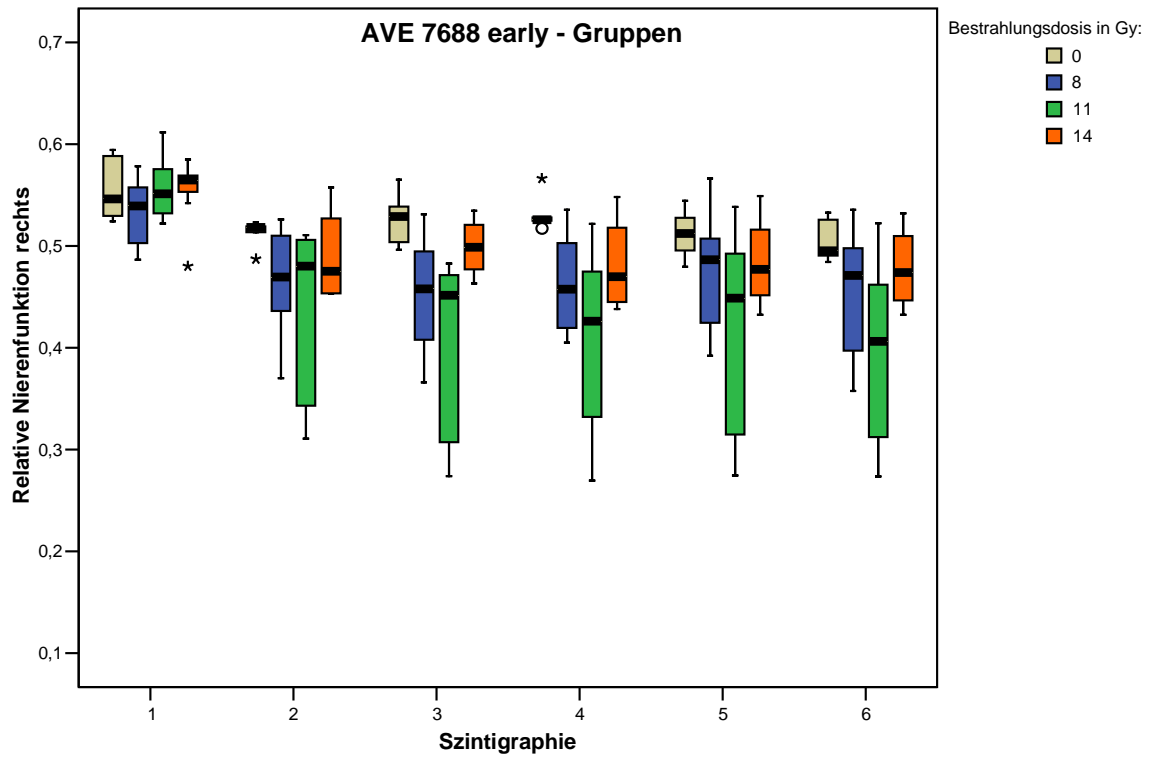


Abbildung 17: AVE 7688 - Gruppen - Boxplot-Diagramme

Oben: AVE 7688 early-Gruppen; unten: AVE 7688 late-Gruppen

Kreise markieren Ausreißer, Sterne markieren Extremwerte.

#### 4.2.4.3.2 Induktive Statistik

Zum Vergleich der Nachbeobachtungswerte mit den Ausgangswerten wurde wieder der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest verwendet (siehe Tabelle 11).

In der 0 Gy AVE early - Gruppe konnte erwartungsgemäß keine signifikante Abnahme der RNR gemessen werden (RNR 19 Wochen: 51,2% (-4,5%,  $p=0,063$ ); RNR 25 Wochen: 52,7% (-3,0%,  $p=0,188$ ); RNR 31 Wochen: 53,2% (-2,5%,  $p=0,483$ ); RNR 37 Wochen: 51,2% (-4,5%,  $p=0,063$ ); RNR 43 Wochen: 50,6% (-5,1%,  $p=0,063$ )).

Die 8 Gy AVE early – Gruppe zeigte in 4 von 5 Nachbeobachtungsszintigraphien signifikant kleinere Werte im Vergleich zum Ausgangswert (RNR 19 Wochen: 46,6% (-6,7%,  $p=0,016$ ); RNR 25 Wochen: 45,2% (-8,1%,  $p=0,016$ ); RNR 31 Wochen: 46,3% (-7,0%,  $p=0,039$ ); RNR 43 Wochen: 45,3% (-8,0%,  $p=0,023$ )).

Die 11 Gy AVE early - Gruppe zeigte in allen Nachbeobachtungsszintigraphien signifikante Abnahmen (RNR 19 Wochen: 43,5% (-12,1%,  $p=0,008$ ); RNR 25 Wochen: 40,2% (-15,4%,  $p=0,008$ ); RNR 31 Wochen: 40,4% (-15,2%,  $p=0,016$ ); RNR 37 Wochen: 41,1% (-14,5%,  $p=0,016$ ); RNR 43 Wochen: 39,3% (-16,3%,  $p=0,016$ )).

Die 14 Gy AVE early - Gruppe lieferte keine signifikanten Abnahmen der RNR (RNR 19 Wochen: 49,0% (-5,5%,  $p=0,250$ ); RNR 25 Wochen: 49,9% (-5,1%,  $p=0,125$ ); RNR 31 Wochen: 48,1% (-7,4%,  $p=0,125$ ); RNR 37 Wochen: 48,4% (-7,1%,  $p=0,125$ ); RNR 43 Wochen: 47,8% (-7,7%,  $p=0,125$ )).

Die beiden AVE late – Gruppen verhalten sich ähnlich wie die entsprechenden AVE early – Gruppen. Der Stichprobenumfang der 14 Gy AVE late – Gruppe ( $n=2$ ) wurde gegen Ende der Beobachtungszeit sehr klein. Eine zuverlässige statistische Aussage über diese Gruppe lässt sich daher nicht treffen.

AVE 7688-Gruppen		2. Szintigraphie (19 Wochen) - 1. Szintigraphie (0 Wochen)	3. Szintigraphie (25 Wochen) - 1. Szintigraphie (0 Wochen)	4. Szintigraphie (31 Wochen) - 1. Szintigraphie (0 Wochen)	5. Szintigraphie (37 Wochen) - 1. Szintigraphie (0 Wochen)	6. Szintigraphie (43 Wochen) - 1. Szintigraphie (0 Wochen)
Signifikanzen (p-Wert)	0 Gy AVE early	↓ 0,063(n=5)	↓ 0,188(n=5)	↓ 0,438(n=5)	↓ 0,063(n=5)	↓ 0,063(n=5)
	8 Gy AVE early	↓ <b>0,016</b> (n=8)	↓ <b>0,016</b> (n=8)	↓ <b>0,039</b> (n=8)	↓ 0,055(n=8)	↓ <b>0,023</b> (n=8)
	11 Gy AVE early	↓ <b>0,008</b> (n=8)	↓ <b>0,008</b> (n=8)	↓ <b>0,016</b> (n=7)	↓ <b>0,016</b> (n=7)	↓ <b>0,016</b> (n=7)
	14 Gy AVE early	↓ 0,250(n=4)	↓ 0,125(n=4)	↓ 0,125(n=4)	↓ 0,125(n=4)	↓ 0,125(n=4)
	11 Gy AVE late	↓ <b>0,008</b> (n=8)	↓ <b>0,031</b> (n=7)	↓ <b>0,031</b> (n=6)	↓ <b>0,031</b> (n=6)	↓ 0,125(n=4)
	14 Gy AVE late	↓ 0,063(n=5)	↓ 0,125(n=4)	↓ 0,500(n=2)	↓ 0,500(n=2)	↓ 0,500(n=2)

**Tabelle 11: Statistik des Wilcoxon-Vorzeichenrangtests für die AVE 7688-Gruppen**

Angegeben sind die p-Werte auf 3 Dez. gerundet sowie der Stichprobenumfang n. Fett markiert sind auf einem Signifikanzniveau von 5% ( $p < 0,05$ ) signifikante Werte. Die Pfeilrichtung symbolisiert die Abweichung der RNR nach oben(↑) bzw. unten(↓).

