

Aus der Klinik für Kleintiere

der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und der

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen

Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

***Beeinflussung der chronischen Strahlenreaktion der Harnblase (Maus)  
durch intravesikale Applikation von Glykosaminoglykanen***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doctor medicinae veterinae (Dr. med. vet.)

durch die Veterinärmedizinische Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von

Doreen Krumdorf

aus Leipzig

Leipzig, 2002

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Dörr

Prof. Dr. Gerhard Oechtering

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Johann Kummermehr  
Institut für Strahlenbiologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Neuherberg, Oberschleissheim

Prof. Dr. Thomas Wiegel  
Carité – Campus Benjamin Franklin, Berlin

Prof. Dr. Gerhard Oechtering  
Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Wolfgang Dörr  
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen  
Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

Datum der Verteidigung: 07.10.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Inzidenz von Tumoren .....</b>	<b>6</b>
2.1.1	Tumorinzidenz beim Kleintier .....	6
2.1.2	Tumorinzidenz beim Menschen .....	7
<b>2.2</b>	<b>Aufbau und Funktion der Harnblase .....</b>	<b>8</b>
2.2.1	Anatomie und Histologie der Harnblase .....	8
2.2.2	Regulation der Blasenfunktion .....	9
<b>2.3</b>	<b>Radiogene Effekte an der Harnblase.....</b>	<b>10</b>
2.3.1	Nebenwirkungen nach Strahlentherapie beim Menschen .....	10
2.3.2	Tierexperimentelle Untersuchungen zu Strahlenfolgen an der Harnblase.....	14
2.3.2.1	Quantitative Erfassung der Blasenfunktion .....	14
2.3.2.1.1	Miktionsfrequenz.....	14
2.3.2.1.2	Zysto(tono)metrie .....	14
2.3.2.2	Strahlenreaktion der Harnblase: Funktion .....	17
2.3.2.2.1	Einzeitbestrahlung .....	17
2.3.2.2.2	Fraktionierte Bestrahlung .....	19
2.3.2.3	Strahlenreaktion der Harnblase: Histologie .....	20
2.3.2.3.1	Akutphase .....	20
2.3.2.3.2	Spätphase .....	21
<b>2.4</b>	<b>Pathogenese der Strahlenfolgen an der Harnblase .....</b>	<b>22</b>
2.4.1	Akutreaktion.....	22
2.4.2	Spätreaktion.....	25
<b>2.5</b>	<b>Verwendete Medikamente .....</b>	<b>25</b>
2.5.1	Heparin .....	25
2.5.1.1	Struktur und Metabolismus .....	25
2.5.1.2	Wirkungen .....	27

2.5.2	Pentosanpolysulfat .....	29
<b>3</b>	<b>TIERE, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Versuchsdurchführung.....</b>	<b>31</b>
3.2.1	Narkose.....	31
3.2.2	Bestrahlung.....	32
3.2.2.1	Bestrahlungsanlage .....	32
3.2.2.2	Dosimetrie .....	33
3.2.2.3	Bestrahlung.....	33
3.2.3	Zysto(tono)metrie.....	35
3.2.4	Medikamente und Applikation.....	36
3.2.4.1	Heparin .....	36
3.2.4.2	Pentosanpolysulfat (PPS).....	37
3.2.4.3	Applikation.....	37
<b>3.3</b>	<b>Experimente.....</b>	<b>37</b>
3.3.1	Scheinbestrahlung (Versuch S1).....	37
3.3.2	Alleinige Bestrahlung (Versuch K1).....	37
3.3.3	Placebogruppen (Versuch B1/01 und B1/02) .....	38
3.3.4	Alleinige Heparinbehandlung (Versuch H1) .....	38
3.3.5	Wirksamkeitsuntersuchungen in der akuten Phase (Versuch B1/1 – B1/3) .....	39
3.3.6	Behandlungsversuche in der akuten Phase (Versuch B2).....	40
3.3.7	Prophylaxeveruche in der akuten Phase (Versuch B3) .....	41
3.3.8	Applikation von Glykosaminoglykanen in der chronischen Phase (Versuch B4).....	42
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>43</b>
3.4.1	Mittelwertberechnung .....	43
3.4.2	T-test.....	43
3.4.3	Probit-Analyse und Vergleich von Dosis-Effekt-Kurven .....	44
<b>3.5</b>	<b>Histologische Untersuchungen.....</b>	<b>44</b>

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der Speicherfunktion der Harnblase</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Strahlenreaktion der Harnblase</b>	<b>46</b>
4.2.1	Zeitlicher Verlauf	47
4.2.2	Dosisabhängigkeit der Reaktion	50
4.2.3.	Zusammenhang zwischen den einzelnen Phasen der Strahlenreaktion	51
4.2.4	Nebenwirkungen und Gewichtsverlauf	52
<b>4.3</b>	<b>Placebogruppe</b>	<b>54</b>
<b>4.4</b>	<b>Behandlung unbestrahlter Tiere mit Heparin</b>	<b>56</b>
<b>4.5</b>	<b>Wirksamkeit der Glykosaminoglykanbehandlung in der akuten Phase</b>	<b>56</b>
4.5.1	Heparinbehandlung	56
4.5.1.1	Heparin 5000 U/ml	56
4.5.1.2	Heparin 3000 U/ml	59
4.5.2	Behandlung mit Pentosanpolysulfat (PPS)	61
4.5.3	Vergleiche zwischen Placebo-, Heparin- und PPS-behandelten Tieren	63
<b>4.6</b>	<b>Chronische Strahlenreaktion nach Behandlung der Strahlenreaktion in der akuten Phase II</b>	<b>64</b>
4.6.1	Wirksamkeit der Glykosaminoglykanbehandlung in der akuten Phase II	65
4.6.2	Dosis-Effekt-Beziehung für die akute Strahlenreaktion	66
4.6.3	Dosis-Effekt-Beziehung für die chronische Strahlenreaktion	67
<b>4.7</b>	<b>Prophylaktische Glykosaminoglykanbehandlung während der akuten Phase II</b>	<b>69</b>
<b>4.8</b>	<b>Behandlungsversuche in der chronischen Phase</b>	<b>71</b>
4.8.1	Glykosaminoglykaninstillation bei Reduktion des Blasenvolumens um 25 %	71
4.8.2	Behandlung bei einer chronischen Reduktion des Blasenvolumens um 50 %	73
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>76</b>

