

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

**Auswirkungen von Erythropoetin (ERYPO® 2000), p53 Inhibitor (pifithrin-alpha®)
und TNF- α Inhibitor (Remicade®) auf das ZNS unter Bestrahlung, sowie
immunhistochemische Untersuchungen im Hinblick auf DNA-
Doppelstrangbrüche der bestrahlten Regionen. Eine tierexperimentelle Studie.**

Tobias Karl Blau

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. Priv.-Doz. Dr. H. C. -W. E. Geinitz

Die Dissertation wurde am 26.08.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.01.2010 angenommen.

Meinen Eltern und Großeltern
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND	2
2.1. Ionisierende Strahlung und ihre Wirkung auf das Zentrale Nervensystem ...	2
2.2. Die Strahlenmyelopathie	5
2.3. Ansätze zur Prävention der Strahlenmyelopathie	7
2.3.1. Allgemein	7
2.3.2. p53	7
2.3.2.1. p53 Inhibitor (Pifithrin-alpha [®])	9
2.3.3. TNF- α	9
2.3.3.1. TNF- α Inhibitor (Remicade [®])	10
2.3.4. Erythropoetin und Epoetin alfa	11
2.4. Immunhistochemie	12
2.4.1. Allgemein	12
2.4.2. γ -H2AX	13
3. EIGENER VERSUCHSAUFBAU	14
3.1. Zielvorstellungen	14
3.2. Material und Methoden	14
3.2.1. Versuchstiere	14
3.2.1.1. Tierhaltung	14
3.2.2. Versuchsplan/Bestrahlungsplan/Gruppenbildung	15
3.2.2.1. Kontroll-Gruppen	16
3.2.2.2. p53 Inhibitor(pifithrin-alpha [®])-Injektion	16
3.2.2.3. TNF- α Inhibitor (Remicade [®])-Injektion	16
3.2.2.4. Erythropoetin (ERYPO [®] 2000)-Injektion	17
3.2.3. Narkose	18
3.2.4. Bestrahlungstechnik.....	18
3.2.5. Nachbeobachtungszeit.....	20
3.2.5.1 Beobachtung und Untersuchung.....	20
3.2.5.1.1. Untersuchung	20
3.2.5.1.2. Clinical Score	21

3.2.5.2. Euthanasiemethode	21
3.2.6. Präparation und Entnahme des cervikalen Rückenmarks	21
3.2.7. Immunhistochemie	22
3.2.7.1. Immunhistochemie-Protokoll und Standardreagenzien	23
3.2.7.2. Auswertungsmethode	24
3.2.8. Statistik.....	25
4. ERGEBNISSE	25
4.1. Mortalität in der Nachbeobachtungszeit	25
4.1.1. Mortalität der Narkose	25
4.1.2. Mortalität in der Nachbeobachtungszeit.....	26
4.2. Klinische Ergebnisse in der Nachbeobachtungszeit	27
4.2.1. Klinische Beobachtung / Clinical Score.....	27
4.3. Immunhistochemische Ergebnisse	32
4.3.1. Übersicht der untersuchten Tiere.....	32
4.3.2. γ -H2AX Ergebnisse	32
4.3.3. Statistische Auswertung und Ergebnisse	34
5. DISKUSSION	43
5.1. Einfluss der Methodik auf die Ergebnisse	43
5.1.1. Narkose.....	43
5.1.2. Bestrahlung	43
5.1.3. Beobachtung und Untersuchung in der Nachbeobachtungszeit.....	43
5.1.4. Einbettung und Schnittführung des Rückenmarks	44
5.1.5. Immunhistochemie	44
5.1.6. Auswertungsmethode	44
5.1.7. Statistik.....	45
5.2. Ergebnisse	45
5.2.1. Klinische Ergebnisse.....	45
5.2.2. γ -H2AX Ergebnisse: Allgemein	46
5.2.2.1 γ -H2AX Ergebnisse: Gruppen	47
5.3. Diskussion im Bezug zur Strahlenmyelopathie.....	48
6. ZUSAMMENFASSUNG	51
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	52

8. LITERATURVERZEICHNIS	54
9. DANKSAGUNG	61
10. LEBENSLAUF	62

1. Einleitung

Die Strahlentherapie hat sich in ihrer mittlerweile über hundertjährigen Geschichte zu einem unverzichtbaren Bestandteil der interdisziplinären Tumorthherapie entwickelt. Sie basiert letztlich auf der Entdeckung der Röntgen-Strahlen durch Wilhelm Conrad Röntgen im November 1895 [24, 69], der Entdeckung und Untersuchung der Radioaktivität durch Henri Becquerel im Jahre 1896 sowie den Arbeiten von Marie und Pierre Curie, die 1898 das Radon und Polonium entdeckten und sich den Physik-Nobelpreis 1903 mit Henri Becquerel teilten [16, 97]. Schon 1903 formulierte Dr. Charles L. Leonard die Möglichkeit, Röntgenstrahlen als therapeutisches Mittel sowohl in der Tumorthherapie als auch in palliativen Ansätzen zu verwenden [52]. In den 1930er Jahren folgten von Coutard und Hautant Beweise, dass die Strahlentherapie erfolgreich bei Tumoren eingesetzt werden kann und weiterhin entwarf Coutard das erste fraktionierte Bestrahlungsmodell [14, 15]. Patterson veröffentlichte 1936 Ergebnisse über die Behandlung von Tumoren mit Röntgenstrahlen [70].

Von diesen Grundlagen her entwickelte sich die Strahlentherapie im onkologischen Therapiekonzept als lokoregionäre Behandlungsmöglichkeit, ergänzend zu Tumor Chirurgie und systemisch-medikamentöser Therapie (z.B. Chemotherapie und endokrine Therapie). Sie konnte in randomisierten und epidemiologischen Untersuchungen ihren Stellenwert bei kurativen und palliativen Ansätzen belegen.

Natürlich ist zu beachten, dass die eingeschränkte therapeutische Breite, aufgrund von dosisabhängigen strahleninduzierten Nebenwirkungen, zu mitunter unbefriedigenden Ergebnissen bei unterschiedlichen Tumorentitäten oder -lokalisationen führt. Die Nebenwirkungen auf das umliegende, gesunde Gewebe stellen letztendlich das limitierende Moment jeder Bestrahlungsplanung dar. Nebenwirkungen gering zu halten bei dennoch möglichst effektiver Tumorkontrolle ist eine der Herausforderungen einer jeden multimodalen Tumorthherapie.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1. Ionisierende Strahlung und ihre Wirkung auf das Zentrale Nervensystem

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass ionisierende Strahlung zu einer Energieübertragung auf das exponierte Gewebe führt. Zwei Arten von ionisierender Strahlung werden unterschieden: Teilchenstrahlung und Wellenstrahlung.

Die Teilchenstrahlung oder auch Korpuskularstrahlung wird weiter unterteilt in geladene (α -Teilchen, Protonen, Elektronen) und ungeladene Teilchen (Neutronen). Die geladenen Teilchen führen zu einer direkten Ionisation indem sie durch ihr elektrisches Feld Elektronen eines Atoms aus dessen Atomhülle vertreiben und dadurch ein geladenes (ionisiertes) Atom zurücklassen. Die ungeladenen Teilchen (Neutronen) übertragen ihre Energie indem sie von dem entsprechenden Atomkern aufgenommen werden und indirekt von dort ihre Energie in Form von Photonen oder Kernteilchen weitergeben (indirekte Ionisation) [37].

Die Wellenstrahlung ist eine elektromagnetische Strahlung in Form einer Welle und wie der Name schon beinhaltet, eine Kopplung von elektrischen und magnetischen Feldern, die sich in ihrer Frequenz unterscheiden und somit auch in ihrer Energie (UV-Licht, Gammastrahlung, Röntgenstrahlung). Über mehrere Effekte und Wechselwirkungen (Compton-Effekt, Paarerzeugung, Kernprozesse), die auch abhängig von der jeweilig unterschiedlichen Energie der Strahlung sind, führt die Wellenstrahlung zu geladenen Teilchen und wird deswegen auch als indirekt ionisierende Strahlung bezeichnet [37].

Wird ein Elektron lediglich auf eine, mit Bezug auf das Bohr-Atommodell, nächst höhere Schale katapultiert, so wird das Atom angeregt. Wenn allerdings ein Valenzelektron die Atomhülle gänzlich verlässt, stellt dies eine Ionisation des Atoms dar [37].

Zur näheren Charakterisierung einer Strahlung wird die Ionisationsdichte, d.h. die Anzahl der Ionisationsereignisse entlang des zurückgelegten Weges der Strahlung, angegeben. Diese wird über den mittleren Energieverlust (ΔE) entlang des Weges (ΔS) des Primärstrahls ermittelt und ist über die Energieabgabe ein indirektes Maß der Anzahl erzeugter geladener Teilchen im Gewebe. Man spricht hier vom linearen Energietransfer (LET), der in $\text{keV}/\mu\text{m}$ angegeben wird [37].

Ionisierende Strahlung kann also durch ihre Energie, die sie in eine Materie einbringt, diese erheblich beeinflussen, besonders wenn sie auf lebende Zellen trifft. Sie kann direkt oder indirekt auf verschiedene Strukturen oder Targets wirken. Wird z.B. die DNA direkt getroffen, kann dies zu unterschiedlichen Schäden wie z.B. Basenschäden, Einzelstrangbrüchen und Doppelstrangbrüchen führen. Die Reparaturmechanismen der DNA können eine Vielzahl dieser Schäden wieder reparieren, doch kann es immer wieder zu falschen Reparaturen kommen oder bei fehlender Reparatur zu Mutationen oder dem Zelltod (Apoptose). Doch nicht nur die DNA kann als Ziel der Bestrahlung angesehen werden, vielmehr stellen auch Membranen und Rezeptoren relevante Ziele dar. Zellzyklusphasen können beschleunigt oder verlangsamt werden, Kontroll-Punkte und Reparaturmechanismen können ausfallen und am Ende kann dies ebenso wie bei der direkten DNA-Schädigung zu Mutationen und zum Zelltod führen.

Bei der indirekten Strahlenwirkung wird die Energie über eine Art Kettenreaktion an das Zielmolekül weiter geleitet. Durch die Strahlung entstehen im wässrigen Milieu freie Radikale, Atome mit freien Valenzelektronen, die sehr aktiv Reaktionen mit diversen Zielmolekülen eingehen, und diese dadurch schädigen können. Ist Sauerstoff anwesend, so bilden sich vornehmlich weniger reaktionsfreudige Radikale z.B. Hydroxyl-Peroxyl-Radikale (HO_2 -Radikale), die allerdings eine längere Diffusionsstrecke im Gewebe zurücklegen können und somit die Möglichkeit zur Schädigung relevanter Ziele aufweisen [34].

Betrachtet man die pathologischen Reaktionen, die sich nach der Bestrahlung des ZNS abspielen, so kann man diese nach ihrem zeitlichen Verlauf in 3 Phasen, akute, subakute und chronische Phase einteilen [91].

Bei der frühen (akuten) Gewebereaktion, die mit einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Störung der Blut-Hirn-Schranke einhergeht, kommt es zu einer reversiblen Ödembildung, die sich klinisch mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen als Ausdruck der Hirndrucksteigerung äußert. Sie tritt innerhalb von wenigen Tagen und Wochen auf und spricht gut auf Kortikosteroide an [10, 89].

Die subakute Phase, bei der es innerhalb weniger Monate zu einer reversiblen Demyelinisierung der Axone kommt, manifestiert sich bei Hirnbestrahlung klinisch in Form eines Somnolenzsyndroms und bei Rückenmarksbestrahlung als Lhermitte-Zeichen [88].

Die chronische Strahlenspätreaktion ist charakterisiert durch eine fortschreitende Leukenzephalopathie sowie radiogen bedingte Koagulationsnekrosen in der weißen Substanz, die weitreichende Folgen für den Patienten haben können [88]. Histopathologisch finden sich fibrinoide Nekrosen sowie stark hyalinisierte Gefäßwände.

Nach Ganzhirnbestrahlung kann es in einem Zeitraum von mehreren Jahren zu neuropsychologischen Defiziten kommen [67] und bei Rückenmarksbestrahlung frühestens nach 5-6 Monaten [88] zu Paresen, Sensibilitätsstörungen, Gangstörungen, Inkontinenz und weiteren neurologischen Ausfällen [5]. Die Reaktion des Rückenmarks wird als Strahlenmyelopathie bezeichnet.

2.2. Die Strahlenmyelopathie

Die Strahlenmyelopathie stellt eine die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigende Nebenwirkung dar. Schätzungsweise beträgt das Risiko für eine Strahlenmyelopathie ungefähr 1 % bei einer Gesamtdosis von 50 - 55 Gy in konventioneller Fraktionierung von 1,8 - 2 Gy einmal täglich [7, 87, 100].

Zur Untersuchung der Strahleneffekte am ZNS wird oft die Strahlenmyelopathie als Modell eingesetzt, da diese experimentell leichter zu erfassen ist [88]. Die histopathologischen Strahlenreaktionen in Gehirn und Rückenmark sind aufgrund von weitgehend gleichem Parenchymaufbau nicht maßgeblich unterschiedlich [88].

Die Schäden, die letztendlich zu einer Strahlenmyelopathie führen, sind recht vielfältig, was einleuchtet, da das ZNS aus unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut ist. Es wurde schon sehr früh formuliert, dass Gefäßendothelien die primären Targets bei der Entwicklung einer Strahlenmyelopathie darstellen [86]. Schädigungen des Gefäßendothels können zu unterschiedlichen Veränderungen führen wie z.B. Ödeme, perivaskuläre Fibrose, hyaline Degeneration, fibrinoide Nekrose oder Thrombose, um nur einige zu nennen, die letztendlich in einer hämorrhagischen Nekrose oder Infarkt in der weißen Substanz enden [88]. Des Weiteren finden sich reaktiv veränderte Gliazellen [106]. Ebenso spielen auch Oligodendrozyten, die am Aufbau und Erhalt der Markscheiden der Axone beteiligt sind, eine Rolle bei der Pathogenese [9, 36].

Betrachtet man die Pathogenese näher, so muss man sich mit den Mechanismen auseinandersetzen, die zum Tod bzw. zum Verlust der Teilungsfähigkeit der einzelnen Zelle führen.

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein aktiver Prozess, den die Zelle aufgrund von Schädigung oder physiologischen Signalen, wie sie in der Embryogenese vorkommen, selbst durchführt. Tritt also eine strahlenvermittelte Schädigung ein, so folgt eine Expressierung spezifischer Gene, die wiederum die Aktivierung der Kaskade spezieller Proteasen (Caspasen) auslöst und am Ende dieser Kaskade steht der Tod der Zelle. Generell wird ein extrinsischer und intrinsischer Weg der Auslösung beschrieben [25, 101]. Der extrinsische Weg läuft über Anlagerung spezieller Liganden

(z.B.: Tumor-Nekrose-Faktor- α) an sogenannte „Todesrezeptoren“ der Zellen (z.B. TNFR1, FAS-L, TRAIL). Daraufhin kommt es zur Aktivierung der Caspase 8, die wiederum die Caspase 3 in Gang setzt. Caspase 3 sorgt für viele Zellveränderungen, die bei der Apoptose ablaufen. Der intrinsische Weg wird z.B. durch Schädigung der DNA und anschließenden Anstieg des p53-Proteins in Gang gesetzt. Hier sind die Gene der Bcl-2-Familie beteiligt. Cytochrom C wird aus den Mitochondrien freigesetzt, dies führt über die Caspase 9 letztendlich ebenfalls zur Caspase 3. Diese beiden Wege, an denen noch andere Faktoren beteiligt sind, stehen miteinander in Verbindung. Näheres dazu findet sich noch in den folgenden Kapiteln. Einen Überblick zeigt Abbildung 1.