Zur Beurteilung eines möglichen Therapieerfolgs von AVE 7688 wurde wieder eine Varianzanalyse nach dem bereits für p-Tyr verwendeten Schema durchgeführt. Die Ergebnisse der vier AVE early und der zwei AVE late – Gruppen sind aus Tabelle 12 ersichtlich und im Folgenden zusammengefasst.

Bei den unbestrahlten Tieren ergab die Varianzanalyse, dass die Gabe von AVE 7688 alleine keinen signifikanten Einfluß auf das Verhältnis der Funktion rechter zu linker Niere und damit auch der RNR hat (RNR: -0,6%,  $p=0,437$ ).

In allen bestrahlten AVE 7688-Gruppen (8, 11, 14 Gy) zeigte die Zeit als Kovariate einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,001$ ) auf den Szintigraphiewert im Sinne einer Abnahme der RNR (zwischen -0,17%/Woche in der 8 Gy AVE early-Gruppe und -0,39%/Woche in der 14 Gy AVE late-Gruppe).

Für die 8 und 11 Gy AVE early - Gruppen sowie für die beiden AVE late – Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den korrespondierenden Kontrollgruppen.

Nur für die 14 Gy AVE early – Gruppe konnte die Varianzanalyse einen signifikanten Vorteil gegenüber der unmedizierten Kontrollgruppe nachweisen (RNR +3,9%,  $p=0,031$ , Konfidenzintervall [0,00397; 0,07394]).

## Schätzung von festen Effekten

Bestrahlungsdosis in Gy	Parameter	Schätzung	Signifikanz	Konfidenzintervall 95%	
				Untergrenze	Obergrenze
0	Konstanter Term	,5457403	,000	,5284860	,5629945
	AVE 7688	-,0062303	<b>,437</b>	-,0227581	,0102975
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.
8	Konstanter Term	,5288904	,000	,5013957	,5563852
	Zeit	-,0017413	<b>,000</b>	-,0023939	-,0010887
	AVE 7688 early	-,0058434	<b>,712</b>	-,0384684	,0267816
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.
11	Konstanter Term	,5318666	,000	,4785644	,5851689
	Zeit	-,0042662	<b>,000</b>	-,0056164	-,0029161
	AVE 7688 early	,0193206	<b>,540</b>	-,0452067	,0838479
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.
14	Konstanter Term	,5256942	,000	,4977255	,5536629
	Zeit	-,0027221	<b>,000</b>	-,0036047	-,0018395
	AVE 7688 early	,0389562	<b>,031</b>	,0039688	,0739436
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.

a. Dieser redundante Parameter wird auf null gesetzt.

b. Abhängige Variable: Szintigraphie .

Tabelle 12: Varianzanalyse der AVE 7688 early-Gruppen

## Schätzung von festen Effekten

Bestrahlungsdosis in Gy	Parameter	Schätzung	Signifikanz	Konfidenzintervall 95%	
				Untergrenze	Obergrenze
11	Konstanter Term	,5207624	,000	,4671322	,5743926
	Zeit	-,0037747	<b>,000</b>	-,0051509	-,0023984
	AVE 7688 late	,0316668	<b>,321</b>	-,0332815	,0966150
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.
14	Konstanter Term	,5460340	,000	,5134902	,5785777
	Zeit	-,0038940	<b>,000</b>	-,0049280	-,0028601
	AVE 7688 late	-,0139867	<b>,495</b>	-,0556341	,0276607
	Kontrollgruppe	0 <sup>a</sup>	.	.	.

a. Dieser redundante Parameter wird auf null gesetzt.

b. Abhängige Variable: Szintigraphie .

Tabelle 13: Varianzanalyse der AVE 7688 late-Gruppen

#### 4.2.4.3.3 Zusammenfassung

Die unbestrahlte 0 Gy AVE 7688 - Gruppe zeigte keine relevanten Schwankungen des Aktivitätsverhältnisses der rechten Niere zur linken Niere.

Für die 8 Gy und die 11 Gy AVE early – Gruppe konnte in der Mehrzahl der Nachbeobachtungsszintigraphien eine signifikante Abnahme zum Ausgangswert ermittelt werden. Der Vergleich zu den jeweiligen ausschließlich bestrahlten Kontrollgruppen zeigte keine signifikanten Abweichungen.

Für die 11 Gy und die 14 Gy AVE late – Gruppe zeigte die Varianzanalyse ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Vergleichsgruppe

In der 14 Gy AVE early – Gruppe konnten keine signifikanten Abnahmen zur Ausgangsfunktion gemessen werden.

Die durchgeführte Varianzanalyse spricht bei einer Bestrahlungsdosis von 14 Gy für einen gewissen AVE 7688 vermittelten positiven Effekt. Es zeigte sich ein signifikant höherer RNR gegenüber der unmedizierten Kontrollgruppe (RNR der 14 Gy AVE early – Gruppe: +3,9%,  $p=0,031$ ). Dies bedeutet also, dass bei einer Bestrahlungsdosis von 14 Gy die frühe Gabe von AVE 7688 zu statistisch messbar höheren Szintigraphiewerten für die bestrahlten Nieren führt.

## 5 Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war die präklinische Prüfung des radioprotektiven Potentials von p-Tyrosin und AVE 7688 in der Beeinflussung einer Strahlennephropathie. Vorhergehende in vitro und in vivo – Studien haben Hinweise ergeben, dass diese Substanzen einen günstigen Einfluss auf fibrosierende Krankheitsprozesse nehmen können. Deshalb sollten p-Tyrosin und AVE 7688 in dem hier verwendeten Modell zur Strahlennephropathie geprüft werden.

Die Strahlennephropathie beim Menschen spielt eine Rolle bei der Bestrahlung abdomineller Tumoren und bei Ganzkörperbestrahlungen, wie man sie vor Knochenmarktransplantationen, die immer häufiger werden, anwendet (30). Jährlich erhalten in Deutschland ca. 2500 Patienten eine Knochenmarktransplantation (weltweit ca. 20.000/Jahr), davon ca. 650 Patienten mit vorhergehender Ganzkörperbestrahlung. Von diesen tragen wiederum rund 30 % langfristig eine Störung der Nierenfunktion davon (28; 29).

Als Modell für die Strahlennephropathie diente uns die unilaterale Nierenbestrahlung von C3H-Mäusen mit darauffolgender regelmäßiger Kontrolle der Nierenfunktion durch  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Szintigraphien.

P-Tyrosin hatte in unserem Modell keinen positiven Einfluss auf den Erhalt der Nierenfunktion nach Bestrahlung. Die Substanz wurde zweimal vor der Bestrahlung in einer Dosierung von 7 mg pro kg Körpergewicht appliziert.

Bei den 8 Gy und 11 Gy p-Tyrosin-Gruppen betrug bei der letzten Nachbeobachtungsszintigraphie die Gruppengröße noch 10 bzw. 8 Tiere, was als ausreichender Stichprobenumfang für eine sinnvolle statistische Auswertung angesehen werden darf. Man kann also mit hinreichender Sicherheit sagen, dass p-Tyrosin in einer Dosierung von 7mg pro kg Körpergewicht bei den von uns verwendeten Bestrahlungsdosen keinen statistisch nachweisbaren Effekt auf die Nierenfunktion hat. Mit unseren Untersuchungen lässt sich jedoch nicht ausschliessen, dass p-Tyrosin in einer anderen Dosierung oder einem anderen



Verabreichungsschema eine Wirkung entfalten kann. Die 14 Gy p-Tyrosin-Gruppe hatte schon bei der 2. Nachbeobachtungsszintigraphie nur noch eine Gruppengröße von 4 Tieren. Daher fällt die Beurteilung schwer, warum kein Unterschied zwischen der 14 Gy p-Tyrosin-Gruppe und der 14 Gy Kontrollgruppe festzustellen war. Ob dieser durch die geringe Gruppengröße oder einen fehlenden Effekt des p-Tyrosins begründet ist, bleibt damit offen. Da in den beiden p-Tyrosin-Gruppen mit niedrigerer Bestrahlungsdosis bei größerem Stichprobenumfang die p-Tyrosin-Medikation ebenfalls keine Wirkung zeigte, kann man zumindest vermuten, dass p-Tyrosin auch bei einer Bestrahlungsdosis von 14 Gy unwirksam ist.