<b>5.2</b>	<b>Experimentelles Modell .....</b>	<b>77</b>
5.2.1	Zystometrie.....	77
5.2.2	Zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion .....	78
5.2.3	Dosisabhängigkeit .....	78
<b>5.3</b>	<b>Überlegungen zur Pathogenese der akuten Strahlenreaktion .....</b>	<b>79</b>
<b>5.4</b>	<b>Beeinflussung der Blasenfunktion durch die Eigenschaften der instillierten Lösung .....</b>	<b>81</b>
<b>5.5</b>	<b>Beeinflussung der akuten Strahlenreaktion .....</b>	<b>81</b>
5.5.1	Natriumchloridinstillation .....	81
5.5.2	Glykosaminoglykaninstillation .....	81
5.5.3	Schlussfolgerungen zur Pathogenese der akuten Strahlenreaktion der Harnblase	82
<b>5.6</b>	<b>Beeinflussung der chronischen Strahlenreaktion .....</b>	<b>83</b>
5.6.1	Beeinflussung der Spätreaktion durch Behandlung der manifesten akuten Reaktion in Phase II .....	83
5.6.2	Auswirkungen der prophylaktischen Behandlung in der AP II auf die SP.....	84
5.6.3	Behandlung der chronischen Strahlenreaktion.....	84
5.6.4	Pathogenese der Spätreaktion .....	85
<b>5.7</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>113</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP I	akute Phase I
AP II	akute Phase II
ASS	Acetylsalicylsäure
CI	Vertrauensbereich (confidence interval)
DMF	Dosismodifikationsfaktor
DEK	Dosis-Effekt-Kurve
ED <sub>50</sub>	50 % effektive Dosis - Dosis, bei der bei 50% der Tiere eine Verringerung der Blasen-speicherkapazität (hier um 50%) zu erwarten ist
ENCR	European Network of Cancer Registries
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
GAG	Glykosaminoglykane
<sup>3</sup> H-TdR	<sup>3</sup> H-markierte Thymidin-DesoxyRibose
IC	Interstitielle Zystitis
intermitt.	intermittierend
i.p.	intraperitoneal
LENT/SOMA	Late Effekte in Normal Tissues / subjektive Empfindungen, objektive Veränderungen, management, analytische Ergebnisse
makrosk.	makroskopisch
MHV	mouse hepatitis virus
MVM	minute virus of mice
p <sub>a</sub>	Irrtumswahrscheinlichkeit beim Vergleich der absoluten Blasenkapazitätsänderung
p <sub>r</sub>	Irrtumswahrscheinlichkeit beim Vergleich der relativen Blasenkapazitätsänderung
p <sub>r</sub> I, p <sub>r</sub> II, p <sub>r</sub> SP und p <sub>a</sub> I, p <sub>a</sub> II, p <sub>a</sub> SP	p <sub>a</sub> bzw. p <sub>r</sub> für AP I, AP II bzw. SP
p. irr.	post irradiation
persist.	persistierend
PG	Prostaglandin(e)
PPS	Pentosanpolysulfat
PVM	pneumo virus of mice
Reo 3	Reovirus type 3
RTOG	Radiation Therapy and Oncology Group
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error median)
Sendai	Sendai-Virus
SP	Spätphase
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TME	Theiler murine encephalomyelitis virus
V10	Blasenvolumen bei einem Druck von 10mm Hg

# 1 Einleitung und Zielstellung

Eine der häufigsten Todesursachen bei Hund und Katze sind tumoröse Erkrankungen (KESSLER et al. 1996).

Auch beim Menschen stellen Malignome einen großen Anteil aller Erkrankungen dar. Jährlich erkranken ca. 0,4 % aller Menschen in der Europäischen Union neu an einem Tumor. Die Tumorinzidenz wird 1995 mit ca. 50 %, die Mortalität mit ca. 22 % bei Frauen und ca. 25 % bei Männern angegeben (ENCR 1990).

Die am häufigsten eingesetzte Therapieform bei Tumoren ist die chirurgische Resektion. Allerdings ist sie als alleiniger Therapieansatz nur für gut abgegrenzte und noch nicht metastasierte Tumoren geeignet, die aufgrund der anatomischen Lokalisation der Operation gut zugänglich sind. Bei metastasierenden Tumoren und bei systemischen Erkrankungen (Leukämie) kann allein oder zusätzlich zur Operation die Chemotherapie eingesetzt werden. Dagegen ist bei infiltrativ wachsenden soliden Tumoren und bei Malignomen in anatomisch schwer zugänglicher Lage eine Strahlentherapie indiziert.

Zur Strahlentherapie werden Photonenstrahlen mit einer Energie von etwa 150 keV zur Oberflächen- und Halbtiefentherapie sowie von 400 keV - 50 MeV (meist 4 – 35 MeV) zur Tiefentherapie eingesetzt. Des Weiteren finden auch  $\beta$ -Strahlen (50 MeV) sowie in Ausnahmefällen beschleunigte Teilchen (Protonen, Neutronen) Anwendung (KESSLER 1999). Hinsichtlich der Bestrahlungstechnik unterscheidet man die Brachy- und die Teletherapie. Erstere ist eine Bestrahlung mit geschlossenen oder offenen Radionukliden, welche direkten Kontakt zum Tumorgewebe erhalten. Bei der Teletherapie erfolgt die Bestrahlung extern mit einem Abstand zwischen Strahlenquelle und Hautoberfläche (RÜBE und KRIMMEL 1992, SAUER 1996).

Trotz guter Eingrenzung des Bestrahlungsfeldes auf den Tumor werden im Rahmen einer Strahlentherapie stets gesunde Gewebe mitbestrahlt. Diese befinden sich im Eintritts- bzw. Austrittskanal des Strahls, im Sicherheitssaum um das Tumolvolumen oder innerhalb des Tumolvolumens selbst. Die Strahlenbelastung dieser gesunden Strukturen kann zu Nebenwirkungen führen. Aufgrund des zeitlichen Verlaufes lassen sich akute und chronische

Strahlenfolgen unterscheiden. Die Abgrenzung erfolgt willkürlich bei Tag 90 nach Beginn der Radiotherapie (DÖRR und TROTT 2000).