Doch nicht jede bestrahlte, geschädigte Zelle setzt gleich die Apoptose in Gang. Vielmehr kann es durch eine vorwiegend den Kern betreffende Schädigung (z.B. DNA-Doppelstrangbrüche), nachdem die Reparaturmechanismen versagt haben, dazu kommen, dass die Zelle keine weitere Mitose durchläuft und sich somit nicht länger reproduziert. Dies wird als klonogener oder mitotischer Zelltod bezeichnet [35].

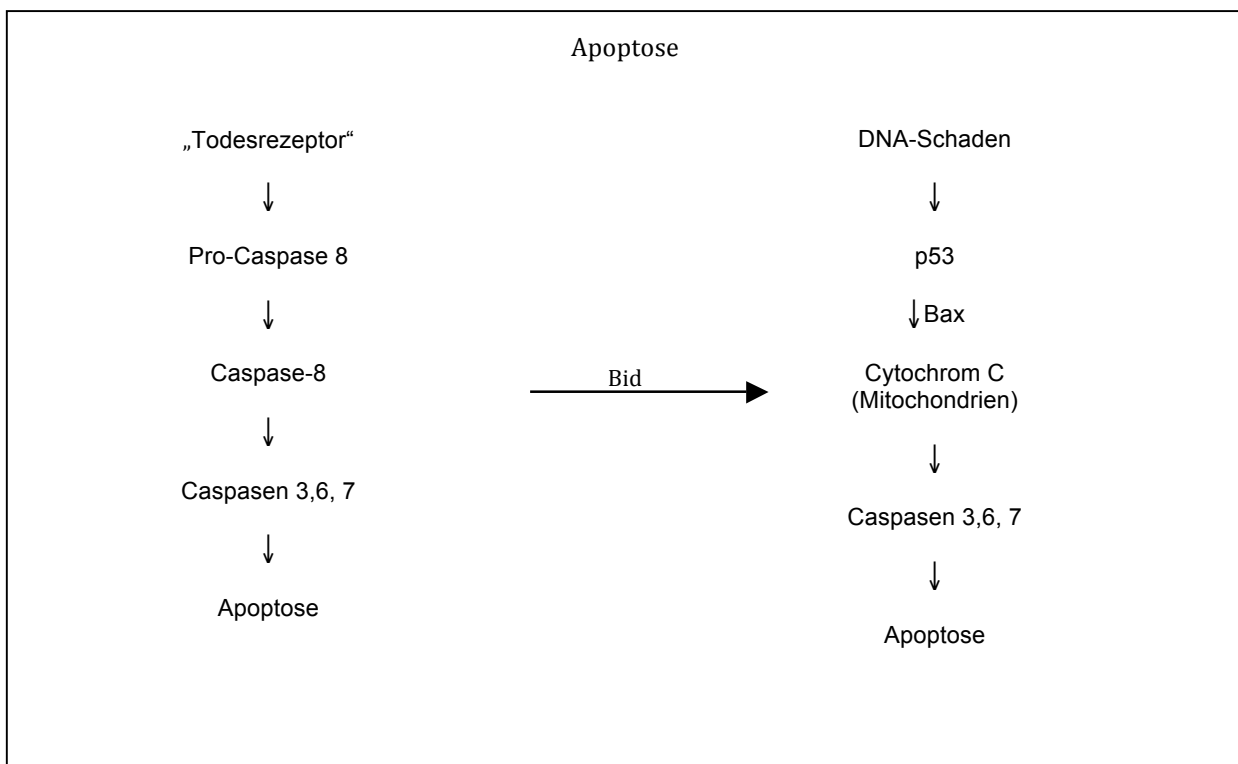


Abbildung 1: Übersicht über extrinsischen und intrinsischen Weg der Apoptose

2.3. Ansätze zur Prävention der Strahlenmyelopathie

2.3.1. Allgemein

Zahlreiche Ansätze zur Protektion des Normalgewebes werden derzeit angewandt und untersucht. Schon für die Frühphase nach Bestrahlung gibt es zahlreiche Strategien, die z.B. inhibierend in die Kaskade der Apoptose eingreifen sollen. Aber auch für die Latenzphase gibt es einige Strategien, wie vasoaktive Pharmaka oder Ansätze zur Neovaskularisation. So vielseitig die einzelnen Aspekte der pathologischen Abläufe bei der Strahlenmyelopathie sind, so weitreichend sind auch die Ideen wie die einzelnen Schritte zu beeinflussen sind.

2.3.2. p53

Das p53-Protein ist der nukleäre Transkriptionsfaktor des Tumorsuppressorgens TP53. Dieses Gen wird auch aufgrund seiner wichtigen zellbiologischen Funktion als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [49]. TP53 ist auf dem Chromosomort 17p13 lokalisiert. P53 besitzt nur eine kurze Halbwertszeit, ist im Zellkern lokalisiert, besteht aus 393 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 53 kDa, daher auch der Name.

Kommt es zu einer Schädigung des Genoms, z.B. DNA-Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlung, wird p53 hochreguliert und ist an folgenden Mechanismen beteiligt oder setzt sie in Gang.

- Arretierung des Zellzyklus vor der Mitose, damit mehr Zeit zur Reparatur des DNA-Schadens besteht. Der Zellzyklusarrest geschieht durch Inhibierung zyklinabhängiger Kinasen (cyklin-dependent-kinase), die die G1-S und G2-M Checkpoints regulieren [30]. Kommt es in Folge von ionisierender Strahlung zu DNA-Schäden, so wird ATM (ataxia telangiectasia-mutated gene) aktiviert. ATM phosphoryliert p53 und inhibiert MDM2 (murine double minute gene) [45], welches wiederum den Abbau von p53 fördert. P53 führt zur einer verstärkten Expression bestimmter Gene wie z.B. p21. P21 inhibiert die zyklinabhängigen Kinasen.
- DNA-Reparaturmechanismen werden mit Hilfe von p53 aktiviert. Im Zellarrest kommen Reparaturgene zum Einsatz, an deren Aktivierung p53 beteiligt ist. Gelingt die Reparatur der DNA wird das MDM2-Gen aktiviert,

welches p53 inhibiert und den Abbau fördert, und die Zelle kann in die Synthesephase übergehen.

- Aktivierung der Apoptose, wenn der DNA-Schaden nicht behoben werden konnte. P53 ist Teil des intrinsischen Weges der Apoptose und aktiviert proapoptische Gene der Bcl-2-Familie (z.B. Bax), dies führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, zusätzlich werden anti-apoptische Bcl-2-Proteine unterdrückt [6, 41, 79, 105]. Siehe auch Abbildung 1.

Kommt es zum Funktionsverlust des p53-Proteins, z.B. aufgrund von Mutationen, so kann dies zur Tumorentstehung beitragen. Die Zelle hat ihren „Wächter der Genoms“ verloren und reproduziert sich, ohne ihre Zellzykluskontrolle durchzuführen und kann ihr Programm der Apoptose im schlimmsten Fall nicht durchlaufen. Dies fördert die chromosomale Instabilität. In zahlreichen Tumorentitäten finden sich solche Mutationen, z.B. Lungen-, Mamma-, Kolon- und Magenkarzinom, um nur einige zu nennen [42]. Fehlt den Tumorzellen p53, so kann dies auch in einer größeren Chemotherapie- und Strahlenresistenz münden, wogegen das gesunde Gewebe voll funktionsfähig ist und dadurch das limitierende Moment in der Behandlung darstellen kann.

2.3.2.1. p53 Inhibitor (Pifithrin-alpha[®])

Pifithrin-alpha ($C_{16}H_{19}BrN_2OS$, 367,30 g/mol) blockiert reversibel p53 und kann also verhindern, dass die Zelle die Apoptose durchläuft. In Tiermodellen hat man zeigen können, dass die Tiere aufgrund dieses p53-Inhibitors vor letalen Dosen einer Strahlentherapie geschützt werden konnten [46].

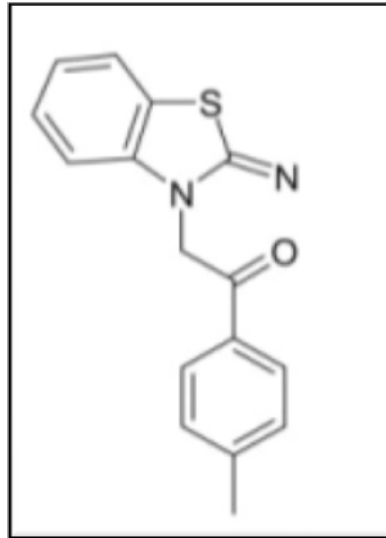


Abbildung 2: pifithrin-alpha (aus [40])

Es bietet sich somit eventuell die Möglichkeit pifithrin-alpha[®] einzusetzen, um das gesunde Gewebe während der Therapie zu schützen, und damit zahlreiche Nebenwirkungen abzuschwächen. Die Frage inwieweit pifithrin-alpha[®] auf bestrahlte Regionen des ZNS wirkt ist Teil dieser Studie.

2.3.3. TNF- α

Der Tumor-Nekrose-Faktor- α ist ein Zytokin, das hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten, mitunter auch von T- und B- Lymphozyten produziert und sezerniert wird. Seine Funktionen und Wirkungen sind recht vielfältig. So ist es an Entzündungsreaktionen, Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt. TNF- α kann als sezerniertes lösliches Protein (sTNF- α) oder membrangebunden (mTNF- α) vorliegen. Das lösliche Protein (sTNF- α) wird aus dem membrangebundenen Protein (mTNF- α), welches neben einem extrazellulären Anteil einen intrazellulären aminoterminalen Anteil besitzt, gebildet [47]. Durch eine Metallprotease TACE (TNF- α

converting enzyme) werden aus den 233 Aminosäuren des mTNF- α (26 kDa) 157 Aminosäuren für das sTNF- α (17 kDa) herausgeschnitten.

Bakterielle oder virale Infektionen sowie Bestrahlung können zu einer Ausschüttung von TNF- α führen. TNF- α bindet an die Tumornekrosefaktor-Rezeptoren TNFR-1 und TNFR-2. TNFR-1 ist Teil der Gruppe der sogenannten „Todes-Rezeptoren“, die als Teil des extrinsischen Weges die Apoptose über eine Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10 und darauf folgend der Effektorcaspase 3 in Gang setzen können (vgl. Abbildung 1).

Wird das ZNS bestrahlt so kann es zu einer Bildung von TNF- α durch aktivierte Mikroglia und Astrozyten kommen [13, 33, 60]. Zwei Stunden nach einer Einzeitbestrahlung des Mittelhirns von Mäusen mit einer Einzeldosis von 25 Gy stieg der Spiegel der mRNA für TNF- α an, wobei der Peak nach 4 Stunden erreicht war und nach 24 Stunden wieder zurück ging [43]. Zusätzlich besitzt TNF- α einen zytotoxischen Effekt auf Oligodendrocyten [60], der z.B. über Apoptose-Induktion vermittelt wird [1, 28, 39]. Ebenso kann TNF- α Schäden an Endothelzellen verursachen, die zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Proliferationshemmung dieser Zellen führen [90, 92, 94].

2.3.3.1. TNF- α Inhibitor (Remicade[®])

Infliximab, 149kDa, (Remicade[®] 100mg Pulver, Essex Pharma, München) ist ein chimärer monoklonaler IgG1-anti-TNF- α Antikörper, der in der Klinik bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis, ankylosierender Spondylitis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Psoriasis eingesetzt wird. Scallon et al. haben gezeigt, dass Infliximab über die Bindung an sTNF- α und mTNF- α wirkt [26, 73, 85]. Die Serum-Halbwertszeit beträgt ungefähr 7-10 Tage, abhängig von der jeweiligen Konzentration [64]. Beim Menschen werden ungefähr 5 mg/kg i.v. über 2 Stunden eingesetzt.

Es soll untersucht werden, ob Infliximab einen Effekt auf das ZNS im Hinblick auf die Entwicklung von strahleninduzierten Schäden hat.

2.3.4. Erythropoetin und Epoetin alfa

Erythropoetin, EPO, ist ein Glykoprotein (34 kDa), das grundsätzlich der Gruppe der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren angehört, beim Feten in der Leber und beim Erwachsenen zu 80-90 % in den peritubulären Fibroblasten der Niere, zu ca. 10-15 % in der Leber und teilweise auch noch in anderen Geweben/Organen gebildet wird. Die normale Plasmakonzentration beträgt 10-25 U/L. Erythropoetin fördert Wachstum, verhindert Apoptose und induziert die Differenzierung der Stammzellen erster Ordnung zu Erythroblasten und weiter über Retikulozyten zu Erythrozyten [38, 48, 55]. EPO ist der einzige Wachstumsfaktor, der aufgrund von Sauerstoffmangel (Hypoxie) gebildet wird.

EPO mRNA kodiert ein Vorläuferprotein von 193 Aminosäuren, aus dem in weiteren Schritten Erythropoetin gebildet wird [63, 84]. Es bindet an einen spezifischen, membranständigen Erythropoetinrezeptor (EPO-R), der zur Gruppe der Zytokinrezeptoren gehört. Die Bindungsstelle für EPO ist ein 66 kDa Protein. EPO und EPO-R sind in zahlreichen nicht hämatologischen Geweben und Zellen wie z.B. Leber, Uterus, ZNS, Endothelzellen und in Tumoren zu finden [21, 48, 50, 51]. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass EPO mRNA bei Ratten sowohl in Leber und Lunge als auch in Milz, Hoden und Gehirn vorkommt [59, 96].

EPO mRNA hat man in Astrocyten als Antwort auf Sauerstoffmangel gefunden. Generell wurden auch EPO-Rezeptoren im Gehirn nachgewiesen [8]. Somit ist anzunehmen, dass die Möglichkeit besteht, dass EPO einen protektiven Effekt auf das ZNS haben könnte, insbesondere im Hinblick auf Verhinderung der Apoptose ischämisch geschädigter Zellen [62]. Es wurde gezeigt, dass Endothelzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* den EPO-Rezeptor exprimieren [2]. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass EPO durchaus einen neuroprotektiven Effekt in Tiermodellen psychiatrischer Erkrankungen sowie in ersten klinischen, humanen Studien besitzt [8, 11, 17-20, 44, 83, 93].

Rekombiniertes, humanes Erythropoetin (rhEPO) wird bei Anämien (renale Anämie oder bei Tumortherapie) eingesetzt. Es sind unterschiedliche Variationen auf dem Markt verfügbar. Epoetin alfa (Erypo[®]), Epoetin beta (Neo Recormon[®]), Darbepoetin alfa

(Aranesp[®]) und Epoetin delta (Dynepo[®]) [38]. Sie unterscheiden sich im Aufbau und in den Halbwertszeiten. Die Standarddosis von Epoetin alfa bei Tumorpatienten beträgt 15 U/kg Körpergewicht, dreimal pro Woche.

Inwieweit Epoetin alfa die Strahlenreaktion des ZNS beeinflusst, ist Teil dieser tierexperimentellen Studie.