Hinsichtlich der Bestrahlungsfolgen am Darm ergibt sich für p-Tyrosin kein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber den Kontrollgruppen, wie Abbildung 13 zeigt.

Unsere Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu anderen Studien, die sich mit p-Tyrosin bzw. dem Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor (BBI) befasst haben.

P-Tyrosin zeigte in einer in vitro – Studie ein signifikant höheres klonogenes Überleben humaner Fibroblasten nach Bestrahlung (20). Der Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor, dessen wirksamer Bestandteil das p-Tyrosin ist (19), hemmt in einem in vitro – Bestrahlungsmodell mit humanen Fibroblasten die Differenzierung von Vorläuferfibroblasten in postmitotische Fibrozyten (21). Diese Fibrozyten bilden sehr viel kollagene Matrix und können damit möglicherweise an der Entwicklung einer Strahlenfibrose beteiligt sein. Dieser radioprotektive Effekt konnte auch in vivo an einem sog. „leg contracture assay“ nachgewiesen werden (43). Eine strahleninduzierte fibrotische Beinverkürzung von C3H-Mäusen konnte dabei durch BBI auf etwa die Hälfte reduziert werden. Warum sich diese Ergebnisse nicht durch unser Modell bestätigen lassen, kann nur vermutet werden. Möglicherweise spielt die unterschiedliche Textur des Zielgewebes dabei eine Rolle. Die von Dittmann et al. (43) hervorgerufene Strahlenfibrose betraf bindegewebige Strukturen, unser Modell untersucht die Wirkungen an der Niere, welche vorwiegend aus parenchymatösem Organewebe besteht.

Wenngleich nicht Schwerpunkt dieser Arbeit, wäre es denkbar gewesen, dass der radioprotektive Effekt von p-Tyrosin in unserem Versuchsmodell auch an einer Verringerung der letalen chronischen Bestrahlungsfolgen am Darm nachweisbar gewesen wäre. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Vorteil der p-Tyrosin-Tiere

hinsichtlich der Darmtoxizität. Die auf Zellebene beobachteten Effekte lassen sich wahrscheinlich nicht so leicht auf die Strahlenenteropathie übertragen. Ihre Pathogenese ist komplexer und bei ihr spielen neben einer Kollagenvermehrung weitere Faktoren, wie eine zunehmende Zellverarmung und eine obliterative Vaskulopathie des Darmwandgewebes eine Rolle (83).

Der Vergleich der Versuchsgruppen, die mit dem Vasopeptidaseinhibitor AVE 7688 behandelt wurden, mit den bestrahlten Kontrollgruppen fiel je nach Bestrahlungsdosis uneinheitlich aus.

Die 0 Gy AVE-Gruppe zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen der RNR im Verlauf der Beobachtungszeit. Dies steht im Einklang mit der Situation, die man physiologischerweise erwarten würde. Ein Einfluss der Substanz auf die Nierenzintigraphieergebnisse ist zwar prinzipiell denkbar. Dieser würde sich aber an beiden Nieren gleichermaßen manifestieren und somit die RNR konstant bleiben.

Die AVE early – Tiere zeigten bei der höchsten Strahlendosis von 14 Gy eine signifikant höhere RNR im Vergleich zur Kontrollgruppe (+3,9%,  $p=0,031$ ). Man muss bei der Einschätzung dieses Ergebnisses jedoch beachten, dass am Ende der Nachbeobachtungszeit nur noch vier 14 Gy AVE early – Tiere vorhanden waren. Bei niedrigeren Strahlendosen von 8 Gy und 11 Gy hatte AVE 7688 keinen nephroprotektiven Effekt bei hinreichender Versuchstierzahl von 8 bzw. 7 Tieren. Weshalb AVE 7688 nur bei 14 Gy wirkt, ist unklar. Möglicherweise tritt bei den niedrigeren Strahlendosen eine kompensatorische Hypertrophie in den Arealen der Niere ein, die aufgrund des Dosisabfalls zur Tiefe hin niedrigere Strahlendosen erhielten. Unsere Dosisangaben beziehen sich auf die dem Bestrahlungsgerät zugewandte Oberfläche des Organes. Da der Dosisabfall bei 70 kV sehr steil ist, ist die Dosis, die die Unterseite der Niere erreicht, geringer. Dieses Areal könnte durch Regenerationsprozesse längerfristig Einschränkungen der Nierenfunktion kompensieren. Nimmt man an, dass diese Regenerationsprozesse tatsächlich existieren, ist unser Modell eventuell nur bis zum Einsetzen derselben valide. Sind die positiven Effekte von AVE 7688 dabei nicht allzu groß, könnten sie von der Regeneration des Gewebes überdeckt werden. Damit ließe sich auch die Wirksamkeit von AVE 7688 bezüglich der RNR bei der höchsten Strahlendosis

erklären. Wenn 14 Gy ausreichen, um auch die Unterseite der Niere so stark zu schädigen, dass kaum noch Regenerationsprozesse stattfinden, wäre die Regeneration als Störprozess weitgehend ausgeschlossen. Das würde erklären, warum bei 14 Gy wieder diskrete protektive Effekte gemessen werden können. Man müsste AVE 7688 in einem Modell testen, dass solche Störeffekte weitgehend ausschließt. Es wäre also eine Bestrahlungsmethode mit weitgehend homogener Dosisverteilung im Zielorgan notwendig, wie es z.B. bei der homogenen bilateralen Bestrahlung, wie sie die Arbeitsgruppe von Stewart (77) einsetzte, der Fall ist.

Die Auswertung der AVE late – Tiere ergab keine signifikante Veränderung der RNR-Werte. Sowohl bei 11 Gy als auch bei 14 Gy zeigte die medikamentöse Intervention ab der 26. Woche nach Bestrahlung keinen protektiven Effekt mehr. Eine Gruppengröße von nur 2 Tieren in der 14 Gy AVE late - Gruppe ist für eine sinnvolle statistische Berechnung nicht ausreichend.

Die AVE 7688 – Behandlung wurde eine Woche nach der 2. Nachbeobachtungsszintigraphie begonnen. Betrachtet man die Kontrollgruppen, sieht man, dass der Rückgang der RNR zum Zeitpunkt der 2. Nachbeobachtungsszintigraphie schon einen relativ großen Anteil am Gesamtrückgang der RNR bis zur 5. Nachbeobachtungsszintigraphie hat (11 Gy Kontrollgruppe: 40,0 % des Gesamtrückgangs, 14 Gy Kontrollgruppe: 76,2 % des Gesamtrückgangs). Nimmt man einen irreversiblen Funktionsverlust an, bedeutet dies für die 14 Gy AVE late – Gruppe, dass zum Zeitpunkt der Intervention nur noch ca. ein Viertel der insgesamt zerstörten Nierenfunktion zu retten ist. Hier wäre ein früherer Interventionszeitpunkt sinnvoll. Würde man die Medikation 6 Wochen früher beginnen läge der theoretisch zu rettende Anteil der RNR noch bei ca. 61 %. Für die 11 Gy AVE late – Gruppe ist der gewählte Interventionszeitpunkt wiederum günstig, da noch ca. 60 % des Gesamt-RNR-Rückgangs ausstehen. Der richtige Interventionszeitpunkt für eine therapeutische AVE 7688 – Gabe muss möglicherweise von der applizierten Dosis abhängig gemacht werden.

Der Vasopeptidaseinhibitor AVE 7688 wirkt einerseits wie ein ACE-Hemmer, andererseits als NEP-Inhibitor.