Chronisch reagierende Normalgewebe zeigen im Gegensatz zu akut reagierenden Normalgeweben und Tumoren einen ausgeprägten Fraktionierungseffekt, d. h. eine große Fähigkeit zur Erholung von so genannten subletalen Strahlenschäden. Deshalb ist zur Verminderung von Späteffekten eine Bestrahlung mit kleinen Dosen pro Fraktion günstiger als die Strahlenapplikation in Form einer Einzeldosis oder mit wenigen, großen Fraktionen (HERRMANN und BAUMANN 1997, DÖRR und TROTT 2000). So besteht in der Strahlentherapie beim Menschen ein konventionelles Behandlungsprotokoll aus 30 – 35 Fraktionen von 2 Gy über 6 – 7 Wochen.

Beim Tier setzt jede Bestrahlung eine Immobilisation mittels Narkose voraus, da sonst die exakte Eingrenzung des Bestrahlungsfeldes nicht möglich ist. Mit jeder Narkose steigt jedoch das Behandlungsrisiko. Daher wird in der Tiermedizin ein Mittelweg in der Anzahl an Fraktionen angestrebt. Es werden Gesamtdosen von 40 - 50 Gy appliziert, wobei diese auf bis zu 10 Fraktionen über einen Zeitraum von 3 - 4 Wochen verteilt werden (KASER-HOTZ et al. 1994). Die Strahlentherapie wird derzeit in der Veterinärmedizin als Behandlungsmodalität für Tiere in den USA und der Schweiz häufig angewandt. In Deutschland geschieht dies zunehmend häufiger. Bestrahlt werden derzeit Plattenepithelkarzinome (EVANS et al. 1988, GILETTE et al. 1995) und Epuliden (LANGHAM et al. 1977, THRALL 1984), aber auch Melanome (BATEMANN et al. 1994, BLACKWOOD et al. 1996) und Fibrosarkome (THRALL et al. 1981) an Pfote, Nase, Ohr und Maulhöhle.

Auch hypophysiäre Adenome und Adenokarzinome werden zunehmend radiotherapeutisch kontrolliert (DOW et al. 1990). Weitere strahlensensitive Tumoren sind das maligne Lymphom, das Plasmazytom, das Sticker Sarkom, perianale Tumoren sowie Tumoren der Speicheldrüse (KESSLER 1999).

Bei der Strahlentherapie im Beckenbereich, d. h. bei Tumoren der Zervix uteri (KESSLER 1997), Prostata (TURREL et al. 1987), dem Rectum (TURREL et al. 1986) und der Harnblase (COTARD et al. 1995) stellen Darm und Harnblase in Bezug auf Nebenwirkungen die wichtigsten Normalgewebe dar. Nebenwirkungen an der Harnblase sind Thema der vorliegenden Arbeit.

Die durch die Strahlentherapie hervorgerufenen Funktionsstörungen der Harnblase verlaufen in mehreren Phasen. Akute Veränderungen treten beim Menschen in den ersten 4 Wochen nach Bestrahlungsbeginn auf und sind in der Regel reversibel. Späte Veränderungen manifestieren sich nach Wochen bis Monaten und sind progressiv und irreversibel. Die Symptomatik der Strahlenreaktion in der akuten und späten Phase ist identisch. Die Patienten zeigen eine erhöhte Miktionshäufigkeit, auch nachts, Dysurie und Pollakisurie. Die wesentliche Grundlage dieser Symptomatik ist eine verminderte Blasenspeicherkapazität.

Typische akute Strahlenreaktionen, etwa von Haut und Schleimhäuten beruhen auf einer Zelldepletion infolge der strahlenbedingten Störung der Zellproduktion. Im Gegensatz dazu ist an der Blase während der akuten Reaktion jedoch kein Zellverlust erkennbar (DÖRR et al. 1992).

Hier müssen somit grundsätzlich andere pathogenetische Mechanismen zugrunde liegen. Zwei alternative Hypothesen werden diskutiert, die beide auf einer Veränderung im Prostaglandinstoffwechsel beruhen. Prostaglandine sind im Normalzustand ursächlich an der Regulation des Blasen-tonus beteiligt. So führen speziell Prostaglandine des E- und F-Types zu einer Kontraktion der Blasenmuskulatur (ANDERSON und SJOERGREN 1982). Eine erhöhte Prostaglandin-freisetzung oder ein verändertes Prostaglandinmuster in der Folge der Bestrahlung könnten somit zu einer Tonuserhöhung des M. detrusor führen, welche sich in einer Verminderung der Speicherkapazität niederschlagen würde. Zum einen besteht die Möglichkeit einer durch die Strahlung primär erhöhten Prostaglandinsynthese, zum anderen die einer primären Störung der urothelialen Barrierefunktion, die durch den Urothelkontakt mit Urin sekundär zu einer Erhöhung der Prostaglandinsynthese bzw. -freisetzung führen kann. Als Quelle für die Prostaglandine kommen sowohl das Urothel als auch die Gefäßendothelien der Blasenwand in Betracht. Die Beteiligung der Prostaglandine an der Strahlenreaktion der Harnblase wurde bereits indirekt über die Beeinflussung der akuten Symptomatik durch Prostaglandin-synthesehemmung nachgewiesen (DÖRR et al. 1998, EHME 1998, WIEGEL et al. 2000).

Eine erhöhte urotheliale Prostaglandinfreisetzung wurde auch nach einer Vielzahl mechanischer und chemischer Noxen beobachtet (GILMORE und VANE 1971). Für Endothelien sind Veränderungen der Prostaglandinfreisetzung nach Bestrahlung in verschiedenen Untersuchungen beschrieben worden (ELDOR et al. 1983, SINZINGER et al. 1986).

Ein wesentlicher Bestandteil der urothelialen Barriere sind Glykosaminoglykane, welche normalerweise die Oberfläche der Urothelzellen vollständig bedecken. Glykosaminoglykane sind stark negativ geladene Moleküle. Diese Ladung führt zur Anlagerung der bipolaren Wassermoleküle und damit zur Ausbildung einer monomolekularen Wasserschicht. Diese verhindert, dass der hyperosmolare Urin mit seinen zytotoxischen Bestandteilen in direkten Kontakt zum Urothel kommt. Die Folge einer Störung der Glykosaminoglykanschicht könnte eine sekundär erhöhte Prostaglandinsynthese sein, ohne dass zelluläre Schäden am Urothel manifest werden.