2.4. Immunhistochemie

2.4.1. Allgemein

In der Immunhistochemie werden Antikörper eingesetzt, um im Zytosol oder an der Zellwand exponierte Antigene (Proteine, Enzyme, Rezeptoren) zu lokalisieren und darzustellen. Jeder Antikörper greift an ein bestimmtes Epitop (Sequenz von 5 - 10 Aminosäuren), welche wiederum Teil der Antigene sind, an.

Man macht sich also immunologische Reaktionen zu nutze, um eine quantitative Aussage über die Beschaffenheit der Zelle zu machen, indem man einzelne Bestandteile sichtbar macht.

Dafür stehen im wesentlichen zwei grundsätzliche Wege zur Verfügung.

Der ältere Weg ist die direkte Methode. Hier werden die Antikörper mit einem Makromolekül (Enzym, fluoreszierender Farbstoff) beladen, welches in dem Gewebe nach der entsprechenden Immunreaktion nachgewiesen werden kann.

Bei der indirekten Methode werden nicht die Primärantikörper mit einem Makromolekül bestückt, sondern es kommt ein Sekundärantikörper zum Einsatz, der sich gegen den Primärantikörper richtet. Diesem Sekundärantikörper kann nun wiederum direkt das Makromolekül anhaften, oder aber er bindet mit einem Komplex, an dem entsprechende Makromoleküle oder Enzyme haften. Diese Komplexbindung dient der Verstärkung des Nachweissignals.

Als Beispiel für häufig verwendete indirekte Verfahren sind hier die PAP-Technik (Peroxidase-anti-Peroxidase) sowie die APAAP-Technik (Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) zu nennen.

2.4.2. γ -H2AX

Die DNA aller eukaryoten Zellen, ausgenommen die mitochondriale DNA, befindet sich im Zellkern. Aufgrund ihrer Länge (ca. 1,8 m pro Zelle beim Menschen) bildet sie einen Komplex mit verschiedenen Proteinen aus, der wiederum als Chromatin bezeichnet wird. Sie liegt somit stark kondensiert vor. Hierzu kommen Histonproteine zum Einsatz, die zur Bildung von Nucleosomen beitragen [54]. Nucleosomen bestimmen die Chromatinstruktur und werden als kleinste Untereinheit des Chromatins angesehen [95]. Betrachtet man ein Nucleosom, so besteht dieses aus einem Proteinkomplex von ca. 100 kDa, der aus je zwei Kopien von vier unterschiedlichen Histonproteinen besteht. Um diese Histonproteine ist die DNA in zwei superhelikalen Schleifen gewickelt. Diese einzelnen Nucleosomen sind mit einem kurzen Abschnitt Verbindungs-DNA („linker DNA“) miteinander verbunden [31, 57]. Durch ihre Verpackung wird die DNA stark zusammengelagert. Dies kann eine Behinderung nötiger Stoffwechselforgänge (z.B. Replikation, Transkription und DNA-Reparatur) der DNA zur Folge haben. Somit lässt sich sagen, dass die Histone auch Einfluss auf die eben erwähnten Vorgänge nehmen. Die vier Histone, welche in einem Nucleosom vorliegen, sind H2A, H2B, H3 und H4 [74].

Kommt es zu Stoffwechselforgängen der DNA, so gibt es mehrere Möglichkeiten, die Aufgabe der Replikations-, Transkriptions- und Reparaturproteine an der DNA zu vereinfachen. Dazu muss lokal die Chromatinstruktur verändert werden. Dies geschieht über kovalente Veränderungen der einzelnen Histone (z.B. Acetylierung, Deacetylierung, Phosphorylierung, ATP-bedingte Strukturveränderungen oder Austausch von Histonvarianten) [61, 103].

Kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen, z.B. im Rahmen von Bestrahlung, so findet sich in ihrer Umgebung als Beispiel für kovalente Veränderungen eine Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139. Diese an Serin 139 phosphorylierte Form des H2AX wird in der Literatur als γ -H2AX, mitunter als H2AXS139ph oder phospho-H2AX, bezeichnet [22, 72, 76, 102]. Innerhalb weniger Minuten werden nach der Entstehung eines DNA-Doppelstrangbruchs mehrere Tausend H2AX zu γ -H2AX phosphoryliert [72, 77, 78]. H2AX ist Bestandteil der H2A Population innerhalb des Chromatins und macht ca. 10% davon aus [58]. Die Phosphorylierung scheint sich radial um den Strangbruch auszubreiten [75]. γ -H2AX bildet mit unterschiedlichen

Proteinen, die den Reparaturproteinen angehören oder den Zellzyklus als Checkpointproteine regulieren, nachweisbare Komplexe [23, 72].

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe der Immunhistochemie über einen Antikörper für γ -H2AX etwaige DNA-Doppelstrangbrüche dargestellt werden, und Aussagen über die Folgen der Bestrahlung in den unterschiedlichen Gruppen gemacht werden.

3. Eigener Versuchsaufbau

3.1. Zielvorstellungen

Die Ziele bestehen darin, zu zeigen ob Erythropoetin, pifithirin-alpha[®] (p53 Inhibitor) und Remicade[®] (TNF- α Inhibitor) eventuell eine radioprotektive Wirkung auf das zentrale Nervensystem haben. Dazu wird im Mausmodell das cervikale Rückenmark bestrahlt und nach einer klinischen Nachbeobachtungszeit histologisch aufgearbeitet, um mit Hilfe eines γ -H2AX Antikörpers etwaige Doppelstrangbrüche in der DNA nachzuweisen.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Versuchstiere

In dem Experiment werden 101 weibliche, ca.12 Wochen alte C3H Mäuse (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) verwendet. Das Gewicht liegt zwischen 22g und 25g.

3.2.1.1. Tierhaltung

Die Mäuse werden unter kontrollierten Bedingungen in konventionellen Makrolonkäfigen (Makrolon Typ 4) im Tierstall der Abteilung für Experimentelle Onkologie des Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland) gehalten (ca. 20 Mäuse pro Käfig). Der Zugang zu Trinkwasser und dem regulären Nagetieralleinfuttermittel (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage) ist für die Tiere nach belieben gesichert. Die Luftfeuchtigkeit liegt bei annähernd 40 % (± 10 %),

Raumtemperatur 23°C (±1°C). Ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus wird automatisch zu je 12 Stunden geregelt.

Diese Einrichtung ist von der Regierung von Oberbayern anerkannt und ist mit den staatlich festgelegten Standards und Vorschriften konform.

Die Regierung von Oberbayern hat dem experimentellen Protokoll unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-99/02 zugestimmt.

3.2.2. Versuchsplan/Bestrahlungsplan/Gruppenbildung

Die Tiere werden auf Kontroll-, p53 Inhibitor-, TNF- α Inhibitor- und Erythropoetin-Gruppen verteilt und je nach Gruppe spezifisch behandelt. Für die spätere Immunhistochemie werden zusätzlich 2 gänzlich unbestrahlte und unbehandelte Tiere verwendet (u1 und u2).

Die Bestrahlungsdosis wird bei allen Gruppen fraktioniert in Form von 2 Einzeldosen appliziert, wobei zwischen den Bestrahlungsterminen 7 Tage liegen und einheitlich die erste Strahlendosis bei allen Gruppen 17 Gy beträgt (17 Gy + X Gy). Diese Angabe bezieht sich auf die Hautoberfläche. Basierend auf eigenen Messungen (Thermoluminiszenzdosimetrie) am Mausekadaver werden 75-80% der Hautdosis im Bereich des Rückenmarks appliziert. Näheres zu den einzelnen Gruppen findet sich in Tabelle 1. Man ging davon aus, dass die höchsten Dosen bei einem Teil der Tiere klinisch manifeste Myelopathien verursachen können.

99 Mäuse										
Dosis:		Gruppen:								
Fraktionierung	Kontrolle		P53 Inhibitor		TNF- α Inhibitor		Erythropoetin1		Erythropoetin2	
		n		n		n		n		n
17Gy + 11Gy	K17/11	5								
17Gy + 13Gy	K17/13	6								
17Gy + 15Gy	K17/15	6	P17/15	8	T17/15	8	E1-15	8	E2-15	8
17Gy + 17Gy	K17/17	7								
17Gy + 19Gy	K17/19	6	P17/19	8	T17/19	8	E1-19	8	E2-19	8
17Gy + 21Gy	K17/21	5								

Tabelle 1: Gruppenbildung und einzelne Bestrahlungsdosen

3.2.2.1. Kontroll-Gruppen

Die Kontroll-Gruppen werden lediglich mit unterschiedlichen Strahlendosen behandelt, erhalten aber keine zusätzliche Behandlung. Vgl. Tabelle 1.

3.2.2.2. p53 Inhibitor(pifithrin-alpha®)-Injektion

Jeweils 2 Stunden vor jeder Bestrahlung wird den Tieren der p53 Inhibitor (pifithrin-alpha von A.G. Scientific, Inc., San Diego, USA) intraperitoneal injiziert.

Die Dosis beträgt 2 mg/kg Körpergewicht. Das pifithrin-alpha® Pulver wird in Aqua dest mit einer Verdünnung von 5 µg/µl aufgelöst, so dass jede Maus 8 µl Flüssigkeit injiziert bekommt. Nach der Mittelwertbestimmung des durchschnittlichen Körpergewichtes der Tiere (19,44g aufgerundet auf 20g) erhält jedes Tier 40 µg pifithrin-alpha®.

Insgesamt werden also aufgrund der zweimaligen Bestrahlung 80 µg pifithrin-alpha® gegeben.

3.2.2.3. TNF- α Inhibitor (Remicade®)-Injektion

Wir verwenden Infliximab (Remicade® 100mg Pulver, Essex Pharma, München). Diese Trockensubstanz wird in Aqua dest gelöst. Jedem Tier werden pro Injektion 0,16 mg (8 mg/kg) Infliximab verabreicht. Diese Dosis wurde schon in anderen Mausmodellen verwendet [26, 27, 73] und soll TNF- α für ca. 9-10 Tage inhibieren. Tabelle 2 zeigt die einzelnen Injektionszeitpunkte.

Stammlösung (ST):

100mg (Infliximab) / 10ml (Aqua dest)

→ 10mg/ml

Gebrauchslösung:

4ml (ST) / 46ml (Aqua dest) $\hat{=}$ 40mg (Infliximab) / 50ml

→ 0,16mg / 0,2ml

Zeitlicher Bezug von Injektionen und Bestrahlung:

	i.p. Injektion	Bestrahlung
d0	0,16mg/ Maus; 2 Stunden vor Bestrahlung	17 Gy
d3	0,16 mg/Maus	
d6	0,16 mg/Maus	
d7		je nach Gruppe 15Gy oder 17Gy
d10	0,16 mg/Maus	
d13	0,16 mg/Maus	

Tabelle 2: TNF- α Inhibitor (Remicade®)-Injektion und Bestrahlung

3.2.2.4. Erythropoetin (ERYPO® 2000)-Injektion

Diese Gruppe besteht aus zwei Subgruppen, die sich durch die unterschiedlichen Erythropoetin Dosen unterscheiden, und Erythropoetin 1 und Erythropoetin 2 genannt werden. Die Erythropoetin 1 Tiere wurden mit 10 I.E. Erythropoetin pro Injektion und die Erythropoetin 2 Tiere mit 40 I.E. pro Injektion behandelt.

Wir verwenden ERYPO® 2000 I.E./ml (Epoetin alfa, Janssen-Cilag, Neuss), das subkutan 24 Stunden vor der Bestrahlung, direkt 1 Stunde vor der Bestrahlung und 24 Stunden nach der Bestrahlung injiziert wird, siehe Tabelle 3.

	Erythropoetin 1	Erythropoetin 2
24h vor 1. Bestrahlung	s.c.10 i.E; 5 μ /Maus	s.c.40 i.E; 20 μ /Maus
d0	s.c.10 i.E; 5 μ /Maus + 17Gy	s.c.40 i.E; 20 μ /Maus + 17Gy
d1	s.c.10 i.E; 5 μ /Maus	s.c.40 i.E; 20 μ /Maus
d6	s.c.10 i.E; 5 μ /Maus	s.c.40 i.E; 20 μ /Maus
d7	s.c.10 i.E; 5 μ /Maus + XGy*	s.c.40 i.E; 20 μ /Maus + XGy*
d8	s.c.10 i.E; 5 μ /Maus	s.c.40 i.E; 20 μ /Maus

Tabelle 3: Erythropoetin Gruppen. Injektion und Bestrahlung.

* unterschiedliche Bestrahlungsdosen (15Gy oder 19Gy), je nach Gruppe.

3.2.3. Narkose

Die Tiere werden während der Bestrahlung narkotisiert, dazu wird Isofluran (Forene® 250ml, Abbott, Ludwigshafen) verwendet. Mit Hilfe des Volker Kleintiernarkosegeräts wird diese Inhalationsnarkose durchgeführt. Die Mäuse atmen über ein spezielles Mundstück während der Bestrahlung ein Isofluran-Sauerstoffgemisch ein. Zur Einleitung der Narkose haben sich 5% Isofluran zu 2,5l O₂ bewährt. Bei erreichter Narkosetiefe wird das Gemisch auf 1,5% Isofluran zu 0,4l O₂ reduziert und unter diesen Bedingungen bestrahlt. Zur Ausleitung wird das Gemisch abgedreht.

3.2.4. Bestrahlungstechnik

Die Tiere werden auf dem Bauch liegend mit 70 kV Röntgenstrahlen mittels eines Weichstrahltherapiegeräts Phillips RT100 bestrahlt. Das Bestrahlungsfeld hat einen Durchmesser von 1 cm und schließt den cervicothorakalen Bereich des Rückenmarks ein (Dosisleistung 6 Gy pro Minute, Fokus-Hautabstand 10 cm). Des weiteren wird eine 2 mm dicke Bleiplatte aufgelegt um am linken und rechten Rand des Rundtubus das paravertebrale Gewebe zu schonen (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4).

Für die unterschiedlichen Dosen, die sich auf das Maximum im Bereich der Hautoberfläche beziehen, ergeben sich somit die folgenden Bestrahlungszeiten.

Bestrahlungsdosis	70 kV
11 Gy	2,18 Minuten
13 Gy	2,58 Minuten
15 Gy	2,97 Minuten
17 Gy	3,32 Minuten
19 Gy	3,76 Minuten
21 Gy	4,15 Minuten

Tabelle 4: Bestrahlungsdosis und entsprechende Bestrahlungsdauer bei 70 kV



Abbildung 3: Bestrahlungsaufbau mit Narkosegerät



Abbildung 4: Maus während Bestrahlungssituation

3.2.5. Nachbeobachtungszeit

Die Nachbeobachtungszeit erstreckt sich auf einen Zeitraum von 371 Tagen (Mittelwert: 317, Min: 0, Max: 371) nach dem ersten Bestrahlungstag. Danach erfolgt die Euthanasierung der Tiere zur weiteren immunhistochemischen Untersuchung.

3.2.5.1 Beobachtung und Untersuchung

Innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums werden die Tiere regelmäßig untersucht. Die alleinige Beobachtung der Tiere erlaubt bereits Aussagen zum Fress- und Trinkverhalten. Außerdem kann man einen allgemeinen Status des natürlichen Auftretens und Gehabes der Tiere ermitteln, sowie das äußere Erscheinungsbild beurteilen. Diese Beobachtungen fließen in einen Clinical Score (vgl. Tabelle 5) ein, um den Verlauf nach Bestrahlung zu dokumentieren.