Die Wirksamkeit der ACE-Hemmer in der Prophylaxe und Therapie der Strahlenneuropathie ist durch zahlreiche experimentelle Studien belegt (10; 60; 62;

63). Die wichtigste Funktion der ACE-Hemmer scheint dabei die Inhibition der Angiotensin II – Produktion zu sein. AT II wirkt als renales Zytokin, welches an unterschiedlichen Zellentitäten der Niere rezeptorvermittelte Signaltransduktionswege aktiviert, die eine vermehrte Proliferation und Synthese von extrazellulärer Matrix vermitteln (85). Aufgrund seiner zweiten Funktion als Hemmstoff der NEP scheint AVE 7688 ein noch größeres renoprotektives Potenzial als ein ACE-Hemmer zu besitzen (4; 24; 80). Die Versuche von Gross et al. an Knock-out-Mäusen, die eine renale Fibrose ähnlich dem Alport-Syndrom beim Menschen entwickeln, ergaben für AVE 7688 einen nephroprotektiven Effekt, der vor allem auf die antifibrotische und antiinflammatorische Wirkung von AVE 7688 zurückgeführt wurde (24). Entzündung und Fibrose, beides Hauptakteure in der Pathogenese der Strahlenneuropathie, sind mögliche Angriffspunkte von AVE 7688 in unserem Versuchsmodell. Eine nephroprotektive Wirkung von AVE 7688 im vorliegenden Versuchsmodell, wie sie aufgrund der teilweise besseren Szintigraphieergebnisse vermutet werden darf, könnte hierdurch erklärt werden.

Die Betrachtung der Kontrollgruppen erlaubt einige Rückschlüsse auf die Methodik dieser Arbeit.

Im Versuchstierkollektiv befanden sich sechs Tiere, die weder eine Bestrahlung noch eine medikamentöse Therapie erhalten hatten. Physiologischerweise ist von einer seitengleichen Alterung beider Nieren auszugehen und damit auch von einem konstanten Seitenverhältnis der gespeicherten Aktivität in der statischen Nierenszintigraphie. Tatsächlich zeigten diese Tiere in sämtlichen Nachbeobachtungsszintigraphien keine signifikanten Schwankungen des Aktivitätsverhältnisses der rechten zur linken Niere. Damit darf von einer guten Replizierbarkeit und Reliabilität der szintigraphischen Messmethode ausgegangen werden.

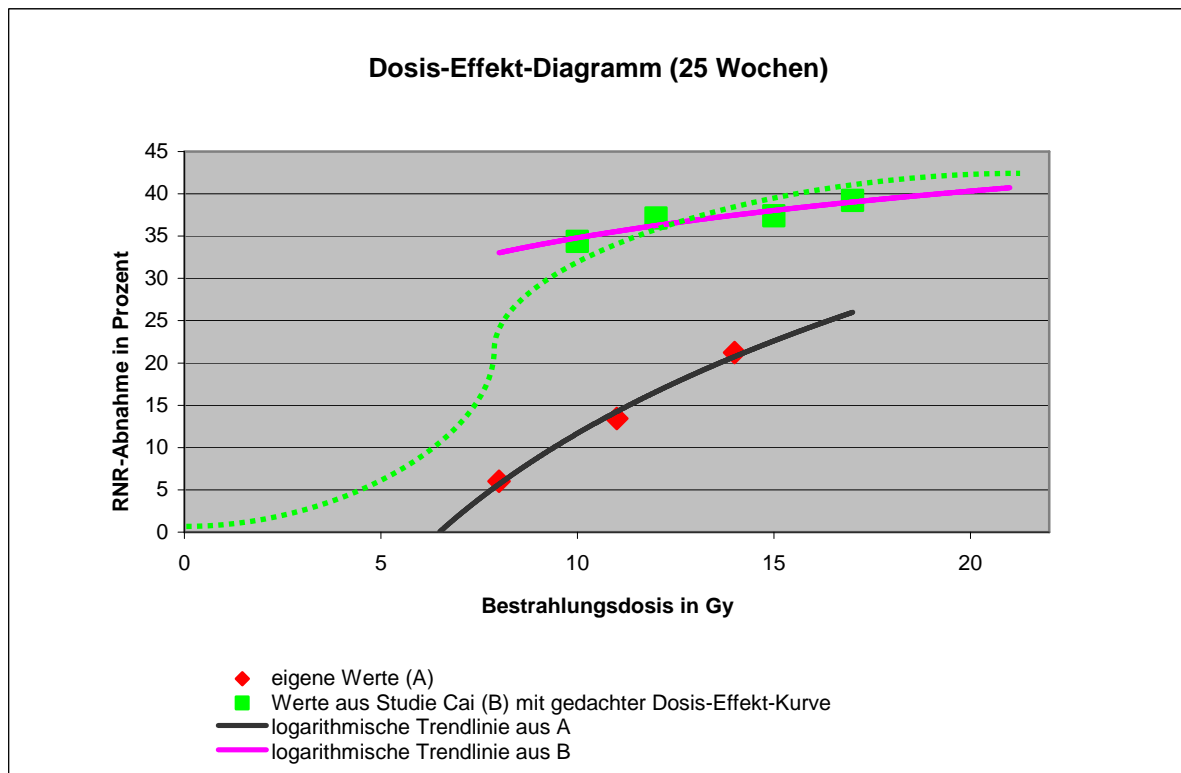
Die 8 Gy Kontrollgruppe zeigte ab der 31. Woche signifikante Abnahmen der RNR. Bei der 11 Gy Kontrollgruppe war die Abnahme der Nierenfunktion insgesamt stärker und schon ab der 19. Woche feststellbar. Im Durchschnitt war der Prozentwert der RNR in der 11 Gy Gruppe um 15,6% geringer als in der 8 Gy Gruppe. Die 14 Gy Kontrollgruppe zeigt lediglich in der ersten Nachbeobachtungsszintigraphie nach 19 Wochen einen signifikant kleineren Wert der RNR in Bezug auf den Ausgangswert. Die folgenden Szintigraphien ergaben keinen signifikanten Rückgang

der RNR, wobei zu vermuten ist, dass dies an der starken Dezimierung der Versuchstierzahl liegt. Der nierenschädigende Effekt der Bestrahlung ist somit eindeutig aus dem Verlauf der Werte für die relative Nierenfunktion der rechten Niere (RNR) ersichtlich.

Eine frühere Studie, die unser Versuchsmodell etabliert hatte, verwendete höhere Bestrahlungsdosen von 10, 12, 15 und 17 Gy (6). Bei einem Vergleich der Szintigraphiewerte für die Kontrolltiere beider Studien im gemeinsamen Intervall zwischen 11 und 14 Gy fällt auf, dass die Abnahme der RNR in der Studie von Cai insgesamt deutlich höher ausfällt (siehe Abbildung 18). Da die gleichen Methoden und die gleichen Versuchstiere angewandt wurden, ist der Grund hierfür wahrscheinlich das Vorgehen des Untersuchers bei der Auswertung der Szintigraphiebilder. Es scheint für das verwendete Versuchsmodell wohl unabdingbar zu sein, dass die Auswertung der Szintigraphien immer von demselben Untersucher vorgenommen wird, wie es in der vorliegenden Studie auch der Fall war.

In der Studie von Cai kann beim Vergleich der verschiedenen Bestrahlungsdosen von 12 bis 17 Gy keine statistisch signifikanten Unterschiede im Effekt auf die Nierenfunktion gefunden werden. Als Begründung wird zunächst einmal eine zu stark reduzierte Versuchstierzahl vermutet. Es finden sich in dieser Versuchsreihe schon bei der 2. Kontrollszintigraphie nur noch vier bis sechs Tiere pro Gruppe, bei der 5. Kontrollszintigraphie nur noch zwei bis drei Tiere. Unsere Untersuchungen konnten auf eine größere Versuchstierzahl zurückgreifen, bei der 2. Kontrollszintigraphie auf sechs bis acht Tiere pro Gruppe, bei der 5. Kontrollszintigraphie noch auf drei bis sieben Tiere. Vor allem aus dem Vergleich der 8 Gy Kontrolltiere mit den 11 Gy Kontrolltieren lässt sich aus der vorliegenden Arbeit eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Nierenbestrahlung ableiten (siehe Abbildung 15)

In der Studie von Cai wird auch noch eine andere Erklärung für die geringen Unterschiede zwischen den vier Gruppen vermutet. Im Dosis-Effekt-Diagramm soll das Intervall zwischen 10 und 17 Gy schon den asymptotisch verlaufenden Schenkel der gedachten Dosis-Effekt-Kurve beinhalten (siehe Abbildung 18). Der Wendepunkt dieser Kurve läge dann etwa bei 7 bis 8 Gy. Diese Hypothese lässt sich durch unsere Ergebnisse nicht stützen, wobei jedoch das Problem der niedrigen Interrater-Reliabilität beachtet werden muss.