Chronische funktionelle Störungen an der Harnblase als Strahlenfolge treten zeitlich deutlich vor fibrotischen Veränderungen, d. h. erhöhter Kollagendisposition und veränderter Kollagenzusammensetzung, auf. Letztere müssen als Sekundärfolge der Funktionsstörung, nicht als primär strahleninduziert angesehen werden. Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Urotheldefekte (fokale Urothelverluste sowie fokales papillomatöses Urothelwachstum) an der Spätreaktion beteiligt sind (KRAFT 1996). Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Funktionsminderung und der veränderten Urothelfläche nachgewiesen werden. Auch diese Urothelveränderungen können möglicherweise mit einer Störung der Glykosaminoglykanschicht einhergehen (DÖRR et al. 1998, WIEGEL et al. 2000).

Neuere Analysen von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) ergaben, dass zwischen der Reaktion in der akuten Phase und dem Risiko einer späten Strahlenreaktion ein Zusammenhang im Sinne einer konsekutiven Spätfolge besteht.

Als Hypothese für die vorliegende Arbeit wurde angenommen, dass sowohl die akuten als auch die (frühen) chronischen Strahlenfolgen an der Harnblase durch eine Störung der Glykosaminoglykanschicht ausgelöst oder beeinflusst werden. Als Tiermodell wurde die Harnblase der Maus verwendet. In diesem Modell kann die Speicherkapazität – analog zum Menschen – gut im zeitlichen Verlauf durch transurethrale Zystometrie erfasst werden (DÖRR und SCHULTZ-HECTOR 1992, DÖRR 1995, DÖRR et al. 1998).

Das Ziel der Arbeit bestand somit darin, zu ermitteln,

- 1.) ob die lokale Applikation von GAG (Heparin bzw. PPS) zu einer Modifikation der Strahleneffekte führt;

- 2.) inwieweit durch diese lokale Applikation der GAG eine Modifikation der Strahleneffekte erreicht werden kann;
- 3.) ob eine Beeinflussung der Blasenfunktion in der akuten Phase und in der Spätphase möglich ist und
- 4.) ob eine mögliche Beeinflussung der Akutreaktion zu einer Modifikation der Spätphase führt.

## 2 Literatur

### 2.1 Inzidenz von Tumoren

#### 2.1.1 Tumorinzidenz beim Kleintier

Tumoren sind eine der häufigsten Todesursachen beim Kleintier (DORN 1976, KESSLER et al. 1996).

Beim Hund sind ca. 0,5 % aller malignen Erkrankungen **Blasentumoren** (OSBORNE et al. 1968, STRATFUSS und DEAN 1975). Diese Tumoren, welche meist bösartig sind, liegen in der Regel am Blasen Hals oder am Trigonum (TEUNISSEN 1976, NICKEL 1999). Rund 60 % aller bösartigen Blasentumoren sind epithelialer Herkunft; am häufigsten ist das Übergangszellkarzinom, gefolgt von Plattenepithel- und Adenokarzinom (OSBORNE et al. 1968, BURNIE et al. 1983) sowie undifferenzierte Karzinome. Sarkome machen weniger als 10% der Harnblasentumoren aus. Es sind überwiegend Fibrosarkome, Leiomyosarkome und maligne Hämangioepitheliome zu finden (KESSLER 1997). Bei der Katze werden auch maligne Lymphome beschrieben (SCHWARZE et al. 1985). Bei jungen Hunden werden auch Rhabdomyosarkome gefunden (KELLY 1973, STENGEL et al. 1997).

Katzen haben im allgemeinen selten Tumoren der Blase. Wenn an der Blase Tumoren auftreten, dann sind diese ebenfalls meist epithelialen Ursprungs (HORZINEK 1997).

Tumoren der **Prostata** (meist Adenokarzinome) treten gehäuft bei Hunden über 8 Jahren auf (FREUDIGER et al. 1997). Ihre Inzidenz ist schwer abzuschätzen, da nach BELL (1988) mindestens 1/5 aller Fälle klinisch nicht diagnostiziert werden. BARSANTI et al. (1987) schätzen sie auf ca. 0,2 - 0,6% aller Tumoren.

Im **Uterus** des Hundes sind Tumoren selten und meist gutartig. Leiomyome machen einen Anteil von 85-90% aus, während ca. 10% Leiomyosarkome darstellen; sehr selten sind Adenokarzinome zu finden (WITHROW et al. 1986). Vaginale Tumoren treten bevorzugt bei nicht kastrierten, älteren Hündinnen auf und sind zu 73% gutartig (THACHER et al. 1983). An der Vagina der Katze werden vereinzelt Fibrome, Leiomyome und Lipome (STEIN et al. 1981, WOLKE 1963), am Uterus häufiger Adenokarzinome beobachtet (STEIN et al. 1982).

Von den *intestinalen Tumoren* sind beim Hund 40%, bei der Katze zwischen 10 und 15 % im Colon und Rectum anzutreffen (KESSLER 1999). Beim Hund gibt es gehäuft Berichte über kolorektale Polypen und kolorektale Adenokarzinome sowie über Lymphome (KESSLER 1999). Bei der Katze sind im Rektum vermehrt Adenokarzinome und maligne Lymphome, aber auch Mastzelltumoren zu finden (KESSLER 1999).

## **2.1.2 Tumorinzidenz beim Menschen**

Nach einer Auswertung der ENCR (European Network of Cancer Registries) erkrankten 1990 706.900 (0,42 %) <sup>1</sup> Männer und 644.200 (0,36 %) <sup>1</sup> Frauen an Tumoren (exklusive aller nichtmelanotischen Hauttumoren). Im gleichen Zeitraum starben 497.500 (0,30 %) <sup>1</sup> Männer und 398.200 (0,22 %) <sup>1</sup> Frauen an den Folgen einer Tumorerkrankung (ENCR 1990).

Betrachtet man die Häufigkeit der befallenen Organe im Beckenbereich, so erscheint beim Mann der Dickdarm mit 13 % an zweiter, die Prostata mit 12 % an dritter und die Blase mit 7 % an vierter Stelle. Bei der Frau steht der Dickdarm mit 15 % ebenfalls an zweiter Stelle, die Gebärmutter mit 5 % an vierter Stelle (ENCR 1990).