Strahleninduzierte Myelopathien des cervikalen Rückenmarks zeigen sich klinisch nach einer gut definierbaren Latenzzeit von ca. 120 Tagen in Lähmungserscheinungen der Vorderläufe, die bis zur kompletten Parese rasch fortschreiten und irreversibel sind. Dies ist zumindest in Rattenmodellen (Fischer 344) gut beschrieben [4, 99].

Um den ersten Punkt dieser eventuellen motorischen Ausfälle nicht zu verpassen, werden die Tiere in den ersten 2 Monaten nach der zweiten Bestrahlung alle 4 Tage einem Test unterzogen.

Im dritten Monat nach der zweiten Bestrahlung wird der Test alle 2 Tage durchgeführt.

3.2.5.1.1. Untersuchung

Die Tiere müssen eine 20 cm lange Strecke über ein Gitter (obere Auflage des Tierkäfigs) laufen und im Anschluss daran werden sie ganz leicht am Schwanz in die Höhe gehoben, aber nur so weit, dass sich die Tiere noch am Gitter festhalten können, um zu beurteilen mit welcher Kraft sie dies tun.

Dieser einfache Test zeigt uns, ob die Tiere einerseits nach wie vor zu koordiniertem Laufen fähig sind und andererseits wie es um ihre tonischen Fähigkeiten bestellt ist. Ausfallerscheinungen in diesem Test können als Zeichen einer Myelopathie gedeutet werden.

3.2.5.1.2. Clinical Score

Der Clinical Score wurde unter Berücksichtigung des Nachbeobachtungszeitraums und im Hinblick auf die zu erwartenden Nebenwirkungen der Bestrahlung erstellt. Nach diesen Kriterien werden die Tiere untersucht.

Punkte	0	1	2	3	4
Fell / Haut	o.p.B.	Verlust/Rötung			
Fressverhalten	normal	Abnahme	progredient		
Koordination	o.p.B.	gestört	progredient		
Parese	o.p.B.	Monoparese	Paraparese	Tetraparese	Plegie

Tabelle 5: Clinical Score zur Beurteilung der Tiere in der Nachbeobachtungszeit. (o.p.B. = ohne pathologischen Befund)

3.2.5.2. Euthanasiemethode

Die Tiere werden nach Ende des Nachbeobachtungszeitraums mit 2-3 mg Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®], 160 mg/ml, Merial, Hallbergmoos) i.p. euthanasiert.

3.2.6. Präparation und Entnahme des cervikalen Rückenmarks

Nach der Euthanasie erfolgt die Entnahme der Wirbelsäule *in toto*. Zur besseren Orientierung wird der Kopf an der Wirbelsäule belassen und kaudal im thorakalen Bereich außerhalb des cervikalen Bestrahlungsfeldes die Wirbelsäule abgesetzt und 24 Stunden in Formaldehyd (4%) fixiert.

Aus diesem Präparat wird in einem zweiten Schritt der bestrahlte cervikale Abschnitt herausgeschnitten, wobei dieser in drei weitere Anschnitte unterteilt wird, um nicht nur eine Ebene der bestrahlten Region zu erhalten. Zur Verdeutlichung siehe Abbildung 5. Die schwarzen Linien zeigen die groben Absetzungsränder und die roten unterteilen die unterschiedlichen Ebenen der endgültigen, später in Paraffin eingebetteten Blöcke.

Zur Entkalkung werden die erhaltenen Schnittblöcke für 16 Stunden in EDTA eingelegt. Diese Blöcke werden in Paraffin eingebettet.



Abbildung 5: grobe Orientierung der Schnittführung. Die schwarzen Linien zeigen die groben Absetzungsrandern, die roten die drei Ebenen der späteren Blöcke.

3.2.7. Immunhistochemie

Die Paraffinschnitte der Präparate werden mit einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Thermo Fisher Scientific Inc.) geschnitten (Schnittdicke: ca. 2-3 μm).

Alle Untersuchungen werden mit einem indirekten Verfahren der Immunhistochemie durchgeführt, wobei wir uns einheitlich für das Peroxidase-anti-Peroxidase-Modell entschieden. Wir verwenden dazu das ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse der Firma DakoCytomation in der 3. Ausgabe und folgenden Antikörper:

Phospho-Histone H2AX (Ser139) Antikörper der Firma Cell Signaling Technology® in der Verdünnung 1:500.

3.2.7.1. Immunhistochemie-Protokoll und Standardreagenzien

Nach einer längeren Testphase des Antikörpers, in der wir die jeweilig beste Verdünnung und Möglichkeiten der Variation des Immunhistochemieprotokolls ausarbeiteten, hat sich folgendes Protokoll etabliert:

Protokoll-Immunhistochemie
Entparaffinieren (absteigende Alkoholreihe)
7 Minuten kochen in Citrat-Puffer (ph 6,0); Dampfkochtopf
Waschen (Tris-Puffer)
30%iges H ₂ O ₂ (20ml H ₂ O ₂ : 80ml aqua dest), 20 Minuten
Waschen (Tris-Puffer)
Avidin, 15 Minuten
Waschen (Tris-Puffer)
Biotin, 15 Minuten
1. AK (1:500) gegen γ -H2AX
Über Nacht bei 4°C aufbewahren
Waschen (Tris-Puffer)
2. AK (aus Kit), 30 Min
Waschen (Tris-Puffer)
Komplexbildner (aus Kit), 30 Min
Waschen
Entwickeln mit DAB (aus Kit)
Gegenfärben mit Hämalaun
Eindecken mit wässrigem Medium (Glycergel, Fa. Dako)

Tabelle 6: Protokoll-Immunhistochemie

Standardreagenzien	
Citratpuffer:	2,1g Citronensäure-Monohydrat in 700ml <i>aqua dest</i> lösen, mit 5N NaOH auf ph 6 einstellen, auffüllen mit <i>aqua dest</i> auf 1l
10x Tris-Puffer Stocklösung:	60,5g TRIS-Base und 90g NaCl in 700ml <i>aqua dest</i> lösen, mit 2N HCL auf ph 7,6 einstellen und mit <i>aqua dest</i> auf 1l auffüllen Gebrauchslösung 1:10 verdünnen mit <i>aqua dest</i>
Antikörperverdünnungslösung:	ChemMate Antibody Diluent Art.Nr. S2022, Dako
PBS-Puffer-Konzentrat:	200,0g NaCl, 5,0g KCl, 28,75g Na ₂ HPO ₄ und 5,0gKH ₂ PO ₄ in 1,0l <i>aqua dest</i> lösen und pH 7,4 mit HCL einstellen. Gebrauchslösung: 1:25 verdünnen mit <i>aqua dest</i> und pH 7,4 mit HCL einstellen
Hämalaun:	Mayers Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt) Verdünnen 1:1 mit <i>aqua dest</i>
EDTA (Entkalkung)	1000ml <i>aqua dest</i> , 34g Trisaminomethan, 100g C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ (Titriplex)

Tabelle 7: Standardreagenzien

3.2.7.2. Auswertungsmethode

Die fertigen Schnitte werden am Ende mikroskopisch (Olympus, BX51, Hamburg) begutachtet und entsprechend den immunhistochemischen Anfärbungen ausgewertet. Um die einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wird ein rein deskriptives Verfahren angewandt.

Es wird jeweils eine Hälfte des Rückenmarksquerschnitts ausgewertet und entsprechend den sichtbaren Anfärbungen mit 40facher Vergrößerung in 10 *high power fields (HPF)* ausgezählt. Nur die Hälfte des Rückenmarksquerschnitts wurde gewählt, um auch die Schnitte zu verwenden, die aufgrund von Einbettungsartefakten nicht vollständig erhalten sind.

3.2.8. Statistik

Zur statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wird der Wilcoxon Rangsummentest für zwei unabhängige Stichproben (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney) [80] in Verbindung mit Microsoft Excel verwendet. Das Signifikanzniveau wird auf 0,05 festgelegt bei zweiseitiger Fragestellung. Damit werden jeweils zwei unterschiedliche Gruppen miteinander verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Mortalität in der Nachbeobachtungszeit

4.1.1. Mortalität der Narkose

Die entscheidende Nebenwirkung der Narkose stellt eine zu tiefe Atemdepression dar, die im schlimmsten Falle den Tod des Tieres nach sich zieht. Einige Tiere konnten wir durch einfache Maßnahmen, wie leichten Druck auf die Brust oder Zufuhr von Sauerstoff wieder beleben.

Acht Tiere verloren wir durch besagte Atemdepression direkt nach oder während der Narkose (siehe Tabelle 8).

Maus-Nr.:	Gruppe	Tage nach 1. Bestrahlung
1	Kontrolle	0
34	p53 Inhibitor	0
37	p53 Inhibitor	7
63	Erythropoetin 2	7
64	Erythropoetin 2	7
69	Erythropoetin 2	7
85	TNF- α Inhibitor	0
94	Erythropoetin 1	7

Tabelle 8: Narkose-Opfer

4.1.2. Mortalität in der Nachbeobachtungszeit

Während der Nachbeobachtungszeit sind einige Tiere verstorben. Beginnend mit den bereits im Kapitel 4.1.1. beschriebenen Narkose-Opfern, über die wahrscheinlich aus Schwäche verstorbenen Tiere, die aufgrund von unter den Tieren mitunter herrschendem Kannibalismus nicht einer Sektion zugeführt werden konnten, bis zu Tieren, die eine progrediente Klinik entwickelten und frühzeitig euthanasiert und untersucht wurden (vgl. Kapitel.4.2.1.).

In Tabelle 9 sind alle Tiere aufgelistet, die vor dem Ende der Nachbeobachtungszeit gestorben sind, einschließlich der Tiere, die durch die Narkose ums Leben kamen. Wenn man die am Endpunkt von 371 Tagen euthanasierten Tiere mit einbezieht, ergibt sich eine durchschnittliche Dauer der Nachbeobachtungszeit von 317 Tagen (Min: 0 Tage; Max 371) bezogen auf den ersten Bestrahlungstag.

Maus-Nr.	Gruppe	Tage nach 1.Bestrahlung
1	Kontrolle	0
5	Kontrolle	220
11	Kontrolle	176
12	Kontrolle	182
15	Kontrolle	203
18	Kontrolle	318
24	p53 Inhibitor	203
29	p53 Inhibitor	351
31	p53 Inhibitor	105
33	p53 Inhibitor	362
34	p53 Inhibitor	0
37	p53 Inhibitor	7
40	Kontrolle	25
43	Kontrolle	355
53	Erythropoetin 1	304
63	Erythropoetin 2	7
64	Erythropoetin 2	7
69	Erythropoetin 2	7
80	TNF- α Inhibitor	13
85	TNF- α Inhibitor	0
92	Erythropoetin 1	42
94	Erythropoetin 1	7
95	Erythropoetin 1	356
96	Erythropoetin 1	353

Tabelle 9: Verstorbene Tiere in der Nachbeobachtungszeit (inklusive Narkose-Opfer)

Insgesamt verloren wir vor Ablauf der Nachbeobachtungszeit 24 Tiere. Eine nähere Betrachtung der unterschiedlichen Gruppen liefern Tabelle 10 und Tabelle 11. In Tabelle 11 sind die Narkose-Opfer herausgenommen, da sie nicht in die endgültige Nachbeobachtungszeit miteinbezogen werden können.

Gruppe	Kontrolle	p53 Inhibitor	TNF α Inhibitor	Erythropoetin1	Erythropoetin2	Gesamt
Anzahl	35	16	16	16	16	99
Verluste	9 (25,7%)	5 (31,3%)	2 (12,5%)	5 (31,3%)	3 (18,8%)	24 (24,2%)

Tabelle 10: Verstorbene Tiere in den unterschiedlichen Gruppen (inklusive Narkose-Opfer)

Gruppe	Kontrolle	p53 Inhibitor	TNF α Inhibitor	Erythropoetin1	Erythropoetin2	Gesamt
Anzahl	34	14	15	15	13	91
Verluste	8 (23,5%)	3 (21,4%)	1 (6,7%)	4 (26,7%)	0 (0%)	16 (17,6%)
Mittelwert	15,62% (\pm 10,40%)					

Tabelle 11: Verstorbene Tiere in den unterschiedlichen Gruppen (ohne Narkose-Opfer)

4.2. Klinische Ergebnisse in der Nachbeobachtungszeit

4.2.1. Klinische Beobachtung / Clinical Score

Im Nachbeobachtungszeitraum haben durchweg alle Tiere einen temporären Fellverlust sowie eine Rötung im Bereich des Bestrahlungsfeldes entwickelt. So konnte man im Mittel 19 Tage (Max: 26 Tage; Min: 16) nach der ersten Bestrahlung in sämtlichen Gruppen eine beginnende Rötung der Haut sowie einsetzenden Fellverlust im Bestrahlungsbereich beobachten. Dies entspricht einem Wert von 1 in dem angewandten Clinical Score (vgl. Tabelle 5). Fellverlust und Rötung im Bereich des Bestrahlungsfeldes waren reversibel. Im Mittel 53,7 Tage (Max: 70 Tage; Min: 39) nach der ersten Bestrahlung begann das Fell in besagtem Bereich nachzuwachsen. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen.

Das Fress- und Trinkverhalten der Tiere änderte sich im Nachbeobachtungszeitraum nicht wesentlich, was auf eine geringe Schleimhauttoxizität im Pharynx/Ösophagus schließen lässt. Weitere Auffälligkeiten konnten im Nachbeobachtungszeitraum nicht beobachtet werden. Lediglich zwei Tiere entwickelten Paresen.

Maus-Nr. 71 (E-2-19) entwickelte eine Paraparese der Hinterläufe (Clinical Score: 2) 203 Tage nach der ersten Bestrahlung, bei gleich bleibendem Fress- und Trinkverhalten. Die Paresen entwickelten sich aber innerhalb von 2 Tagen vollständig zurück (Clinical Score: 0) und das Tier blieb den Rest des Nachbeobachtungszeitraums unauffällig. Die nachfolgende Obduktion konnte keine Hinweise auf eine Myelopathie oder etwaigen Tumor mit Rückenmarkskompression bringen, so dass ein ischämisches Ereignis mit *restitutio ad integrum* anzunehmen ist.

Des weiteren erweckte Maus-Nr. 5 (K17/19) unsere Aufmerksamkeit, da sie ebenfalls 217 Tage nach der ersten Bestrahlung Paresen (Clinical Score: 2) sowie Krampfanfälle entwickelte, die allerdings nach zwei Tagen nicht reversibel waren. Sie wurde daraufhin euthanasiert und obduziert, allerdings fanden sich hier auch keine Hinweise auf eine Myelopathie, so dass hier ebenfalls ein ischämisches Ereignis anzunehmen ist.

Generell haben aber alle Tiere, mit Ausnahme der Haut- und Fellveränderungen des ersten Beobachtungszeitraums die komplette Nachbeobachtungszeit bei einem Clinical Score von 0 verbracht.

Tabelle 12 liefert einen Überblick über den Verlauf der Haut- und Fellveränderungen aller in diesem Zeitraum lebenden Tiere. In Tabelle 13 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen aufgelistet.