**Abbildung 18: Dosis-Effekt-Diagramm der 2. Nachbeobachtungsszintigraphie**

Die Bestrahlung der rechten Niere wurde als Einzeitbestrahlung über ein dorsales Stehfeld durchgeführt.

Bei dieser Technik ist auch das umgebende Gewebe wie das Intestinum einem hohen Dosisanteil ausgesetzt ist. Dadurch kam es zu einer Stenosebildung einzelner Darmabschnitte, was mit einer hohen Letalität der Versuchstiere verbunden war. Besonders bei den Versuchsgruppen mit einer höheren Dosis von 14 Gy und 17 Gy hatte dies negativen Einfluss auf die Verwertbarkeit und Aussagekraft der statistischen Auswertung. Tangentiale laterale Bestrahlungsfelder, wie sie Stewart et al. (77; 78) verwendet haben, weisen eine geringere intestinale Toxizität auf, da weniger Darmanteile mitbestrahlt werden. In deren Modell erfolgte jedoch eine Strahlentherapie beider Nieren. Für unser Modell der unilateralen Nierenbestrahlung ist jedoch ein laterales Bestrahlungsfeld nicht geeignet, da die kontralaterale Niere stärker mitbestrahlt werden würde als bei einem ventralen Strahlenfeld.

Wir wählten in unserem Modell eine Einzeitbestrahlung, da diese eine sichere Dosisablage innerhalb kurzer Zeit gewährleistet. Eine zukünftige Verwendung des

beschriebenen Nierenmodells sollte jedoch eine Fraktionierung der Gesamtdosis auf z.B. fünf Einzeldosen beinhalten. Damit liesse sich die Darmtoxizität verringern und damit die Grösse der einzelnen Versuchsgruppen günstig beeinflussen.

Zur Verlaufsbeurteilung der Nierenfunktion nach Bestrahlung wurde eine Serie statischer  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Szintigraphien angefertigt. Die  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Szintigraphie ermöglicht die seitengetrennte Beurteilung der Aufnahme des Radionuklids in den Nierenkortex, genauer gesagt in die dort befindlichen proximalen Nierentubuluszellen. Mehrere Studien belegen eine sehr enge Korrelation von  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-Szintigraphiewerten mit der glomerulären Filtrationsrate (32; 41; 82) sowie mit dem renalen Plasmafluss (41). Beide sind anerkannte Parameter zur Einschätzung der Nierenfunktion und letztlich des radiogenen Funktionsverlustes einer Niere.

Eine genauere Messung der Nierenfunktion wäre durch Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate prinzipiell möglich gewesen. Hierzu hätte man die Kreatininclearance durch Messung der Kreatininkonzentration im Blut und im Urin bestimmen können. Dieses Verfahren kann jedoch keine Aussage über die seitengetrennte Nierenfunktion geben, wie es für unser Modell notwendig ist.

Der Vergleich der seitengetrenten Nierenfunktion erfolgte als ROI-Analyse. Mit ihrer Hilfe wurde als Verlaufsparemeter die relative Nierenfunktion der rechten Niere an der gesamten Nierenfunktion bestimmt. Die Bestimmung der relativen Nierenfunktion bietet in unserem Modell gewisse Vorteile. Aufgrund des geringen Injektionsvolumens von nur 100  $\mu\text{l}$  variieren die verabreichten Mengen an  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA von Szintigraphie zu Szintigraphie leicht. Die Bestimmung relativer Nierenszintigraphiewerte ist dabei jedoch weitgehend unabhängig von der absoluten Injektionsmenge an  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA.

## Schlussfolgerung

An einem Mausmodell konnte der Nierenfunktionsverlust nach Einzeitbestrahlung mit verschiedenen Dosisstufen dargestellt werden. Mit Hilfe der Zielgröße, der szintigraphisch gemessenen relativen Nierenfunktion der bestrahlten Niere, konnte das Potenzial zweier radio- bzw. nephroprotektiv wirksamer Substanzen überprüft werden.

Der Effekt der Nierenbestrahlung konnte an der Abnahme der relativen Nierenfunktion über die Nachbeobachtungszeit eindeutig nachgewiesen werden. Bei einer Dosis von 8 Gy war der Effekt gering, bei den höheren Dosen von 11 Gy und 14 Gy konnte ein deutlicher Rückgang der relativen Nierenfunktion gemessen werden.

Mit dem verwendeten Bestrahlungsverfahren waren Nebenwirkungen am Darm verbunden, die zu einem hohen Verlust an Versuchstieren in den einzelnen Gruppen, vor allem den 14 Gy – Gruppen, geführt haben. Die z.T. geringen Tierzahlen haben die statistische Auswertung erschwert. Für einige Behandlungsgruppen bleibt es unklar, ob sie tatsächlich keine Wirkung haben oder ob der Stichprobenumfang zu klein wurde, um signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Für p-Tyrosin ließ sich in unserem Versuchsmodell kein radioprotektiver Effekt auf die Funktion der Niere nachweisen. Ebenso konnte keine protektive Wirkung auf den Darm festgestellt werden. Die Mortalität, die man als groben Indikator für die radiogene Schädigung des Darmes heranziehen kann, war bei den p-Tyrosin-Tieren unverändert.

AVE 7688 zeigte lediglich bei der Bestrahlungsdosis von 14 Gy und bei frühzeitiger Gabe einen positiven Effekt auf den Erhalt der Nierenfunktion. Bei niedrigeren Bestrahlungsdosen ließ sich keine Wirkung nachweisen, wofür eine kompensatorische Hypertrophie der am geringsten bestrahlten Areale verantwortlich sein könnte. Die späte Gabe von AVE 7688 hatte keinen Einfluss auf die Nierenfunktion, was unter anderem an dem relativ späten Interventionszeitpunkt (26 Wochen nach Bestrahlung) liegen könnte.



## Ausblick

Der Vasopeptidaseinhibitor AVE 7688 befindet sich zur Zeit in einer Phase IIb/III-Studie (RAVEL-1) als Antihypertensivum und in einer Phase II-Studie zur Behandlung der diabetischen Nephropathie (81). Für ACE-Hemmer, die dem AVE 7688 pharmakologisch eng verwandt sind, ist schon seit längerem bekannt, dass sie im Tierversuch eine effektive Behandlungsmethode für die Strahlenneuropathie darstellen (12; 57; 60). Im Jahr 2008 erschien eine klinische Studie, die den ACE-Hemmer Captopril erstmals an einem größeren Patientenkollektiv auf seine Wirksamkeit in der Strahlenneuropathie nach Ganzkörperbestrahlung prüfte (12). Sie ergab hinsichtlich der Abmilderung der chronischen Nierenschädigung für Captopril einen positiven Trend. Die Wirksamkeit der ACE-Hemmer sowie der Fortschritt in der klinischen Prüfung des AVE 7688, machen die Erweiterung seines Indikationsspektrums auf die Strahlenneuropathie umso interessanter. Hierzu müssten zunächst weitere Untersuchungen in Tiermodellen mit größerer Versuchstierzahl und nebenwirkungsärmerer Bestrahlungstechnik unternommen werden. Eine bilaterale Nierenbestrahlung bzw. eine Ganzkörperbestrahlung würden dabei ein realistischeres Modell für die klinische Situation bieten, wobei auch die Vorgänge hinsichtlich der Pharmakodynamik und -kinetik des AVE 7688 besser berücksichtigt wären.

Die modifizierte Aminosäure p-Tyrosin wurde in den letzten Jahren durch verschiedene experimentelle Studien als radioprotektive Substanz identifiziert (18; 20). In unserem Modell war keine radioprotektive Wirkung des p-Tyrosin auf Niere oder Darm messbar. P-Tyrosin ist eine interessante Substanz für die Erforschung der Strahlenreaktion und ihrer molekularen Mechanismen, wenngleich sie vom klinischen Einsatz noch weit entfernt zu sein scheint.