Die jährliche Anzahl bzw. Rate an Neuerkrankungen in Deutschland (ENCR 1990) beträgt für Tumoren der Harnblase 12 104 ( $\cong 3,5/100\ 000$  Personen), für Tumoren des Rektums 53 225 ( $\cong 15,5/100\ 000$  Personen), für Tumoren der Prostata 21 075 ( $\cong 12,6/100\ 000$  Personen), für Tumoren der Zervix uteri 7 053 ( $\cong 4,0/100\ 000$  Personen) und für Tumoren des Korpus uteri 8 242 ( $\cong 4,7/100\ 000$  Personen).

---

<sup>1</sup> Die Zahl in Klammer gibt die Erkrankungshäufigkeit bezogen auf die männliche bzw. weibliche Gesamtbevölkerung in Europa an.

## **2.2 Aufbau und Funktion der Harnblase**

### **2.2.1 Anatomie und Histologie der Harnblase**

Die Harnblase liegt ventral vom Rektum und kranial des Os pubis. Sie ist bei der Maus in geleertem Zustand stecknadelkopfgroß. Die Blase ist mit drei Bändern verankert: Die paarigen Ligg. vesicale latt. ziehen vom Beckenrand lateral an die Harnblase, das Lig. vesicale medianum vom Nabel zur ventralen Blasenwand.

Die Harnblasenwand besteht aus drei Schichten (siehe Abb.1). Außen wird sie von der Tunica serosa (je nach topographischer Lage auch von der Adventitia) bedeckt. Ihr anliegend folgt die Muskularis, die je nach Tierart eine unterschiedliche Anzahl von Muskellagen beinhaltet. Die einzelnen Muskellagen sind quer zueinander angeordnet und greifen ineinander über. Einzelne dieser Muskelzüge bilden am Blasen Hals den Leiosphinkter, im Gegensatz zu dem von der Harnröhrenmuskulatur gebildeten Rhabdosphinkter. Die Tunica submucosa ist stark ausgeprägt. Zusammen mit der nach innen folgenden Lamina propria, die aus scherengitterartig angeordnetem, elastischem Bindegewebe besteht, bildet sie die Verschiebeschicht für die innerste Schicht, das Epithel der Tunica mucosa.

Dieses Epithel besitzt im gedehnten Zustand 2 – 3, bei Kontraktion der Blase bis zu 14 übereinander geschichtete Zellschichten. Die superfizielle Zellschicht besitzt ein dreischichtiges Plasmalemm, welches subplasmalemmal durch Filamentbündel (Crustae) verstärkt wird (LIEBICH 1993).

Die Innenauskleidung der Harnblase besteht aus Glykosaminoglykanen (PARSONS et al. 1980, LILLY und PARSONS 1990). Am Aufbau der Glykosaminoglykanschicht sind u.a. Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat (gebunden an Proteine oder ionisiert) beteiligt (HURST et al. 1987, HURST 1994). Diese verhindern einerseits die Anhaftung von Bakterien (PARSONS et al. 1980, PARSONS 1980, 1982) zum anderen auch die Anhaftung und Penetration von Ionen und Proteinen (PARSONS 1986, 1994).