Maus-Nr.	Gruppe	Beginn (Tage nach 1. Bestrahlung)	Clinical Score	Besserung (Tage nach 1. Bestrahlung)
2	K17/11	24	1	66
3	K17/11	22	1	58
4	K17/15	19	1	58
5	K17/19	23	1	66
6	K17/15	19	1	57
7	K17/13	19	1	66
8	K17/15	19	1	65
9	K17/17	19	1	54
10	K17/17	23	1	70
11	K17/17	20	1	47
12	K17/13	19	1	47
13	K17/15	25	1	65
14	K17/19	19	1	53
15	K17/13	23	1	70
16	K17/13	19	1	49
17	K17/17	26	1	50
18	K17/17	20	1	50
19	K17/17	19	1	59
20	K17/11	21	1	65
21	K17/17	19	1	43
22	K17/15	22	1	47
23	K17/15	24	1	70
24	K17/11	26	1	70
25	K17/11	20	1	47
26	P17/15	23	1	45
27	P17/15	24	1	50
28	P17/15	25	1	56
29	P17/15	23	1	48
30	P17/19	24	1	48
31	P17/19	25	1	66
32	P17/19	22	1	50
33	P17/19	25	1	62
35	P17/19	25	1	62
36	P17/19	23	1	49
38	P17/15	25	1	59
39	P17/15	24	1	60
40	K17/13	19	1	60
41	K17/21	25	1	55
42	K17/19	24	1	59
43	K17/21	22	1	67
44	K17/21	18	1	50
45	K17/19	19	1	43
46	K17/19	19	1	58
47	K17/21	25	1	45
48	K17/21	20	1	64
49	K17/19	24	1	45
50	P17/19	25	1	52
51	E-1-15	16	1	49
52	E-1-19	19	1	49
53	E-1-19	20	1	43
54	E-1-15	16	1	43
55	E-1-19	18	1	52
56	E-1-19	16	1	60
57	P17/15	25	1	60
58	E-1-19	19	1	67
59	E-1-15	16	1	49
60	E-2-15	23	1	44
61	E-2-15	23	1	44
62	E-2-19	22	1	45

65	E-2-15	23	1	48
66	E-2-19	22	1	44
67	E-2-15	23	1	49
68	E-2-15	23	1	50
70	E-2-19	19	1	50
71	E-2-19	20	1	43
72	E-2-19	22	1	60
73	E-2-15	23	1	61
74	E-2-15	17	1	61
75	E-2-15	23	1	43
76	T17/15	22	1	46
77	T17/19	20	1	46
78	T17/19	22	1	50
79	T17/15	21	1	54
81	T17/15	16	1	39
82	T17/19	16	1	42
83	T17/19	22	1	46
84	T17/19	21	1	54
86	T17/15	22	1	66
87	T17/19	22	1	66
88	T17/15	21	1	42
89	T17/15	16	1	50
90	E-1-15	16	1	56
91	E-1-19	16	1	56
92	E-1-15	17	1	50
93	E-1-15	16	1	48
95	E-1-19	16	1	62
96	E-1-15	23	1	62
97	E-1-15	18	1	48
98	T17/15	22	1	50
99	T17/15	22	1	54

Tabelle 12: Beginn und Besserung der Fell- bzw. Hautveränderungen in Bezug auf den Clinical Score.

Gruppe:		Beginn	Besserung
K17/11	Median (Max/Min)	22,6 (26/20)	61,2 (47/70)
	Anzahl Tiere (n)	5	5
	Standardabweichung	±2,154	±8,084
K17/13	Median (Max/Min)	19,8 (23/19)	58,4(70/47)
	Anzahl Tiere (n)	5	5
	Standardabweichung	±1,6	±9,09
K17/15	Median (Max/Min)	21,33 (25/19)	60,33 (70/47)
	Anzahl Tiere (n)	6	6
	Standardabweichung	±2,49	±7,43
K17/17	Median (Max/Min)	20,85 (26/19)	53,28 (70/43)
	Anzahl Tiere (n)	7	7
	Standardabweichung	±2,47	±8,27
K17/19	Median (Max/Min)	21,33 (24/19)	54 (66/43)
	Anzahl Tiere (n)	6	6
	Standardabweichung	±2,35	±8,04
K17/21	Median (Max/Min)	22 (25/18)	56,2 (67/45)
	Anzahl Tiere (n)	5	5
	Standardabweichung	±2,75	±8,28
P17/15	Median (Max/Min)	24,14 (25/23)	54 (60/45)
	Anzahl Tiere (n)	7	7
	Standardabweichung	±0,83	±5,78
P17/19	Median (Max/Min)	24,14 (25/23)	55,57 (66/48)
	Anzahl Tiere (n)	7	7
	Standardabweichung	±1,12	±6,92
T17/15	Median (Max/Min)	20,25 (22/16)	50,12 (66/42)
	Anzahl Tiere (n)	8	8
	Standardabweichung	±2,48	±7,81
T17/19	Median (Max/Min)	20,5 (22/16)	50,66 (66/42)
	Anzahl Tiere (n)	6	6
	Standardabweichung	±2,14	±7,8
E1-15	Median (Max/Min)	17,25 (23/16)	50,62 (62/43)
	Anzahl Tiere (n)	8	8
	Standardabweichung	±2,27	±5,42
E1-19	Median (Max/Min)	17,71 (20/19)	55,57 (67/43)
	Anzahl Tiere (n)	7	7
	Standardabweichung	±1,57	±7,61
E2-15	Median (Max/Min)	22,25 (23/17)	50 (61/43)
	Anzahl Tiere (n)	8	8
	Standardabweichung	±1,98	±6,78
E2-19	Median (Max/Min)	21 (22/19)	48,4 (60/43)
	Anzahl Tiere (n)	5	5
	Standardabweichung	±1,26	±6,28

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen

4.3. Immunhistochemische Ergebnisse

4.3.1. Übersicht der untersuchten Tiere

Die Immunhistochemie mit dem γ -H2AX-Antikörper wurde nicht bei allen Tieren durchgeführt, sondern beschränkte sich auf die Tiere, welche die Bestrahlungsdosen 17Gy/19Gy sowie 17Gy/21Gy erhalten hatten. Dies da man davon ausging, dass die Wahrscheinlichkeit subklinische Schäden zu finden in den Gruppen mit hohen Strahlendosen größer sein würde. Aus jeder Gruppe wurden somit 5 Tiere immunhistochemisch mit dem γ -H2AX-Antikörper untersucht. Bei der Erythropoetin 2-Gruppe gelangten aufgrund von verfrühtem Ableben nur 4 Tiere zur Untersuchung. Weiterhin wurde das Rückenmark von 2 gänzlich unbehandelten Tieren (u1 und u2) untersucht.

4.3.2. γ -H2AX Ergebnisse

Es hat sich gezeigt, dass das γ -H2AX bei allen Tieren/Gruppen in unterschiedlichem Maße spezifisch in den Endothelien der Gefäße exprimiert wird (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7). In den Gliazellen sowie den Neuronen ließ es sich nicht nachweisen. Im cervikalen Rückenmark der beiden gänzlich unbehandelten Tiere lies es sich auch nicht in den Endothelien nachweisen (siehe Abbildung 8).

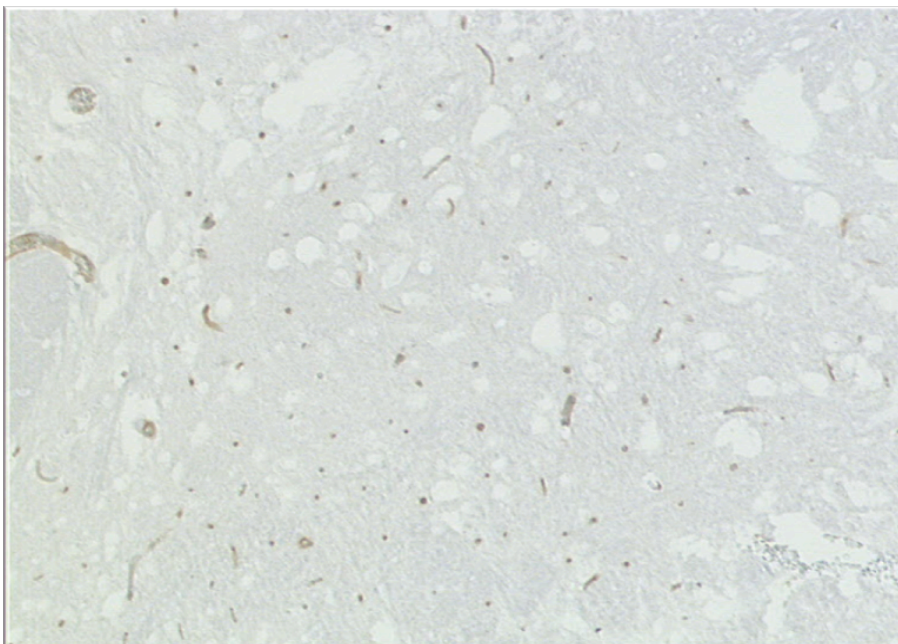


Abbildung 6: γ -H2AX-Anfärbung der Gefäßendothelien

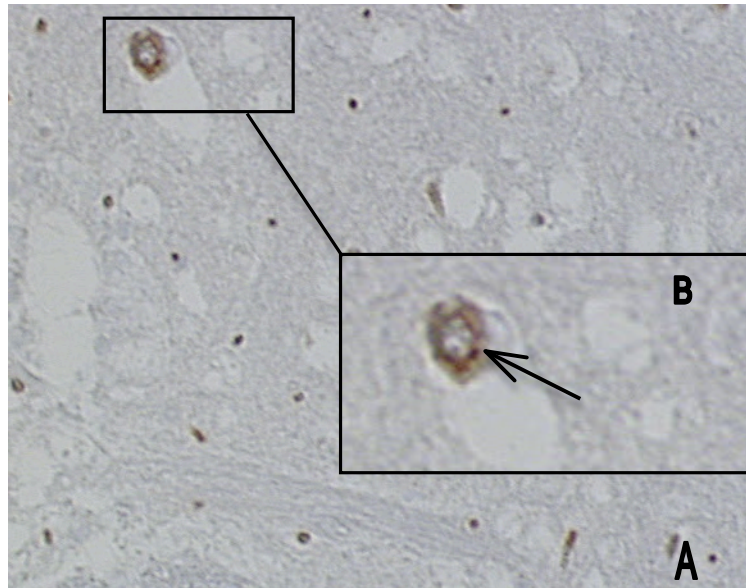


Abbildung 7: γ -H2AX foci in angefärbtem Gefäßendothel (Ausschnitt B aus A)

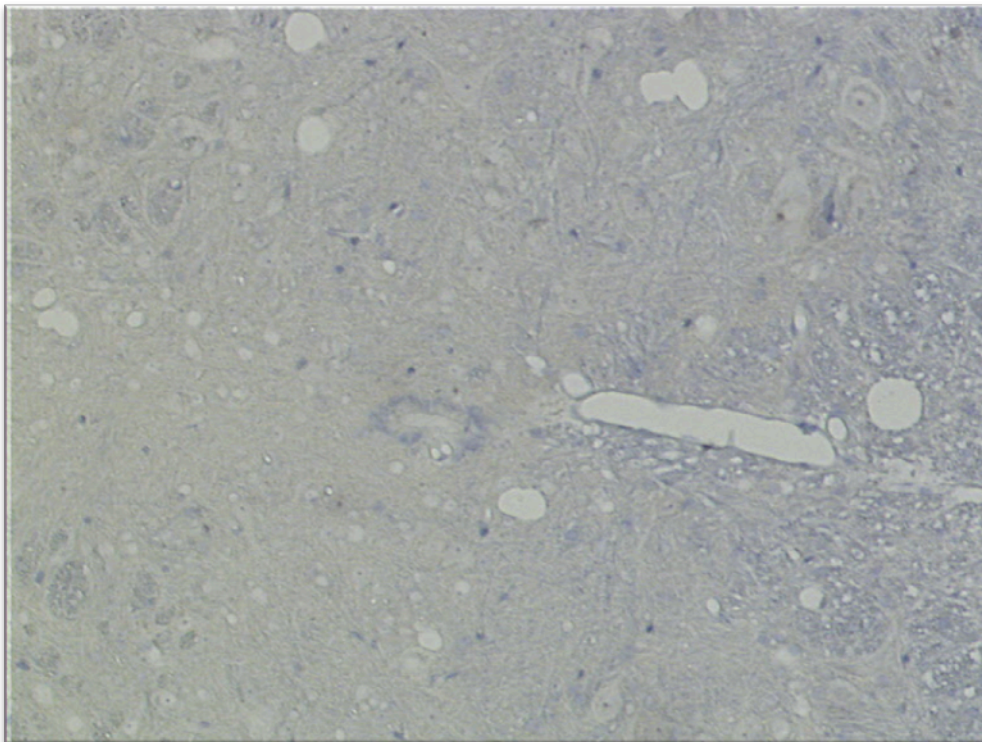


Abbildung 8: gänzlich unbehandeltes Tier; keine γ -H2AX-Expression

Für die einzelnen Gruppen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Maus-Nr	Gruppe	γ -H2AX, Gefäßwände
42	K17/19	215
44	K17/21	45
46	K17/19	216
47	K17/21	95
48	K17/21	205
52	E-1-19	61
55	E-1-19	180
56	E-1-19	56
91	E-1-19	187
58	E-1-19	4
62	E-2-19	65
66	E-2-19	40
70	E-2-19	112
72	E-2-19	123
30	P17/19	15
32	P17/19	14
35	P17/19	27
36	P17/19	1
50	P17/19	8
78	T17/19	191
82	T17/19	124
83	T17/19	42
84	T17/19	98
87	T17/19	67
u1	unbehandelt	0
u2	unbehandelt	0

Tabelle 14: Auswertung Immunhistochemie

4.3.3. Statistische Auswertung und Ergebnisse

Wie schon in Kapitel 3.2.8. erwähnt, wurden die Daten mit dem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney [80] ausgewertet. Er wurde gewählt, weil die Gruppengröße und damit die erhaltenen Stichprobenwerte relativ klein waren. Dieser Test ist ein Rangsummentest für zwei unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt bei zweiseitiger Fragestellung. Die Nullhypothese lautete: es besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen. Zur Verdeutlichung und besseren Übersicht sind folgende Formeln wichtig, da deren Werte in den nachfolgenden Tabellen auftauchen. Vergleicht man diese Werte, wird der kleinere der beiden gewählt,

um mit Hilfe von Tabelle 24 die Signifikanz zu bestimmen bzw. ob die Nullhypothese angenommen oder verworfen werden kann.

$$U_A = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_A$$

Formel 1: U_A -Wert

$$U_B = mn + \frac{n(n+1)}{2} - R_B$$

Formel 2: U_B -Wert

Zuerst werden alle Gruppen mit der Kontroll-Gruppe verglichen, nachfolgend die Gruppen untereinander.