Freilich muss man die Chancen der medikamentösen Normalgewebsschonung im Kontext mit anderen Entwicklungen, die dasselbe Ziel verfolgen, betrachten. Hier wären technische Weiterentwicklungen zu nennen, wie die intensitätsmodulierte Radiotherapie, die eine bessere Schonung des Normalgewebes erlaubt. Weiterhin gibt es bei der Knochenmarkstransplantation für bestimmte Leukämieformen bereits dosisreduzierte Konditionierungsschemata, die mit weniger Strahlendosis auskommen (28). Angesichts dieser Neuerungen muss man möglicherweise den Beitrag, den eine medikamentöse Normalgewebsschonung zur Verbesserung der Strahlentherapie leisten kann, neu bewerten.

## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Durch eine externe Strahlentherapie, wie z. B. eine Ganzkörperbestrahlung im Rahmen einer Knochenmarktransplantation, kann es abhängig von der Dosis zu einem chronischen Funktionsverlust der Niere kommen, der als Strahlennephropathie bezeichnet wird. Für einige Substanzen, wie z.B. ACE-Hemmer, gibt es bereits Erkenntnisse, dass sie diese Folgeerscheinung der Bestrahlung positiv beeinflussen können.

In dieser Untersuchung sollte an einem Mausmodell anhand von regelmäßigen Verlaufsmessungen der Nierenfunktion die pharmakologische Beeinflussbarkeit der Strahlennephropathie durch den ACE-/NEP-Inhibitor AVE 7688 und die radioprotektiv wirksame Aminosäure p-Tyrosin geprüft werden.

**Methoden:** Nach Einzeitbestrahlung der rechten Niere in Dosen von 8 bis 17 Gy wurden über insgesamt 43 Wochen statische Nierenzintigraphien angefertigt und der Nierenfunktionsverlust der medikamentös behandelten Tiere mit ihren Kontrollgruppen ohne Medikation verglichen.

**Ergebnisse:** P-Tyrosin hat in unseren Untersuchungen keine radioprotektive Wirkung auf das bestrahlte Nierengewebe gezeigt. Für AVE 7688 konnte bei einer Bestrahlungsdosis von 14 Gy und dauerhafter Gabe der Substanz ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung eine leichte protektive Wirkung auf die Nierenfunktion nachgewiesen werden. Durch die Bestrahlung trat unabhängig von der Medikation eine hohe dosisabhängige Letalität auf, die aufgrund verringerter Fallzahlen die statistischen Aussagemöglichkeiten der erhobenen Daten deutlich schmälerte.

**Schlussfolgerung:** Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass AVE 7688, ähnlich den ACE-Hemmern, einen positiven Effekt auf den Verlauf einer strahlungsbedingten Niereninsuffizienz nehmen kann, wie man es dem AVE 7688 bereits von Modellen mit Niereninsuffizienz anderer Ursache her zuschreibt. Zur Bestätigung dieser Vermutung wären jedoch weitere Versuche mit einer optimierten Bestrahlungsmethode und größerer Fallzahl notwendig.

## 7 Summary

**Background:** Total body irradiation in the scope of bone marrow transplantation regimens or external beam radiotherapy can cause dose-dependent chronic renal failure known as radiation nephropathy. Studies have been completed on substances that lessen the extent of renal damage, in particular ACE inhibitors.

In this study we investigated the potential of pharmacologically influencing the extent of renal damage. ACE-/NEP-Inhibitor AVE 7688 and the radioprotective amino acid p-tyrosine were tested by serial kidney function measurement in a mouse model of radiation nephropathy.

**Methods:** C3H-mice were treated with single dose radiation of 8 to 17 Gy to the right kidney. Renal function was evaluated by static renal scintigraphy over a period of 43 weeks and was compared to control animals not receiving AVE 7688 or p-tyrosine.

**Results:** P-tyrosine showed no radioprotective effect on irradiated kidney tissue in our study. AVE 7688 given constantly after irradiation performed at a dose of 14 Gy a slight beneficial effect on kidney function. Radiation on its own caused a high dose-dependent lethality, independent of medication, which led to considerable limitations on the statistical power of our results.

**Conclusion:** Our results indicate slightly improved kidney function after kidney irradiation if concurrent treatment with AVE 7688 is initiated. This effect is similar to the well-known effect of ACE inhibitors and corresponds to studies where AVE 7688 proved to be beneficial for renal failure due to other causes. Further investigations with improved radiotherapy technique and a larger sample size will be needed however to prove our promising results.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nierenbestrahlung .....	20
Abbildung 2: Bestrahlungsfeld .....	21
Abbildung 3: Ausgangsszintigraphie.....	21
Abbildung 4: <sup>99m</sup> Tc-DMSA-Injektion .....	25
Abbildung 5: Injektionsnarkose.....	26
Abbildung 6: Durchführung der Nierenzintigraphie .....	27
Abbildung 7: Szintigraphieaufnahme .....	28
Abbildung 8: Bestimmung der Regions-of-Interest .....	29
Abbildung 9: Formel für die relative Nierenfunktion .....	29
Abbildung 10: Versuchstierzahl .....	31
Abbildung 11: Überlebensfunktion nach applizierter Strahlendosis .....	32
Abbildung 12: Überlebensfunktion nach Medikation.....	33
Abbildung 13: Überleben der Kontrolltiere und p-Tyrosin-Tiere im Vergleich .....	34
Abbildung 14: Normalverteilungsdiagramm der Nierenzintigraphieausgangswerte	35
Abbildung 15: Kontrollgruppen - Boxplot-Diagramm.....	37
Abbildung 16: p-Tyrosin-Gruppen - Boxplot-Diagramm.....	40
Abbildung 17: AVE 7688 - Gruppen - Boxplot-Diagramme.....	45
Abbildung 18: Dosis-Effekt-Diagramm der 2. Nachbeobachtungsszintigraphie.....	56

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klinische Syndrome, die mit der Strahlennephritis assoziiert sind .....	7
Tabelle 2: Gruppeneinteilung.....	18
Tabelle 3: Bestrahlungszeiten .....	22
Tabelle 4: Einstellungen and der Gammakamera.....	27
Tabelle 5: Lage- und Streuungsmaße der Kontrollgruppen .....	36
Tabelle 6: Statistik des Wilcoxon-Vorzeichenrangtests für die Kontrollgruppen .....	38
Tabelle 7: Lage- und Streuungsmaße der p-Tyrosin-Gruppen .....	39
Tabelle 8: Statistik des Wilcoxon-Vorzeichenrangtests für die p-Tyrosin-Gruppen ..	41
Tabelle 9: Varianzanalyse der p-Tyrosin-Gruppen .....	42
Tabelle 10: Lage- und Streuungsmaße der AVE 7688-Gruppen .....	44
Tabelle 11: Statistik des Wilcoxon-Vorzeichenrangtests für die AVE 7688-Gruppen	47
Tabelle 12: Varianzanalyse der AVE 7688 early-Gruppen .....	48
Tabelle 13: Varianzanalyse der AVE 7688 late-Gruppen .....	48

## 10 Literaturverzeichnis

### Reference List

1. Aposhian, H. V., Aposhian, M. M.; Arsenic Toxicology: Five Questions. *Chemical Research in Toxicology* 19 (2006) 1-15.
2. Appel, R. G.; Mechanism of atrial natriuretic factor-induced inhibition of rat mesangial cell mitogenesis. *Am J Physiol* 259 (1990) E312-E318.
3. Bakris, G. L., Bhandaru, S., Akerstrom, V., Re, R. N.; ACE inhibitor-mediated attenuation of mesangial cell growth. A role for endothelin. *Am J Hypertens.* 7 (1994) 583-590.
4. Benigni, A., Zoja, C., Zatelli, C., Corna, D., Longaretti, L., Rottoli, D., Maggioni, P., Todeschini, M., Noris, M., Remuzzi, G.; Vasopeptidase inhibitor restores the balance of vasoactive hormones in progressive nephropathy. *Kidney Int* 66 (2004) 1959-1965.
5. Bottcher, H. D., Schnepfer, E.; [Etiology, clinical manifestations and prognosis of radiation nephritis]. *Strahlentherapie* 159 (1983) 168-172.
6. Cai, L.; Dissertation: Etablierung eines Modells zur Untersuchung strahleninduzierter Spätfolgen an der Niere und möglicher Modulatoren. (2007) .
7. Canaan-Kuhl, S., Ostendorf, T., Zander, K., Koch, K. M., Floege, J.; C-type natriuretic peptide inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in vivo. *Kidney Int* 53 (1998) 1143-1151.
8. Capizzi, R. L.; The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies by amifostine. *Semin.Oncol.* 26 (1999) 3-21.
9. Capizzi, R. L.; Amifostine reduces the incidence of cumulative nephrotoxicity from cisplatin: laboratory and clinical aspects. *Semin.Oncol.* 26 (1999) 72-81.
10. Cohen E. P., Moulder J.E., Fish B. L., Hill, P.; Prophylaxis of experimental bone marrow transplant nephropathy. *J Lab Clin Med.* (1994) .
11. Cohen, E. P., Fish, B. L., Moulder, J. E.; Treatment of radiation nephropathy with captopril. *Radiat.Res.* 132 (1992) 346-350.
12. Cohen, E. P., Irving, A. A., Drobyski, W. R., Klein, J. P., Passweg, J., Talano, J. A., Juckett, M. B., Moulder, J. E.; Captopril to mitigate chronic renal