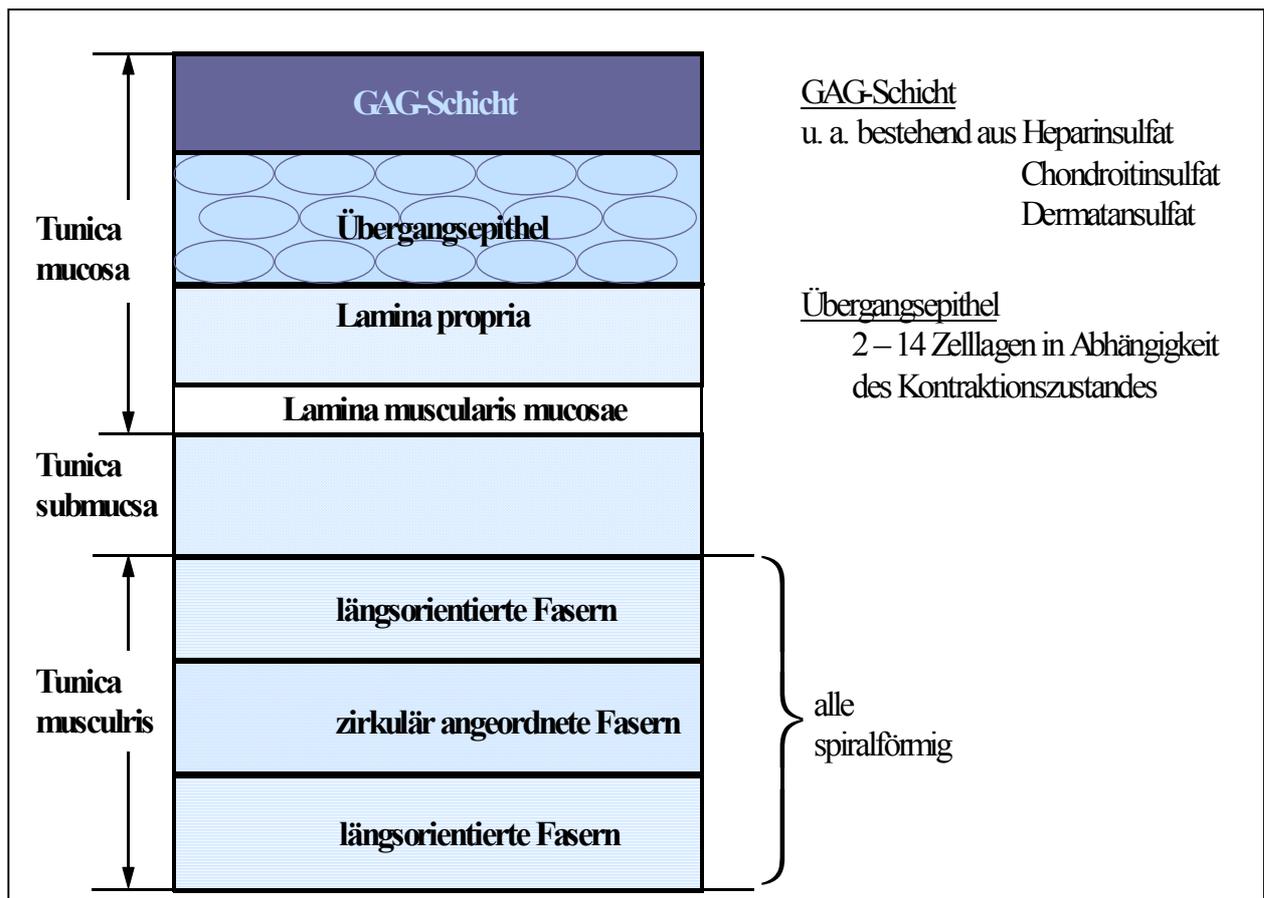


Abbildung 1: Aufbau der Harnblasenwand

### 2.2.2 Regulation der Blasenfunktion

Die Innervation der Harnblasenmuskulatur geht von intramuralen Ganglien des vegetativen Plexus aus. Die Schleimhaut ist zusätzlich sensibel innerviert. Neben der neuronalen Komponente sind an der Regulation der Detrusorfunktion viele Mediatoren, u. a. auch Prostaglandine, beteiligt. Letztere wirken über spezielle Rezeptoren (ANDERSON und SJOERGEN 1982).

GILMORE und VANE (1971) fanden bei Hunden nach Dehnung der Harnblase im Blut vermehrt Prostaglandine und Katecholamine. Dies gilt speziell für PGE 2 und PGF (POGGESI et al. 1980, ANDERSON und SJOERGEN 1982). Diese haben einen kontrahierenden Effekt auf die Blasenmuskulatur.

## **2.3 Radiogene Effekte an der Harnblase**

### **2.3.1 Nebenwirkungen nach Strahlentherapie beim Menschen**

Die Strahlentherapie im Beckenbereich schließt regelmäßig normale Gewebe ein. Hierbei ist neben dem Darm die Harnblase von Bedeutung. Die Toleranz dieser Organe bestimmt die maximale Dosis für den Tumor und somit die Heilungsaussichten.

RIES und LUDWIG (1968) teilten die Nebenwirkungen nach Bestrahlung der Harnblase in objektive und subjektive Symptome ein. Blutspuren in der Wäsche, wiederholter blutiger Urin, Druckdolenz bei Betasten der Blasengegend sowie Stenosen der harnableitenden Wege gelten als objektiv. Brennender Schmerz bei Miktion (Dysurie), häufiger Harndrang und Wasserlassen in kleinen Portionen (Pollakisurie), schneidender Schmerz mit Harndrang jedoch ohne Miktion (Tenesmen) und dumpfer Dauerdruckschmerz in der Blasengegend werden als subjektive Symptome erfasst.

Endoskopisch beobachteten RIES und LUDWIG (1968) nach Bestrahlung akut eine diffuse hämorrhagische Zystitis mit Nekrose der Schleimhaut und Fibrin-Schorf-Bildung über dem Schleimhautdefekt. Die chronischen Veränderungen, welche sich mehrere Wochen, Monate oder Jahre nach der Bestrahlung manifestierten, wurden als bullöses Ödem der Blasen-schleimhaut sowie als Rigidität oder Verdickung der Blasenwand mit Querfaltenbildung beschrieben. Weiterhin wurden chronisch entzündliche Infiltrationen der submukösen und muskulären Wandschichten, Veränderungen der Schleimhautgefäße, die sich subchronisch als „Himbeerwärtchen“ (Kapillarektasien mit perivasalem Ödem) und chronisch in Form von Teleangieektasien mit evtl. punktförmigen submukösen Blutaustritten äußerten, beschrieben. Als weitere Spätfolge war eine Blasenschrumpfung infolge Sklerose der Blasenwand, häufig im Zusammenhang mit einer Detrusorinsuffizienz, zu finden.

Zur Diagnose der „radiogenen Zystitis“ führten KÜMPER und PENNIG (1970) Zysto- und Urethroskopien sowie Zystometrien durch. Die Befunde der Zysto- und Urethroskopie reflektierten nicht die Funktionsstörungen. Als zystometrischer Befund zeigte sich ein Hypertonus der Blasenwand mit verringerter Blasenspeicherkapazität und vermindertem Miktionsdruck. Unter der Strahlentherapie verringerte sich die Blasenkapazität um ca. 20 %, der Miktionsdruck sank gegen Ende der Bestrahlung deutlich ab. Die Funktionswerte normalisierten

sich bei 80 % aller Patienten bis zur erneuten Kontrolle nach 3 Monaten. Einige Patienten erreichten die Normalwerte erst nach einem Jahr. Aufgrund der kurzen Nachbeobachtungszeit von 1 Jahr wurde die chronische Strahlenreaktion nicht in ihrer Gesamtheit erfasst.

In neueren Untersuchungen (HANFMANN et al. 1998, DÖRR und HERRMANN 2000) konnte die akute Reduktion des Miktionsvolumens bei Patienten unter Bestrahlung von Prostatatumoren gezeigt werden: ab der 4. Bestrahlungswoche zeigte sich eine Abnahme auf 60 – 70% der individuellen Ausgangswerte vor Bestrahlung.

BEHR et al. (1990) untersuchten Spätschäden nach Bestrahlung des Kollumkarzinoms. Sie stellten fest, dass nach zwei Jahren alle Patienten inkontinent waren, wobei 60 % der Inkontinenzen blasenbedingt, 40 % urethrabedingt waren. Bei zystometrischen Untersuchungen fand sich bei allen Patienten ein erhöhter Tonus in Verbindung mit einer verminderten Blasenspeicherkapazität.

Eine einheitliche und möglichst genaue Beschreibung der Nebenwirkungen in der Strahlentherapie ist von wesentlicher Bedeutung. Das Bewertungsschema von EORTC/RTOG (European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Radiation Therapy and Oncology Group) teilt Strahlenreaktionen in 6 Schweregrade ein:

Grad 0: keine Veränderung

Grad 1: geringe Symptome, keine Behandlung erforderlich

Grad 2: "mäßige" und "deutliche" Symptome, sprechen auf einfache Behandlungsmethoden an, Lebensqualität nicht beeinträchtigt

Grad 3: "starke" oder "ausgeprägte" Symptome, wirken sich auf die Lebensqualität deutlich aus

Grad 4: alle lebensbedrohlichen Symptome, erfordern i. d. R. umfangreiche therapeutische Maßnahmen

Grad 5: Tod infolge der Strahlenreaktion

Die entsprechende Symptomatik an der Harnblase ist in Tabelle 1 für akute und in Tabelle 2 für chronische Veränderungen zusammengefasst (SEEGENSCHMIEDT 1998).