Kontroll- und Erythropoetin1-Gruppe										
Kontrolle (A):										
n = 5										
Werte: 45 95 205 215 216										
Erythropoetin1 (B)										
n = 5										
Werte: 4 56 61 180 187										
Rangzahl:										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stichproben-Wert:	4	45	56	61	95	180	187	205	215	216
Stichprobe:	B	A	B	B	A	B	B	A	A	A

$R_A =$		2			5			8	9	10	=	34
$R_B =$	1		3	4		6	7				=	21
$U_A = 6$												
$U_B = 19$												

Tabelle 15: Kontroll- und Erythropoetin 1-Gruppe, U-Test

Kontroll- und Erythropoetin2-Gruppe										
Kontroll (A):										
n = 5										
Werte: 45 95 205 215 216										
Erythropoetin2 (B)										
n = 4										
Werte: 40 65 112 123										
Rangzahl:										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Stichproben-Wert:	40	45	65	95	112	123	205	215	216	
Stichprobe:	B	A	B	A	B	B	A	A	A	
$R_A =$		2		4			7	8	9	= 30
$R_B =$	1		3		5	6				= 15
$U_A = 5$										
$U_B = 15$										

Tabelle 16: Kontroll- und Erythropoetin 2 Gruppe

Kontroll- und p53 Inhibitor-Gruppe										
Kontroll (A):										
n = 5										
Werte: 45 95 205 215 216										

p53 Inhibitor (B)											
n = 5											
Werte: 1 8 14 15 27											
Rangzahl: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10											
Stichproben-Wert:	1	8	14	15	27	45	95	205	215	216	
Stichprobe:	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	
$R_A =$						6	7	8	9	10	= 40
$R_B =$	1	2	3	4	5						= 15
$U_A =$	0										
$U_B =$	25										

Tabelle 17: Kontroll- und p53 Inhibitor-Gruppe; U-Test

Kontroll- und TNFα Inhibitor-Gruppe											
Kontroll (A):											
n = 5											
Werte: 45 95 205 215 216											
TNFα Inhibitor (B)											
n = 5											
Werte: 42 67 98 124 191											
Rangzahl: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10											
Stichproben-Wert:	42	45	67	95	98	124	191	205	215	216	
Stichprobe:	B	A	B	A	B	B	B	A	A	A	
$R_A =$		2		4				8	9	10	= 33
$R_B =$	1		3		5	6	7				= 22

$U_A =$	7
$U_B =$	18

Tabelle 18: Kontroll- und $TNF\alpha$ Inhibitor-Gruppe; U-Test

TNF α Inhibitor- und Erythropoetin1-Gruppe												
TNFα Inhibitor (A)												
n = 5												
Werte: 42 67 98 124 191												
Erythropoetin1 (B)												
n = 5												
Werte: 4 56 61 180 187												
Rangzahl:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Stichproben-Wert:	4	42	56	61	67	98	124	180	187	191		
Stichprobe:	B	A	B	B	A	A	A	B	B	A		
$R_A =$		2			5	6	7			10	=	30
$R_B =$	1		3	4				8	9		=	25
$U_A =$												
10												
$U_B =$												
15												

Tabelle 19: TNF α Inhibitor- und Erythropoetin 1-Gruppe; U-Test

TNF α Inhibitor- und Erythropoetin 2- Gruppe										
TNFα Inhibitor (A)										
n = 5										
Werte: 42 67 98 124 191										
Erythropoetin2 (B)										
n = 4										

Werte:		40	65	112	123						
Rangzahl:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stichproben-Wert:		40	42	65	67	98	112	123	124	191	
Stichprobe:		B	A	B	A	A	B	B	A	A	
R _A =			2		4	5			8	9	= 28
R _B =		1		3			6	7			= 17
U _A =		7									
U _B =		13									

Tabelle 20: TNF α Inhibitor- und Erythropoetin 2-Gruppe; U-Test

p53 Inhibitor- und Erythropoetin1-Gruppe											
p53 Inhibitor (A)											
n = 5											
Werte:		1	8	14	15	27					
Erythropoetin1 (B)											
n = 5											
Werte:		4	56	61	180	187					
Rangzahl:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stichproben-Wert:		1	4	8	14	15	27	56	61	180	187
Stichprobe:		A	B	A	A	A	A	B	B	B	B
R _A =		1		3	4	5	6				= 19
R _B =			2					7	8	9	10 = 36

U_A =	21
U_B =	4

Tabelle 21: p53 Inhibitor- und Erythropoetin 1- Gruppe; U-Test

p53 Inhibitor- und Erythropoetin2-Gruppe										
p53 Inhibitor (A)										
n = 5										
Werte: 1 8 14 15 27										
Erythropoetin2 (B)										
n = 4										
Werte: 40 65 112 123										
Rangzahl:										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stichproben-Wert:	1	8	14	15	27	40	65	112	123	
Stichprobe:	A	A	A	A	A	B	B	B	B	
R _A =	1	2	3	4	5					= 15
R _B =						6	7	8	9	= 30
U_A = 20										
U_B = 0										

Tabelle 22: p53-Inhibitor- und Erythropoetin 2 -Gruppe; U-Test

TNF α Inhibitor- und p53 Inhibitor-Gruppen										
TNF α Inhibitor (A)										
n = 5										
Werte: 42 67 98 124 191										
p53 Inhibitor (B)										
n = 5										
Werte: 1 8 14 15 27										
Rangzahl:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stichproben-Wert:	1	8	14	15	27	42	67	98	124	191
Stichprobe:	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B
R _A =	1	2	3	4	5					= 15
R _B =						6	7	8	9	10 = 40
U _A = 25										
U _B = 0										

Tabelle 23: TNF α Inhibitor- und p53 Inhibitor-Gruppe; U-Test

Kritische Werte von U für den Test von Wilcoxon, Mann und Whitney, zweiseitiger Test, $\alpha = 0,05$ (Ausschnitt nach [80]):

<i>m</i>	<i>n</i>				
	1	2	3	4	5
1	-				
2	-	-			
3	-	-	-		
4	-	-	-	0	
5	-	-	0	1	2

Tabelle 24: Kritische Werte von U; zweiseitiger Test, $\alpha = 0,05$

Ergebnis – Übersicht:

Nullhypothese wird beibehalten (p-Wert)	Nullhypothese wird auf dem 5%-Niveau abgelehnt (p-Wert)
Kontroll- vs. Erythropoetin 1- Gruppe (0,15)	Kontroll-/ p53 Inhibitor-Gruppe (0,05)
Kontroll- vs. Erythropoetin 2- Gruppe (0,25)	p53 Inhibitor-/ Erythropoetin 2-Gruppe (0,05)
Kontroll- vs. TNF α Inhibitor-Gruppe (0,175)	p53 Inhibitor-/TNF α Inhibitor-Gruppe (0,05)
TNF α Inhibitor- vs. Erythropoetin 1-Gruppe (0,25)	
TNF α Inhibitor- vs. Erythropoetin 2-Gruppe (0,35)	
p53 Inhibitor- vs. Erythropoetin 1-Gruppe (0,1)	

Tabelle 25: : Ergebnis Übersicht. U-Test; zweiseitiger Test; $\alpha = 0,05$

Der einzige signifikante Unterschied zwischen den Gruppen findet sich in den Konstellationen, in denen die p53 Inhibitor-Gruppe vertreten ist, wobei angenommen wird, dass die nicht signifikanten Ergebnisse für den Vergleich zwischen der p53 Inhibitor- und der Erythropoetin 1-Gruppe ein Artefakt darstellen kann (kleine Gruppen, im Trend weniger Anfärbung in der p53 Inhibitor-Gruppe, also passend zu den anderen Resultaten mit diesem Ansatz). Bei allen anderen ist die Nullhypothese anzunehmen. Jedoch bleibt zu bedenken, dass die Gruppengrößen der einzelnen Gruppen ziemlich gering sind und dadurch die statistische Power begrenzt ist. Man läuft also Gefahr einen Fehler erster Art zu machen.

Die weitere Beurteilung der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 5.2.2 der Diskussion.

5. Diskussion

5.1. Einfluss der Methodik auf die Ergebnisse

5.1.1. Narkose

Generell lässt sich sagen, dass die Isofluran-Narkose von den Tieren relativ gut vertragen wurde; lediglich 8 Tiere sind während oder unmittelbar nach der Narkose wohl aufgrund einer zu tiefen Atemdepression verstorben. Dies entspricht ca. 8 % aller bestrahlten Tiere. Es lässt sich sagen, dass diese Form der Narkose gut zu steuern ist und die Tiere unter den relativ kurzen Bestrahlungszeiten während der einzelnen Sitzungen ideal narkotisiert waren, ohne dass sie danach einer langen Beobachtungszeit bedurften, da sie wenige Minuten nach der Prozedur schon wieder bei suffizienter Atmung und Bewusstsein im Käfig herumliefen.

5.1.2. Bestrahlung

Um unerwünschten Toxizitäten in dem Rückenmark benachbarten Geweben entgegen zu wirken, setzten wir eine das Bestrahlungsfeld limitierende Bleiplatte ein.

In der Nachbeobachtungszeit haben die Tiere außer den beschriebenen Fell- und Hautverlusten, die unmittelbar auf die Bestrahlung zurückzuführen sind, keine auffälligen Myelopathien oder Änderungen im Trink- und Fressverhalten entwickelt. Im Rattenmodell sind diese Nebenwirkungen beschrieben worden [4, 66, 98].

5.1.3. Beobachtung und Untersuchung in der Nachbeobachtungszeit

Die Beobachtung, Untersuchung und Einordnung in einen Clinical Score stellen ein Mittel dar, die eventuell beginnenden klinischen Veränderungen der Tiere rechtzeitig zu erkennen und hinreichend zu dokumentieren. Die in dieser Studie durchgeführte Untersuchung ist eine einfache Möglichkeit eventuelle Koordinationsstörungen, Paresen oder Myelopathien zu erkennen. Natürlich fordert diese Untersuchung auch eine gewisse Erfahrung des Untersuchers, denn man kann Gefahr laufen, eine einfache stimmungsabhängige Trägheit der Tiere als pathologisch zu werten. Darum sollte der

Test vergleichbar, nachvollziehbar und eindeutig sein, auch für unterschiedliche Untersucher, damit ein stringenter Verlauf während der Nachbeobachtungszeit zu dokumentieren ist. Nur geringe Auffälligkeiten lassen sich mit dem Test nicht sicher nachweisen, dies würde eine intensivere neurologische Untersuchung erfordern, doch eine Progredienz des entsprechenden Befundes würde erfasst werden.

5.1.4. Einbettung und Schnittführung des Rückenmarks

Die Einbettung und korrekte Schnittführung der Präparate haben natürlich einen hohen Stellenwert in der späteren mikroskopischen Beurteilung. Man muss sich auch vor Augen führen, dass ein bei der Präparation beschädigtes Rückenmark im schlechtesten Fall nicht zur Immunhistochemie verwendet werden kann, und damit sich unweigerlich den späteren, weiterführenden Untersuchungen entzieht. Die vorliegenden Präparate konnten alle zur Auswertung verwendet werden.

5.1.5. Immunhistochemie

Das richtige Immunhistochemieprotokoll für den jeweils verwendeten Antikörper zu finden, stellte im Rahmen dieser Arbeit eine große Herausforderung dar. Nicht jedes, für einen ausgewählten Antikörper bereits bestehende Protokoll, funktioniert auch bei dem hier zu untersuchendem Gewebe, so dass man sich erst einmal auf Testreihen unterschiedlicher Protokolle einlassen muss, bevor man sich den eigentlichen Untersuchungen widmen kann. Nach vielen frustrierten Versuchen hat sich unser Protokoll (vgl. Kapitel 3.2.7.1) als funktionstüchtig und reproduzierbar erwiesen.

5.1.6. Auswertungsmethode

Über die Auswertungsmethode, die Auszählung der spezifischen Anfärbungen in 10 HPF, lässt sich sagen, dass sie einen rein deskriptiven Charakter hat. Die Auszählung der Schnitte ist natürlich auch mit Fehlern behaftet, da sie abhängig von der Konzentration und Erfahrung des Untersuchers ist, doch durch die mehrmalige

Auszählung an unterschiedlichen Tagen und der Bildung des Mittelwertes wurden solche Fehlerquellen minimiert, so dass die Methode durchaus eine Aussage erlaubt.

5.1.7. Statistik

Der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney wurde aufgrund der geringen Anzahl der Stichproben zur statistischen Auswertung gewählt. Die Power der Studie ist durch die Gruppengröße beschränkt. Generell läuft man also Gefahr bei signifikant erscheinenden Ergebnissen die Nullhypothese zu schnell zu verwerfen und damit einen Fehler erster Art zu begehen. Für nachfolgende Studien kann dies heißen, eine größere Anzahl von Tieren der Immunhistochemie zuzuführen, um eine ausreichende Test-Power zu erhalten.

5.2. Ergebnisse

5.2.1. Klinische Ergebnisse

Entgegen der Erwartung, dass einige Tiere nach einer gewissen Latenz dosisabhängig Myelopathien entwickeln, wie es in vergleichbaren Ratten- und Maus-Modellen der Fall war [4, 56, 66, 98], blieben nahezu alle Tiere während der Nachbeobachtungszeit neurologisch unauffällig. Lediglich zwei Tiere sind auffällig geworden durch Paresen, die aber wohl auf ein ischämisches Ereignis zurückzuführen sind, da die Obduktionen bezüglich Myelopathien oder etwaiger Tumoren mit Rückenmarkskompression ergebnislos blieben (vgl. Kapitel 4.2.1.). Lo et al. haben in ihrer Arbeit beschrieben, dass Mäuse in 16% der Fälle vorübergehende neurologische Ausfälle entwickeln, in der Mehrzahl jedoch permanente Rückenmarksschäden [56]. Aus dieser und früheren Arbeiten lässt sich schließen, dass Mäuse wohl eine größere Toleranz gegenüber den verwendeten Bestrahlungsdosen haben als Ratten. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass die Feldgröße eine Rolle spielt und dass das hier verwendete 1 cm Feld weniger Schäden verursacht als die bei Ratten gebräuchlichen 2 cm (Volumeneffekt).

Bezug nehmend auf die in der Nachbeobachtungszeit verstorbenen Tiere ohne die Narkose-Opfer liegt die Verlustquote im Durchschnitt in den einzelnen Gruppen bei 15,6% (vgl. Tabelle 11, Kapitel 4.1.2.). Insgesamt betrug die Verlustquote 26,4%. Es lassen sich allerdings keine Aussagen darüber machen, ob eine Gruppe besonders wenige Todesfälle aufwies und ob dies mit den untersuchten Substanzen korreliert, weil keine eindeutig therapieassoziierten, lebensbedrohliche Toxizitäten auftraten.

5.2.2. γ -H2AX Ergebnisse: Allgemein

Die phosphorylierte Form des H2AX, γ -H2AX, hat sich bei unseren immunhistochemischen Untersuchungen ausschließlich in den Gefäßendothelien des Rückenmarks gezeigt. Der Nachweis erfolgte in allen bestrahlten Gruppen, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung. Die höhere Strahlendosis (17 + 21 Gy) war im Vergleich zu 17 + 19 Gy nicht mit einer höheren Anfärbung verbunden. Die Tatsache, dass in der Kontrollgruppe zwei unterschiedlich hohe Strahlendosen verwendet wurden, hat also keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Bestrahlung noch nach einer Latenz von 371 Tagen γ -H2AX nachgewiesen werden kann und diese Färbung lässt, wie eingangs erwähnt, einen Rückschluss auf Doppelstrangbrüche der DNA zu. Allerdings fand sich γ -H2AX lediglich in den Gefäßendothelien, denen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Strahlenmyelopathie eingeräumt wird (vgl. Kapitel 2.2.).