- failure after hematopoietic stem cell transplantation: a randomized controlled trial. *Int J Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 70 (2008) 1546-1551.
13. Cohen, E. P., Lawton, C. A., Moulder, J. E.; Bone-Marrow Transplant Nephropathy - Radiation Nephritis Revisited. *Nephron* 70 (1995) 217-222.
  14. Cohen, E. P., Bonsib, S. A., Whitehouse, E., Hopewell, J. W., Robbins, M. E. C.; Mediators and Mechanisms of Radiation Nephropathy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 223 (2000) 218-225.
  15. Cohen, E. P., Moulder, J. E., Robbins, M. E.; Radiation nephropathy caused by yttrium 90. *The Lancet* 358 (2001) 1102-1103.
  16. Datta, P. K., Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P., Lianos, E. A.; TGF-beta 1 production in radiation nephropathy: role of angiotensin II. *Int J Radiat.Biol.* 75 (1999) 473-479.
  17. Dittmann K.H., Plasswilm L, Rodemann HP, Radioprotektion: Radikalfänger und biologische Substanzen; In: "Radioonkologie Grundlagen", Bamberg M, Molls M, Sack H, Zuckschwerdt Verlag. 1 (2004) 293-301.
  18. Dittmann, K., Mayer, C., Wanner, G., Kehlbach, R., Rodemann, H. P.; The radioprotector O-phospho-tyrosine stimulates DNA-repair via epidermal growth factor rece. *Radiother.Oncol.* 84 (2007) 328-334.
  19. Dittmann, K. H., Gueven, N., Mayer, C., Rodemann, H. P.; Characterization of the amino acids essential for the p. *Protein Eng* 14 (2001) 157-160.
  20. Dittmann, K. H., Mayer, C., Rodemann, H. P.; O-phospho-L-tyrosine protects TP53 wild-type cells against ionizing radiation. *Int J Cancer* 96 Suppl (2001) 1-6.
  21. Dittmann, K., Loffler, H., Bamberg, M., Rodemann, H. P.; Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radiotherapy and Oncology* 34 (1995) 137-143.
  22. Edsall DL; The attitude of the clinician with regard to exposing patients to the X-ray. *JAMA* 47 (1906) 1425-1429.
  23. Glatstein, E., Fajardo, L. F., Brown, J. M.; Radiation injury in the mouse kidney--I. Sequential light microscopic study. *Int J Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 2 (1977) 933-943.
  24. Gross, O., Koepke, M. L., Beirowski, B., Schulze-Lohoff, E., Segerer, S., Weber, M.; Nephroprotection by antifibrotic and anti-inflammatory effects of the vasopeptidase inhibitor AVE7688. *Kidney Int* 68 (2005) 456-463.
  25. Hain, S. F.; Renal imaging. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians* 6 (2006) 244-248.

26. Hanson, W. R., Zhen, W., Geng, L., Hunter, N., Milas, L.; The prostaglandin E1 analog, misoprostol, a normal tissue protector, does not protect four murine tumors in vivo from radiation injury. *Radiat.Res.* 142 (1995) 281-287.
27. Hardaker, W. T., Jr., Stone, R. A., McCoy, R.; Platinum nephrotoxicity. *Cancer* 34 (1974) 1030-1032.
28. Heinzelmann, F., Faul, C., Belka, C.; Ganzkörperbestrahlung. *Der Onkologe* 13 (2007) 397-408.
29. Heinzelmann, F., Ottinger, H., Müller, C. H., Allgaier, S., Faul, C., Bamberg, M., Belka, C.; Total-body irradiation--role and indications: results from the German Registry for Stem Cell Transplantation (DRST). *Strahlenther.Onkol.* 182 (2006) 222-230.
30. Hingorani, S.; Chronic Kidney Disease in Long-Term Survivors of Hematopoietic Cell Transplantation: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (2006) 1995-2005.
31. Ichikawa, I., Kiyama, S., Yoshioka, T.; Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 45 (1994) 1-9.
32. Itoh, K., Asano, Y., Kato, C., Nakada, K., Nagao, K., Goto, T., Nonomura, K., Furudate, M.; [Quantitation of absolute and relative renal uptake using <sup>99m</sup>Tc-DMSA: sequential change in time and correlation with <sup>99m</sup>Tc-DTPA uptake]. *Kaku Igaku* 27 (1990) 237-242.
33. Jaenke, R. S., Robbins, M. E., Bywaters, T., Whitehouse, E., Rezvani, M., Hopewell, J. W.; Capillary endothelium. Target site of renal radiation injury. *Lab Invest* 68 (1993) 396-405.
34. Jennete JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG; Heptinstall's Pathology of the Kidney. (1998) .
35. Jordan, S. W., Key, C. R., Gomez, L. S., Agnew, J., Barton, S. L.; Late effects of radiation on the mouse kidney. *Exp.Mol.Pathol.* 29 (1978) 115-129.
36. Juncos, L. I., Carrasco, D. S., Cornejo, J. C., Broglia, C. A., Cejas, H.; Long-term enalapril and hydrochlorothiazide in radiation nephritis. *Nephron* 64 (1993) 249-255.
37. Kagami, S., Border, W. A., Miller, D. E., Noble, N. A.; Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93 (1994) 2431-2437.
38. Kapur, S., Chandra, R., Antonovych, T.; Acute radiation nephritis. Light and electron microscopic observations. *Arch.Pathol.Lab Med.* 101 (1977) 469-473.



39. Kasahara, M., Mukoyama, M., Sugawara, A., Makino, H., Suganami, T., Ogawa, Y., Nakagawa, M., Yahata, K., Goto, M., Ishibashi, R., Tamura, N., Tanaka, I., Nakao, K.; Ameliorated glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation. *J Am Soc.Nephrol.* 11 (2000) 1691-1701.
40. Kasper, D. L., Harrison, T. R.; *Harrison's Principles of internal medicine / editors, Dennis L. Kasper ... [et al.]. (2005) .*
41. Kawamura, J., Hosokawa, S., Yoshida, O.; Renal function studies using <sup>99m</sup>Tc-dimercaptosuccinic acid. *Clin Nucl.Med.* 4 (1979) 39-46.
42. Keane, W. F., Crosson, J. T., Staley, N. A., Anderson, W. R., Shapiro, F. L.; Radiation-induced renal disease. A clinicopathologic study. *Am J Med.* 60 (1976) 127-137.
43. Klaus, D., Mahmoud, T., Johannes, C., Vanessa, H., Luka, M., Rodemann, H. P.; Selective Radioprotection of Normal Tissues by Bowman-Birk Proteinase Inhibitor (BBI) in Mice. *Strahlentherapie und Onkologie* V181 (2005) 191-196.
44. Krochak, R. J., Baker, D. G.; Radiation Nephritis Clinical manifestations and pathophysiologic mechanisms. *Urology* 27 (1986) 389-393.
45. Kuin, A., Kruse, J. J., Stewart, F. A.; Proteinuria and vascular changes after renal irradiation: the role of reactive oxygen species (ROS) and vascular endothelial growth factor (Vegf). *Radiat.Res.* 159 (2003) 174-181.
46. Kunkler, P. B., Farr, R. F., Luxton, R. W.; The limit of renal tolerance to x-rays; an investigation into renal damage occurring following the treatment of tumours of the testis by abdominal baths. *Br.J Radiol.* 25 (1952) 192-201.
47. Lau, K. H., Baylink, D. J.; Phosphotyrosyl protein phosphatases: potential regulators of cell proliferation and differentiation. *Crit Rev.Oncog.* 4 (1993) 451-471.
48. Levin, E. R., Gardner, D. G., Samson, W. K.; Natriuretic peptides. *N.Engl.J Med.* 339 (1998) 321-328.
49. Levin, E. R., Gardner, D. G., Samson, W. K.; Natriuretic peptides. *N.Engl.J Med.* 339 (1998) 321-328.
50. Luxton, R. W.; Radiation Nephritis. *QJM* 22 (1953) 215-242.
51. Luxton, R. W., Kunkler, P. B.; Radiation Nephritis. *Acta Radiol.Ther.Phys.Biol.* 2 (1964) 169-178.
52. Madrazo, A., Suzuki, Y., Churg, J.; Radiation nephritis: acute changes following high dose of radiation. *Am J Pathol.* 54 (1969) 507-527.