Tabelle 1: Akute Strahlenreaktion an der Harnblase: RTOG/EORTC-Systematik  
(nach SEEGENSCHMIEDT 1998)

Grad	0	1	2	3	4
Symptome	-	Polyurie	Polyurie (< 1 x / h)  Dysurie Krämpfe	Polyurie (> 1 x / h)  Dysurie Krämpfe Narkotika	Hämaturie (Transfusion)  Ulzeration / Nekrose

Tabelle 2: Chronische Strahlenreaktion an der Harnblase: RTOG/EORTC- Systematik  
(nach SEEGENSCHMIEDT 1998)

Grad	0	1	2	3	4
Symptome	-	Mikro- hämaturie	Polyurie > 6 x / d oder < 1 x / h  intermittierende Hämaturie  generalisierte Teleangiektasien	schwere Polyurie >1 x / h  häufige Hämaturie  Blasenkapazität < 100 – 150 ml generalisierte Teleangiektasien	Nekrose  Hämorrhagien (Zystektomie nötig)  Blasen- kontraktur Kapazität < 100 ml

Für späte Strahlenfolgen wurde ein weiteres Dokumentationsschema in Form der LENT/SOMA-Klassifizierung (**L**ate **E**ffects in **N**ormal **T**issues) entwickelt (RUBIN et al. 1995). Die Erfassung und Dokumentation erfolgt in Form von **s**ubjektiven Empfindungen der Patienten (z. B. Schmerz), **o**bjektiven Veränderungen (Miktionsvolumen), Behandlung (= **m**anagement) und weitergehenden **a**nalytischen Ergebnissen (weitergehende Labor- und Blutuntersuchungen). Durch die Verknüpfung der Einzelergebnisse kann eine Gesamtbewertung der Strahleneffekte erfolgen. Für die Harnblase ist die Einteilung in Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: LENT/SOMA-Bewertungssystem für späte Strahlenfolgen an der Harnblase  
(nach SEEGENSCHMIEDT 1998)

Grad	1	2	3	4
<i>Subjektiv</i>				
Dysurie	gelegentlich	intermittierend	persistierend	therapieresistent
Frequenz (Miktionshäufigkeit)	Intervall: 3-4 h	Intervall: 2-3 h	Intervall: 1-2 h	stündlich
Hämaturie	gelegentlich	intermittierend	persistierend	therapieresistent
Inkontinenz	< wöchentlich	< täglich	≤ zweimal /d	therapieresistent
Harnfluss	evtl. schwach	intermittierend	evtl. Obstruktion	Obstruktion
<i>Objektiv</i>				
Hämaturie	mikroskopisch	intermitt. makrosk.	persist. makrosk.	hartnäckig
Endoskopie	evtl. Atrophie o. Teleangiectasie ohne Blutung	konfluierende / Atrophie o. Teleangiectasie mit Blutung	Ulzerationen in Muskulatur	Perforation Fisteln
Max. Volumen	> 300-400 cm <sup>3</sup>	> 200-300 cm <sup>3</sup>	> 100-200 cm <sup>3</sup>	< 100 cm <sup>3</sup>
Residualvolumen	< 25 cm <sup>3</sup>	> 25-100 cm <sup>3</sup>	> 100 cm <sup>3</sup>	> 100 cm <sup>3</sup>
<i>Management</i>				
Dysurie	ohne Narkose	ohne Narkose	Narkose	chirurg. Intervention
Frequenz	Alkalisierung	Spasmolytika	Narkose	Zystektomie
Hämaturie/ Tele- angiectasie	Eisentherapie	evtl. Transfusionen o. Kauterisation	Transfusion o. Koagulation	chirurg. Intervention
Inkontinenz	evtl. Schutz	intermittierender Schutz	Schutz o. Katheterisieren	Dauerkatheter
Harnfluss		weniger als einmal am Tag katheterisieren	Dilatation, mehr als einmal am Tag katheterisieren	Dauerkatheter chirurg. Intervention
<i>Analyse</i>				
Zystographie		Bewertung der Schleimhautoberfläche		
Volumetrische Analyse		Bewertung der Blasenkapazität in ml		
Kontrastradiographie		Bewertung von Ulzerationen, Kapazität und Kontraktilität		
Ultraschall		Bewertung der Wanddicke, des Hohlraumes u. der Fistelbildung		
Elektromyographie		Bewertung der Sphinkteraktivität		

In allen Bewertungssystemen stehen Polyurie und Veränderungen im Miktionsvolumen als Ausdruck der Funktionsstörung im Mittelpunkt. Die chronisch auftretenden Hämaturien sind bedingt durch die Fragilität der teleangiektatisch veränderten Gefäße. Häufig gesehene bakterielle Infektionen sind als Folge einer Barrierestörung anzusehen (WIEGEL et al. 2000).

## **2.3.2 Tierexperimentelle Untersuchungen zu Strahlenfolgen an der Harnblase**

### **2.3.2.1 Quantitative Erfassung der Blasenfunktion**

Strahlenbedingte Veränderungen der Blasenfunktion betreffen im Wesentlichen die Speicherkapazität. Die Erfassung kann grundsätzlich über die Miktionsfrequenz, das Miktionsvolumen oder durch Ermittlung der Blasendruck-Blasenvolumen-Relation erfolgen. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über experimentelle Ansätze zur quantitativen Ermittlung der Strahlenreaktion gegeben werden.

#### **2.3.2.1.1 Miktionsfrequenz**

STEWART et al. (1978) entwickelten ein System zur Erfassung von Miktionsfrequenz und Miktionsvolumen bei der Maus. Die Tiere wurden einzeln in einem Käfig mit Drahtboden gehalten, unter welchem saugfähiges Papier mit einer Geschwindigkeit von 15 cm/h durchgezogen wurde. Ausgewertet wurde nach spezifischer Anfärbung die Anzahl und die Größe der Urintropfen. Über eine Kalibrierkurve konnte so eine Aussage über das Miktionsvolumen und die Miktionsfrequenz und deren Veränderungen im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung getroffen werden. Der Miktionsindex gibt die Anzahl der Miktionen pro Stunde an. Durch Messung über jeweils 24 Stunden wurden auch die tageszeitlichen Schwankungen der Blasenfunktion berücksichtigt.