Betrachtet man die hier erhaltenen Ergebnissen so muss man sagen, dass eine spezifische Anfärbung anzunehmen ist, da im Gewebe gänzlich unbehandelter Tiere nach Untersuchung mit dem identischen Immunhistochemie-Protokoll keine Anfärbung erfolgt ist. Allerdings muss man hier auch anmerken, dass lediglich zwei zusätzliche, unbestrahlte Tiere untersucht wurden.

Es zeigte sich also eine auf die Gefäßendothelien beschränkte Anfärbung, während Gliazellen und Neurone ungefärbt blieben. Dies lässt darauf schließen, dass zum untersuchten Zeitpunkt in diesen Zellen kein γ -H2AX nachweisbar war. Ob es zu einem anderen Zeitpunkt nachweisbar gewesen wäre, lässt sich rückblickend nicht ermitteln. Wenn, wie vielfach in der Literatur berichtet, γ -H2AX ein geeigneter Marker zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen der DNA ist [75, 81, 82], liegen also in den Gefäßendothelien nach einer Latenz von 371 Tagen nach der ersten Bestrahlung noch

Doppelstrangbrüche vor, unabhängig ob mit pifithrin-alpha[®], Remicade[®] oder Erythropoetin zusätzlich behandelt wurde. Frühere Untersuchungen in unterschiedlichen Modellen waren zunächst auf wenige Stunden oder Tage und später auf die ersten Wochen nach Bestrahlung begrenzt [81, 82].

Interessant wäre weiterhin zu untersuchen inwieweit γ -H2AX im Rückenmark zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung nachweisbar ist (longitudinale Studie) und wenn, ob es lediglich auf die Gefäßendothelien beschränkt bleibt oder auch in Neuronen und Gliazellen zu finden ist. Als weitere Frage könnte untersucht werden, ob das Ausmaß der Färbung mit der Schwere einer Strahlenmyelopathie korreliert. Hier bieten sich also Möglichkeiten für nachfolgende Arbeiten, bei denen allerdings noch höhere Strahlendosen eingesetzt werden müssen. Für unsere unterschiedlichen Gruppen werden die Ergebnisse wie folgt bewertet.

5.2.2.1 γ -H2AX Ergebnisse: Gruppen

Grundsätzlich ist in jeder Gruppe mehr oder weniger ausgeprägt γ -H2AX nachgewiesen worden. Zunächst einmal wurden alle Gruppen mit der Kontroll-Gruppe verglichen, danach die Gruppen untereinander. Hatten also pifithrin-alpha[®], Remicade[®] oder Erythropoetin einen Effekt auf die Nachweisbarkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen am Ende der Nachbeobachtungszeit? Wie in Kapitel 4.3.3 ersichtlich, ergaben sich für die TNF- α Inhibitor- und die Erythropoetin-Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe. Lediglich die p53 Inhibitor-Gruppe zeigte signifikante Unterschiede gegenüber der Kontroll-Gruppe. Die Anzahl der γ -H2AX Anfärbungen war geringer. Es gab also weniger DNA-Doppelstrangbrüche als in der Kontroll-Gruppe. Zwischen den TNF- α Inhibitor- und den Erythropoetin-Gruppen bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich mit der p53 Inhibitor-Gruppe zeigte sich ein ähnliches signifikantes Ergebnis wie im Bezug zur Kontroll-Gruppe. Lediglich der Vergleich zwischen p53 Inhibitor und Erythropoetin-1 Gruppe erbrachte kein signifikantes Ergebnis, wobei dieser „Ausreißer“ eventuell als Artefakt angesehen werden kann (kleine Fallzahlen), und letztendlich ein Trend zu deutlich weniger DNA-Doppelstrangbrüchen in der p53 Inhibitor-Gruppe zu finden ist.

Die Ergebnisse erlauben zwei Schlussfolgerungen, wobei wie bereits betont die statistische Power aufgrund der Todesfälle und letztendlich geringen Gruppengröße begrenzt ist.

1. Der TNF- α Inhibitor (Remicade[®]) sowie die unterschiedlichen Dosen Erythropoetin (Epoetin-alfa) führen verglichen mit einer Kontrollgruppe langfristig nicht zu signifikanten Unterschieden in der Präsenz von DNA-Doppelstrangbrüchen in den Gefäßendothelien des Rückenmarks der Maus.
2. Der p53 Inhibitor (pifithrin-alpha[®]) führt im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und den anderen Gruppen zu einer signifikant geringeren Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen in den Gefäßendothelien.

5.3. Diskussion im Bezug zur Strahlenmyelopathie

In der vorliegenden Arbeit hat sich also gezeigt, dass die Tiere im gesamten Nachbeobachtungszeitraum keine klinisch auffälligen Myelopathien entwickelten, unabhängig ob sie mit pifithrin-alpha[®], Remicade[®] oder Erythropoetin behandelt wurden. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass die mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen γ -H2AX gerichtet ist, detektierten DNA-Doppelstrangbrüche ausschließlich, wenn auch in unterschiedlichem Umfang, in den Gefäßendothelien zu finden sind. Dies ist insofern interessant, als den Gefäßendothelien eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Strahlenmyelopathie eingeräumt wird [88]. So kommt es schon in frühen Phasen nach Bestrahlung in den Endothelzellen zu einer Sphingomyelinase-vermittelten Ceramidfreisetzung, die zur Apoptose führt [53, 71]. Bei Gehirnen von Ratten zeigte sich eine reduzierte Anzahl von Blutgefäßen und Endothelzellen schon vor der Entwicklung von Nekrosen nach Bestrahlung mit 22,5 Gy oder 25 Gy [12]. Die Gefäßendothelien sind als Angriffspunkt bei der Prävention der Strahlenmyelopathie bereits Gegenstand experimenteller Untersuchungen. Es wurden z.B. Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor (PDGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF) untersucht [4, 65]. Der Nachweis der DNA-Doppelstrangbrüche könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass selbst nach einer langen Latenzzeit die initial entstandenen Schäden in der DNA der Endothelzellen nicht vollständig repariert

worden sind. Dagegen war in den übrigen Zellen des ZNS kein γ -H2AX nachweisbar, was auf abgeschlossene Reparaturmechanismen deutet.

Zusätzlich ergab sich, dass in der mit dem p53 Inhibitor behandelten Gruppe signifikant weniger γ -H2AX Anfärbung zu finden war als in den übrigen Gruppen. Dies könnte für einen protektiven Effekt eines p53 Inhibitors sprechen, wie er schon von Komarov et al. diskutiert wurde [46]. Der p53 Inhibitor (pifithrin-alpha[®]) scheint generell therapeutische Möglichkeiten bei Prozessen zu bieten, die durch p53-vermittelte Apoptose entstehen. Bei M. Alzheimer scheint er das Neuronensterben zu reduzieren, so wie er bei ischämisch bedingter Apoptose in Gehirn, Herz und Niere protektiv wirken soll [29]. In Tumorzellen ist p53 oftmals herunterreguliert oder liegt in mutierter Form vor, so dass ein p53 Inhibitor bei diesen entarteten Zellen keinen Effekt erzielt.

Der TNF- α Inhibitor (Remicade[®]) sowie Erythropoetin zeigten im Bezug auf die Hautreaktionen im Strahlenfeld sowie auf die Präsenz der durch γ -H2AX detektierten DNA-Doppelstrangbrüche im Rückenmark in unseren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe. Damit ist dennoch nicht auszuschließen, dass TNF- α Inhibitoren einen Effekt auf die durch höhere Strahlendosen induzierte Strahlenmyelopathie haben können. Bei der Bestrahlung der Niere wurden durchaus Effekte gesehen [68], allerdings dahingehend, dass sich die Nierenfunktion bei mit Remicade[®] behandelten Mäusen verschlechterte. Wilson et al. haben gezeigt, dass ein TNF- α Inhibitor in der frühen Phase nach Bestrahlung protektiv auf die Blut-Hirnschranke wirken kann [104]. Dieser scheinbare Widerspruch verdeutlicht, wie wichtig es ist, die Effekte in unterschiedlichen Modellen mit unterschiedlichen Endpunkten und Nachbeobachtungszeiten zu untersuchen um geeignete Szenarien für weiterführende klinische Studien zu finden.

Studien mit Erythropoetin zeigten, dass sich bei der Bestrahlung der Niere im Mausmodell die Nierenfunktion eher verschlechterte [3]. Hassouna et al. haben gezeigt, dass Erythropoetin im Zusammenhang mit einer Strahlentherapie das Wachstum von Gliomzellen fördert und deswegen bei der Therapie von Hirntumorpatienten nicht eingesetzt werden sollte [32]. Vergleichbare Daten existieren aus klinischen Studien bei der Strahlentherapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion. Andere Wachstumsfaktoren, z.B. keratinocyte growth factor und epidermal growth factor,

werden zur Zeit in ähnlichen Patientenkollektiven untersucht, da erste Daten auf eine Reduktion akuter Nebenwirkungen der Strahlentherapie hindeuten.

6. Zusammenfassung

Die Grenzen der Strahlentherapie im Rahmen einer zielgerichteten Tumorthherapie werden oftmals von den Nebenwirkungen in unterschiedlichen, in die Strahlenfelder gezwungenermaßen miteinbezogenen, Normalgeweben definiert. Werden Anteile des zentralen Nervensystems bestrahlt, so können die dosisabhängigen Nebenwirkungen einigen Patienten noch Jahre später erhebliche Probleme bereiten. Aufbauend auf dem tierexperimentellen Modell der Strahlenmyelopathie wurde in dieser Studie Erythropoetin, Remicade[®] und pifithrin-alpha[®] in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung (2 Einzeldosen) eingesetzt, um eventuelle Effekte auf den klinischen Verlauf der Tiere über einen Nachbeobachtungszeitraum von maximal 371 Tagen zu ermitteln. Anschließend wurden die bestrahlten Regionen des Rückenmarks mit Hilfe eines Antikörpers gegen γ -H2AX auf etwaige DNA-Doppelstrangbrüche immunhistochemisch untersucht.

Im Verlauf der klinischen Nachbeobachtungszeit zeigten die Tiere bis auf Haut- und Fellveränderungen des direkten Bestrahlungsfeldes keine relevanten neurologischen Auffälligkeiten, die auf etwaige Myelopathien hätten schließen lassen. In den nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass γ -H2AX ausschließlich in den Gefäßendothelien der bestrahlten Region im Rückenmark nachzuweisen war, wogegen in Neuronen und Gliazellen keine Anfärbung nachzuweisen war. Demgegenüber zeigten gänzlich unbehandelte Tiere keinerlei Expression.

Die p53 Inhibitor-Gruppe wies im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe signifikant weniger γ -H2AX in den Gefäßendothelien auf. Die anderen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe. Dies wirft die Frage auf, ob der p53 Inhibitor einen protektiven Effekt auf die Gefäßendothelien haben könnte, da nach einer Latenz von 371 Tagen deutlich weniger DNA-Doppelstrangbrüche nachzuweisen waren. Diese Hypothese zu verifizieren sollte Teil nachfolgender Studien sein, die ebenfalls untersuchen müssen inwieweit γ -H2AX zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung exprimiert wird.

7. Abkürzungsverzeichnis

APAAP-Technik	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Technik
ATM	ataxia teleangiectasia mutated gene
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bcl-2	B-cell-Lymphoma 2, Protein
Bzw.	beziehungsweise
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈	Ethylendiamintetraacetatnatriumsalz
C ₁₆ H ₁₉ BrN ₂ OS	1-(4-Methylphenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)ethanone hydrobromide
ca.	circa
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1-15	Erythropoetin 1-Gruppe 17Gy/15Gy
E1-19	Erythropoetin 1-Gruppe 17Gy/19Gy
E2-15	Erythropoetin 2-Gruppe 17Gy/15Gy
E2-19	Erythropoetin 2-Gruppe 17Gy/19Gy
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
FAS-L	Fas ligand
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
G1-Phase	Gap1-phase
G2-Phase	Gap2-phase
Gy	Gray
HCl	Salzsäure, Chlorwasserstoffsäure
HO ₂ -Radikale	Hydroxyl-Peroxy-Radikale
HPF	High Power Fields
i.E.	Internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Inc.	incorporated
K17/11	Kontroll-Gruppe 17Gy/11Gy
K17/13	Kontroll-Gruppe 17Gy/13Gy
K17/15	Kontroll-Gruppe 17Gy/15Gy
K17/19	Kontroll-Gruppe 17Gy/19Gy
K17/21	Kontroll-Gruppe 17Gy/21Gy
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
keV/μm	Kilo Elektronenvolt pro Mikrometer
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
kV	Kilovolt
LET	Linearer Energietransfer
Max	Maximum
MDM2	murine double minute gene
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
Min	Minimum
ml	Milliliter
mRNA	Mitochondriale Ribonukleinsäure
mTNF-α	Membranständiger TNF-α
N	Stoffmenge
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
o.p.B	Ohne pathologischen Befund
p-Wert	Signifikanzniveau
P17/15	P53 Inhibitor-Gruppe 17Gy/15Gy
P17/19	P53 Inhibitor-Gruppe 17Gy/19Gy
PAP-Technik	Peroxidase-anti-Peroxidase-Technik
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	Plateled derived growth factor
rhEPO	Rekombinantes humanes Erythropoetin
s.c.	subcutan
ST	Stammlösung
sTNF-α	Sezernierter TNF-α
T17/15	TNF-α Inhibitor-Gruppe 17Gy/15Gy
T17/19	TNF-α Inhibitor-Gruppe 17Gy/19Gy

TACE	TNF- α converting enzyme
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
U/kg	Unit/Kilogramm
u1	Unbehandelt 1
u2	Unbehandelt 2
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
μ l	Mikroliter

Tabelle 26: Abkürzungsverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

1. Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, Probert L. Oligodendrocytes apoptosis and primary demyelination by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models of multiple sclerosis with primary oligodendroglipathy. *Am J Pathol* 153 (1998): 810-813
2. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994): 3974-3978
3. Andratschke N, Schnaiter A, Weber WA, Cai L, Schill S, Wiedenmann N, Schwaiger M, Molls M, Nieder C. Preclinical evaluation of erythropoietin administration in a model of radiation-induced kidney dysfunction. *In J Radiat Oncol Biol Phys* 64 (2006): 1513-1518
4. Andratschke NH, Nieder C, Price RE, Rivera B, Tucker SL, Ang KK. Modulation of rodent spinal cord radiation tolerance by administration of platelet-derived growth factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60 (2004): 1257-63
5. Ang KK, Stephens LC. Prevention and management of radiation myelopathy. *Oncology* 8 (1994): 71-76
6. Bartke T, Sigmund D, Peters N, Reichwein M, Henkler F, Scheurich P, Wajant H. p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene* 20 (2001): 571-580
7. Baumann M, Budach V, Appold S. Strahlentoleranz des menschlichen Rückenmarks. *Strahlenther Onkol* 170 (1994): 131-139
8. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 (1999): 643-651
9. Billis W, Fuks Z, Kolesnick R. Signaling in and regulation of ionizing radiation-induced apoptosis in endothelial cells. *Recent Prog Horm Res* 53 (1998): 85-93
10. Böcker W, Denk H, Heitz P. Radiogene Schädigung des ZNS. In "Pathologie", Böcker W, Denk H, Heitz P, Urban und Fischer. München, Jena, (2001), 2.Auflage: 297-298,
11. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Nat Acad Sci USA* 97 (2000): 10526-10531
12. Calvo W, Hopewell JW, Reinhold HS, Yeung TK. Time- and dose-related changes in the white matter of the rat brain after single doses of X-rays. *Br J Biol* 61 (1988): 1043-1052
13. Chiang CS, McBride WH. Radiation enhances tumor necrosis factor alpha production by murine brain cells. *Brain Res* 566 (1991): 265-269
14. Coutard H. Principles of x-ray therapy of malignant diseases. *Lancet* 2 (1934): 1-8
15. Coutard H. Roentgentherapy of epitheliomas of the tonsillar region, hypopharynx and larynx from 1920 to 1926. *Am J Roentgenol* 28 (1932): 313-331