53. Marin-Grez, M., Fleming, J. T., Steinhausen, M.; Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324 (1986) 473-476.
54. Mishra, S., Hamburger, A. W.; O-phospho-L-tyrosine inhibits cellular growth by activating protein tyrosine phosphatases. *Cancer Res.* 53 (1993) 557-563.
55. Molinaro, G., Rouleau, J. L., Adam, A.; Vasopeptidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2 (2002) 131-141.
56. Moulder, J. E.; Pharmacological intervention to prevent or ameliorate chronic radiation injuries. *Semin.Radiat.Oncol.* 13 (2003) 73-84.
57. Moulder, J. E., Cohen, E. P., Fish, B. L., Hill, P.; Prophylaxis of bone marrow transplant nephropathy with captopril, an inhibitor of angiotensin-converting enzyme. *Radiat.Res.* 136 (1993) 404-407.
58. Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P.; Angiotensin II receptor antagonists in the treatment and prevention of radiation nephropathy. *Int J Radiat.Biol.* 73 (1998) 415-421.
59. Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P.; Radiation nephropathy is treatable with an angiotensin converting enzyme inhibitor or an angiotensin II type-1 (AT1) receptor antagonist. *Radiother.Oncol.* 46 (1998) 307-315.
60. Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P.; ACE Inhibitors and All Receptor Antagonists in the Treatment and Prevention of Bone Marrow Transplant Nephropathy . *Current Pharmaceutical Design*, Volume 9, Number 9, April 2003, pp.737-749(13) 9 (2003) 737-749.
61. 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.
62. Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P.; Treatment of radiation nephropathy with ACE inhibitors and All type-1 and type-2 receptor antagonists. *Curr.Pharm.Des* 13 (2007) 1317-1325.
63. Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P.; Radiation nephropathy is treatable with an angiotensin converting enzyme inhibitor or an angiotensin II type-1 (AT1) receptor antagonist. *Radiother.Oncol.* 46 (1998) 307-315.
64. Moulder, J. E., Fish, B. L., Cohen, E. P., Bonsib, S. M.; Angiotensin II receptor antagonists in the prevention of radiation nephropathy. *Radiat.Res.* 146 (1996) 106-110.
65. Neta, R., Douches, S., Oppenheim, J. J.; Interleukin 1 is a radioprotector. *J Immunol.* 136 (1986) 2483-2485.
66. Oikawa, T., Freeman, M., Lo, W., Vaughan, D. E., Fogo, A.; Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-

- fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition. *Kidney Int* 51 (1997) 164-172.
67. Otani, M., Shimojo, H., Shiozawa, S., Shigematsu, H.; Renal involvement in bone marrow transplantation. *Nephrology* 10 (2005) 530-536.
  68. Quarmby, S., Hunter, R. D., Kumar, S.; Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells. *Anticancer Res.* 20 (2000) 3375-3381.
  69. Robbins, M. E., Bonsib, S. M.; Radiation nephropathy: a review. *Scanning Microsc.* 9 (1995) 535-560.
  70. Robbins, M. E., Wooldridge, M. J., Jaenke, R. S., Whitehouse, E., Golding, S. J., Rezvani, M., Hopewell, J. W.; A morphological study of radiation nephropathy in the pig. *Radiat.Res.* 126 (1991) 317-327.
  71. Saka, B., Bilge, A. K., Umman, B., Yilmaz, E., Nisanci, Y., Erten, N., Karan, M. A., Tascioglu, C.; Bilateral renal artery stenosis after abdominal radiotherapy for Hodgkin's disease. *Int J Clin.Pract.* 57 (2003) 247-248.
  72. Salvi, S., Green, D. M., Brecher, M. L., Magoos, I., Gamboa, L. N., Fisher, J. E., Baliah, T., Afshani, E.; Renal artery stenosis and hypertension after abdominal irradiation for Hodgkin disease. Successful treatment with nephrectomy. *Urology* 21 (1983) 611-615.
  73. Schlessinger, J.; Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103 (2000) 211-225.
  74. Schulte, E. A., Saleh, H., Schlatter, E.; Diadenosine polyphosphates and atrial natriuretic peptide are antiproliferative in rat mesangial cells. *Cell Physiol Biochem.* 10 (2000) 57-64.
  75. Springer, T. A.; Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346 (1990) 425-434.
  76. Stephens, L. C., Robbins, M. E., Johnston, D. A., Thames, H. D., Price, R. E., Peters, L. J., Ang, K. K.; Radiation nephropathy in the rhesus monkey: morphometric analysis of glomerular and tubular alterations. *Int J Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 31 (1995) 865-873.
  77. Stewart, F., Bohlken, S., Begg, A., Bartelink, H.; Renal damage in mice after treatment with cisplatin alone or in combination with X-irradiation. *Int J Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 12 (1986) 927-933.
  78. Stewart, F. A., Oussoren, Y., Bartelink, H.; The influence of cisplatin on the response of mouse kidneys to multifraction irradiation. *Radiotherapy and Oncology* 15 (1989) 93-102.
  79. Stewart, F. A., Te Poele, J. A., Van der Wal, A. F., Oussoren, Y. G., Van Kleef, E. M., Kuin, A., Verheij, M., Dewit, L. G.; Radiation nephropathy--the link between functional damage and vascular mediated inflammatory and thrombotic changes. *Acta Oncol.* 40 (2001) 952-957.

80. Taal, M. W., Nenov, V. D., Wong, W., Satyal, S. R., Sakharova, O., Choi, J. H., Troy, J. L., Brenner, B. M.; Vasopeptidase inhibition affords greater renoprotection than angiotensin-converting enzyme inhibition alone. *Journal of the American Society of Nephrology* 12 (2001) 2051-2059.
81. Tabrizchi, R.; Ilepatril (AVE-7688), a vasopeptidase inhibitor for the treatment of hypertension. *Curr.Opin.Investig.Drugs* 9 (2008) 301-309.
82. Taylor, A., Jr., 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.
83. Touboul, E., Balosso, J., Schlienger, M., Laugier, A.; [Radiation injury of the small intestine. Radiobiological, radiopathological aspects; risk factors and prevention]. *Ann.Chir* 50 (1996) 58-71.
84. Troughton, R. W., Rademaker, M. T., Powell, J. D., Yandle, T. G., Espiner, E. A., Frampton, C. M., Nicholls, M. G., Richards, A. M.; Beneficial renal and hemodynamic effects of omapatrilat in mild and severe heart failure. *Hypertension* 36 (2000) 523-530.
85. Wolf, G., Neilson, E. G.; Angiotensin II as a renal growth factor. *Journal of the American Society of Nephrology* 3 (1993) 1531-1540.
86. Yingjun, L., Jun, Z., Yaping, J., Chunwei, L., Gexin, L., Fei, Y., Xuping, Z., Li, A., Jun, Y.; Therapeutic potentials of combined use of DMSA with calcium and ascorbic acid in the treatment of mild to moderately lead intoxicated mice. *BioMetals* (2007) .