16. Curie P, Curie MP, Bemont G. Sur une nouvelle substance fortement radioactive contenue dans la pechblende (note presented by M. Bequerel). *Compt Rend Acad Sci (Paris)* 127 (1898): 1215-1217
17. Ehrenreich H, Fischer B, Norra C, Schellenberger F, Stender N, Stiefel M, Sirén AL, Paulus W, Nave KA, Gold R, Bartels C. Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain* 130 (2007): 2577-2588
18. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. Erythropoietin for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8 (2002): 495-505
19. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, Heinz G, Erdag S, Jahn H, Degner D, Ritzen M, Mohr A, Wagner M, Schneider U, Bohn M, Huber M, Czernik A, Pollmächer T, Maier W, Sirén AL, Klosterkötter J, Falkai P, Rütther E, Aldenhoff JB, Krampe H. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* 12 (2007): 206-220
20. Erbayraktar S, de Lanerolle N, de Lotbiniere A, Erbayraktar S, de Lanerolle N, de Lotbiniere A, Knisely JP, Erbayraktar Z, Yilmaz O, Cerami A, Coleman TR, Brines M. Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically induced brain injury. *Mol Med* 12 (2006): 74-80
21. Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 9 (2004): 18-30
22. Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J* 272 (2005): 3231-40
23. Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278 (2003): 20303-20312
24. Glasser O. Wilhelm Conrad Röntgen and the early history of the Roentgen rays. *AJR Am J Roentgenol* 165 (1995): 1033-40
25. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102 (200): 1-4
26. Grounds MD, Davies M, Torrisi J, Shavlakadze T, White J, Hodgetts S. Silencing TNF- α by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell Tissue Res* 320 (2005): 509-515
27. Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNF- α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J* 18 (2004): 676-682
28. Gu C, Casaccia-Bonofil P, Srinivasan A, Chao MV. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci* 19 (1999): 3043-3049
29. Gudkov AV, Komarova EA. Prospectiv therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 331 (2005): 726-736

30. Hall EJ. The cell cycle Radiobiology for the radiologist. Hall EJ, Giaccia AJ (Ed). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006, 6th edition, 47-51
31. Hansen JC. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 326 (2002): 227-234
32. Hassouna I, Sperling S, Kim E, Schulz-Schaeffler W, Rave-Fränk M, Hasselblatt M, Jelkmann W, Giese A, Ehrenreich H. Erythropoietin augments survival of glioma cells after radiation and temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72 (2008): 927-934
33. Hayakawa K, Borchardt PE, Sakuma S, Ljichi A, Niibe H, Tofilon PJ. Microglial cytokine gene induction after irradiation is affected by morphologic differentiation. *Radiat Med* 15 (1997): 405-410
34. Hermann T, Baumann M, Dörr W. Direkte und indirekte Strahlenwirkung. In "Klinische Strahlenbiologie, kurz und bündig". Urban & Fischer, München, Jena (2006), 4. Auflage: 8-10
35. Hermann T, Baumann M, Dörr W. Zelltod und Bestrahlung. In "Klinische Strahlenbiologie, kurz und bündig". Urban & Fischer, München, Jena (2006), 4. Auflage: 25-27
36. Hermann T, Baumann M, Dörr W. Zelltod und Bestrahlung. In "Klinische Strahlenbiologie, kurz und bündig". Urban & Fischer, München, Jena (2006), 4. Auflage: 24-25
37. Hermann T, Baumann M, Dörr W. Arten ionisierter Strahlung. In "Klinische Strahlenbiologie, kurz und bündig". Urban & Fischer, München, Jena (2006), 4. Auflage: 4-6
38. Herold G et al. Kapitel 1: Hämatologie. In "Innere Medizin" (2009): 18-24
39. Hisahara S, Shoji S, Okano H, Miura M. ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J Neurochem* 69 (1997): 10-20
40. Hoagland MS, Hoagland EM, Swenson HI. The p53 inhibitor pifithrin-alpha is a potent agonist of the aryl hydrocarbon receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 314 (2005): 603-610
41. Hoffmann WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic surviving gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277 (2002): 3247-3257
42. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25 (2004): 177-181
43. Hong JH, Chinag CS, Campbell IL, Sun JR, Withers HR, McBride WH. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33 (1995): 619-626
44. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: Younger than ever. *Eur J Haematol* 78 (2007): 183-205
45. Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP, Mulhern TD. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 8 (2001): 1052-1065

46. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285 (1999): 1733-1737
47. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembran protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53 (1988): 45-53
48. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 14 (1999): 22-28,
49. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358 (1992): 15-16
50. Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *The Oncologist* 8(2003): 15-18
51. Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG. EPO' s alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 20 (2002): 485-492
52. Leonard CL. The röntgen rays as a palliative in the treatment of cancer. *Amer Med* 6 (1903): 854-855
53. Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, Reilly RM, Wong CS. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barriere disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 63 (2001): 5950-5956
54. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Kapitel 5. In "Biochemie und Pathobiochemie". Springer, Heidelberg (2007) 8. Auflage (8): 152-153
55. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Kapitel 29. In "Biochemie und Pathobiochemie" Springer, Heidelberg (2007) 8. Auflage: 955-956
56. Lo YC, McBride WH, Withers HR. The effect of single doses of radiation on mouse spinal cord. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22 (1992): 57-63
57. Luger K. Structur and dynamic behaviour of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev* 13 (2003): 127-135
58. Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL. H2AX a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res* 17 (1989): 625-635
59. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci* 15 (2000): 225-229
60. Merrill JE. Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes and glial precursors in vitro. *Dev Neurosci* 13 (1991): 130-137
61. Mersefelder EL, Parthum MR. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res* 34 (2006): 2653-2662
62. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 76 (1997): 105-116

63. Mulcahy L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* 28(2001): 19-23
64. Nestorov I. Clinical pharmacokinetics of TNF antagonists: how do they differ? *Semin Arthritis Rheum* 34 (2002): 12-18
65. Nieder C, Andratschke N, Price RE, Ang KK. Acceleration of normal-tissue damage expression by early stimulation of cell proliferation in rat spinal cord. *Strahlenther Onkol* 182 (2006): 680-684
66. Nieder C, Andratschke NH, Ang KK. Mechanisms and Modification of the Radiation Response of the Central Nervous System. In "Modification of Radiation Response", Editors Nieder C, Milas L and Ang KK, Springer, Berli, Heidelberg, New York (2003) first edition: 73-87
67. Nieder C, Leicht A, Motaref B, Nestle U, Niewald M, Schnabel K. Late radiation toxicity after whole-brain radiotherapy. *Am J Clin Oncol* 22 (1999): 573-579
68. Nieder C, Schnaiter A, Weber WA, Schill S, Andratschke N, Schwaiger M, Molls M. Detrimental effects of an antibody against tumor necrosis factor alpha in experimental kidney irradiation. *Anticancer Res* 27 (2007): 2353-2357
69. Nitske WR. The life of Wilhelm Conrad Röntgen: discoverer of the x ray. Tucson: University of Arizona Press, 1971.
70. Patterson RP. The radical x-ray treatment of the carcinomata. *Br J Radiol* 9 (1936): 671-679
71. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res* 60 (200): 321-327
72. Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 81 (2003): 123-129
73. Redlich K, Hayser S, Maier A, Dunstan CR, Tohidast-Akrad M, Lang S, Turk B, Pietschmann P, Woloszczuk W, Haralambous S, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Schett G. Tumor necrosis factor-alpha mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum* 46 (2002): 785-792
74. Redon C, Pilch D, Rokagou E, Sedelinkova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12 (2002): 162-169
75. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146 (1999): 905-916
76. Rogakou EP, Nieves-Nira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone et serine 139. *J Biol Chem* 275 (2000): 9390-9395
77. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Iwanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273 (1998): 5858-5868

78. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003): 5057-5062,
79. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13 (2001): 332-337
80. Sachs L, Hedderich J. Wilcoxon Rangsummentest für zwei unabhängige Stichproben. In "Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R", Springer, Berlin Heidelberg New York (2006) 12. Auflage: 391 - 397
81. Sak A, Grehl S, Erichsen P, Engelhard M, Grannass A, Levegrun S, Pottgen C, Groneberg M, Stuschke M. Gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose distribution, irradiated site and time from start of treatment. *Int J Radiat Biol* 83 (2007): 639-652
82. Sak A, Grehl S, Engelhard M, Wierlemann A, Kaelberlah HP, Erichsen P, Pottgen C, Groneberg M, Stuschke M. Long term in vivo effects of cisplatin on gamma-H2AX foci signaling in peripheral lymphocytes of tumor patients after irradiation. *Clin Cancer Res* 15 (2009): 2927-2934
83. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Nat Acad Sci USA* 95 (1998): 4635-4640
84. Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulations of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 64 (2000): 1775-1793
85. Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 301 (2002): 251-259
86. Scholz W. Experimentelle Untersuchungen über die Einwirkungen von Röntgenstrahlen auf das reife Gehirn. *Z Ges Neurol Psychiat* 150 (1934): 765
87. Schultheiss TE, Hanks GE. The radiation response of the human cervical spinal cord (Abstrakt). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45 (1999): 174-175
88. Schultheiss TE, Kun LE, Ang KK, Stephens LC. Radiation response of the central nervous system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31 (1995): 1093-1112
89. Schultheiss TE, Stephens LC, Maor MH. Analysis of histopathology of radiation myelopathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14 (1988): 27-32
90. Schweigerer L, Malerstein B, Gospodarowicz D. Tumor necrosis factor inhibits the proliferation of cultured capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 143 (1987): 997-1004
91. Sheline GF, Wara WM, Smith V. Therapeutic irradiation and brain injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6 (1980): 1215-1288
92. Shimada Y, Kaji K, Ito H. Heterogeneous response of human endothelial cells to tumor necrosis factor with respect to growth inhibition. *Artery* 18 (1991): 268-284

93. Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kämmer D, Riechers CC, Natt O, Sargin D, Watanabe T, Sperling S, Michaelis T, Price J, Meyer B, Frahm J, Ehrenreich H. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* 129 (2006): 480-489
94. Slungaard A, Vercelloti GM, Walker G. Tumor necrosis factor-alpha/cachectin stimulates eosinophil oxidant production and toxicity towards human endothelium. *J Exp Med* 171 (1990): 2025-2041
95. Takahashi A, Ohnishi T. Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett* 229 (2005): 171-179
96. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 263 (1992): F474-F481
97. Thomas AMK. *The Röntgen centenary: the invisible light: 100 years of medical radiology.* Oxford: Blackwell Science, 1959.
98. van der Kogel AJ. Late effects of radiation on the spinal cord. PHD thesis University of Amsterdam, 1979.
99. van der Kogel AJ. Mechanisms of late radiation injury in the spinal cord. In: *Radiation biology in cancer research. Proc 32nd Annual Symposium on Fundamental Cancer Research of M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute.* Meyn RE, Withers HR (Hrsg.), Raven Press, New York: 461-470, 1979.
100. van der Kogel AJ. The nervous system: radiobiology and experimental pathology. In: *"Radiopathology of organs and tissues"*, Scherer E, Streffer C, Trott KR (Hrsg.), Springer, Berlin-Heidelberg (1991): 191-213
101. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: (2001) 2922-2933
102. Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276 (2001): 47759-47762
103. West MH, Bonner WM. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19 (1980): 3238-3245
104. Wilson CM, Gaber MW, Sabek OM, Zawaski JA, Merchant TE. Radiation-induced astrogliosis and blood-brain barrier damage can be abrogated using anti-TNF treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74 (2009): 934-941
105. Wu Y, Mehew JW, Heckman CA. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20 (2001): 240-251
106. Zeman W. Radiosensitivities of nervous tissues. In: *"Fundamental aspects of radiosensitivity"*, Brookhaven Symp Biol 14 (1961): 176

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich beim Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle ist hier Dr. Nieder zu nennen, der mir dieses Thema ermöglicht hat, mich bei dem experimentellen Teil so hervorragend betreute und mir bei der schriftlichen Umsetzung mit seinen Korrekturen immer hilfreich zur Seite stand, auch über die lange räumliche Distanz nach Norwegen hinweg. Weiterhin danke ich Prof. Molls für die Übernahme der Betreuung in den letzten Zügen und der Unterstützung, die ich in seiner Klinik auf so vielen Ebenen erhielt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Nicolaus Andratscke bedanken, der immer ein offenes Ohr hatte und mir ein präsender und kompetenter Ansprechpartner und Betreuer war.

Mein Dank gilt auch den Tierpflegerinnen und Tierpflegern des Tierstalls, die die Tiere so verantwortungsvoll betreut haben.

Weiterhin möchte ich Prof. Schlegel und seinem Team, Guido Piontek und ganz besonders Ingrid Höpner danken, die mir bei der Umsetzung der Immunhistochemie so kompetent und immer hilfreich zur Seite standen.

Dr. Markus Pfirmann möchte ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Großer Dank gilt meinen Eltern, für die Eröffnung von Möglichkeiten und noch so vielem mehr, meiner Schwester Judith, für die moralische Unterstützung, meinen Großeltern, für eure Ansichten und Erfahrungen, sowie meiner Freundin Anja, die so verständnisvoll und geduldig war in der letzten Phase und mich motiviert hat das Ganze im Blick zu behalten. Von jedem steckt ein Teil in dieser Arbeit.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten: Tobias Karl Blau,

geb 10.12.1979 in Speyer, katholisch, ledig

Schulbildung: 1986 – 1991 Burgfeldschule Speyer (Grundschule)

1991 – 1993 Hans-Purmann Gymnasium Speyer

1993 – 2000 Nikolaus-von-Weis Gymnasium Speyer

2000 Abitur

Zivildienst: 4.10.2000 – 31.08.2001 im Kreiskrankenhaus München-Perlach

Hochschulstudium: Studium der Humanmedizin

2001 – 2003 Vorklinik an der Ludwig-Maximilians-Universität München

2003 Ärztliche Vorprüfung

2003 - 2006 klinischer Abschnitt an der Technische Universität München

2006 - 2007 Praktisches Jahr:

1. Tertial: Chirurgische Klinik und Poliklinik, rechts der Isar, TU-München

2. Tertial: Frauenklinik und Poliklinik, rechts der Isar, TU-München

3. Tertial: III. Medizinische Klinik, rechts der Isar, TU-München

2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Approbation als Arzt (7.12.2007)

Famulaturen: Kardiologie, Klinikum Augsburg, 2004

Strahlentherapie, Strahlentherapie der TU-München, 2004

Rechtsmedizin, Institut für Rechtsmedizin, München, 2005

Orthopädie, Praxis, Mering, 2006

Assistenzarzt: seit 01.04.2008, Abteilung für Neuropathologie, Uniklinik Köln