Während des späten Morgens und am frühen Nachmittag war die Miktionsfrequenz am niedrigsten und das Blasenvolumen am größten. Dagegen waren zwischen 0 und 3 Uhr die Miktionsfrequenz am höchsten und das Blasenvolumen am kleinsten.

#### **2.3.2.1.2 Zysto(tono)metrie**

Die Zystotonometrie besteht in der Erfassung des Blaseninnendruckes während der internen Füllung, d. h. der Druck-Volumen-Beziehung. Man unterscheidet eine invasive, chirurgische und eine minimal invasive, transurethrale Methode. Bei der *invasiven Zystotonometrie*, die u. a. bei Katzen durchgeführt wurde (MAGGI et al. 1986), wird ein Katheter in die Harnblasenwand implantiert. Eine Beeinflussung der Blasenfunktion durch den Eingriff und den Katheter kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zudem besteht die Gefahr einer bakteriellen Zystitis. Langfristige longitudinale Untersuchungen sind mit dieser Methode nicht möglich.

Bei der *transurethralen Zystotonometrie* erfolgt durch einen über die Urethra in die Harnblase eingeführten Katheter die Füllung unter standardisierten Bedingungen bei gleichzeitiger Erfassung des Druckes. Diese Methode dient zur Messung der Blasenfunktion beim Menschen. Beim Versuchstier ist eine Narkose zur Ruhigstellung unumgänglich. Tierexperimentell wurde die Zystometrie für strahlenbiologische Untersuchungen erstmals von KINSELLA et al. (1988) am Hund eingesetzt. Auch beim Kanichen (KOHLENER et al. 1992) und der Ratte (VALE et al. 1993) fand diese Methode Anwendung.

LUNDBECK et al. (1989 a, 1989 b) adaptierten die Methode zur Anwendung bei der Maus. Diese Untersuchungen sind auf Grund der anatomischen Gegebenheiten nur bei weiblichen Tieren möglich. Den narkotisierten Mäusen wurde die Blase über einen Katheter entleert und anschließend mittels Infusionspumpe über einen neuen Katheter mit isotonischer Natriumchloridlösung gefüllt. Zur Erfassung des Blasendrucks diente ein Druckwandler, welcher die Daten an einen Schreiber zur Dokumentation weitergab. Die Instillation erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/min. Die Messung wurde beendet, sobald Natriumchloridlösung neben dem Katheter aus der Harnröhre austrat.

DÖRR (1992) modifizierte dieses Modell. Die Anzahl der Messungen zur Ermittlung des individuellen Kontrollwertes wurde auf mindestens drei erhöht, um der natürlichen Variation der Messergebnisse Rechnung zu tragen. Die Messung wurde bei einem Blasendruck von max. 30 mm Hg beendet, um die Blasenwand nicht artifiziell zu überdehnen. Durch einen zusätzlichen Ablauf konnte die Infusionspumpe in Betrieb bleiben, so dass Schwankungen in der Pumpleistung nach dem Einschalten vermieden wurden. Als Blasenkapazität wurde das Volumen bei 10 mm Hg dokumentiert (DÖRR und SCHULTZ-HECTOR 1992, DÖRR 1995).

Mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der Zystometrie wurden von DÖRR (1992) untersucht. *Katheterdurchmesser* von 0,6 - 0,8 mm haben keinen Einfluss auf das Ergebnis,

dickere Katheter führen jedoch zu größeren Maximalvolumina vor dem Flüssigkeitsaustritt. Bei *Instillationsraten* kleiner als 0,1 ml/min tritt Flüssigkeit unerkannt in die Urethra über, was zu scheinbar erhöhten Volumina führt. Einen besonders großen Einfluss auf das Harnblasenvolumen hat die *Tageszeit*, zu der die Zystometrie ausgeführt wird. Zwischen 1 und 13 Uhr treten nur minimale Schwankungen auf. Ab 13 Uhr steigt das Blasenvolumen deutlich an und erreicht um 19 Uhr ein Maximum von bis zu 180 % gegenüber den Werten zwischen 1 Uhr und 13 Uhr.

Der *Alterseinfluss* ist gering: zwischen 75 Tagen und 344 Tagen treten keine Veränderungen der Speicherkapazität auf (DÖRR und KRAFT 1997, Dörr 1992). Ab einem *Gewicht* von 18 g ändert sich das Speichervolumen ebenfalls nicht mehr, während bei kleineren Tieren geringere Werte gemessen wurden (DÖRR 1992). Die *Körpertemperatur*, die infolge der Anästhesie stark absinken kann, hat keinen Einfluss auf die Harnblasenfunktion (DÖRR 1992). Auch der *Sexualzyklus* beeinflusst die Speicherfunktion der Harnblase nicht (DÖRR 1992).

Veränderungen des *Blasenvolumens* (Entleeren und Füllen) vor der zystometrischen Messung führen zu großen Fluktuationen der Speicherkapazität (DÖRR 1992). Eine Entleerung der Blase führt nach 1,5 h bis 3,5 h zu einer Reduzierung des Volumens um bis zu 40 %. Dagegen führt eine Füllung in einem Zeitraum von 40 min bis 2 h vor der Messung zu erhöhten Werten ( $\leq 145\%$ ), falls die Tiere in Narkose bleiben und so die Blase nicht durch Miktion entleert wird. Der Einfluss der *Narkose* auf die Messergebnisse ist unklar. Bei Untersuchungen am Menschen fanden DOYLE und BRISCOE (1976), dass Halothan und Opioide zu einem erhöhten Detrusordruck führen. Andere Anästhetika (z. B. Thiopental) bewirken eine Abnahme des Volumens. MORIKAWA et al. (1989) stellten fest, dass bei Ratten und Hunden eine Reihe von Anästhetika, u. a. Thiopental, zu einer Erhöhung des Detrusordruckes führen. Als Mechanismus nahmen sie eine Beeinflussung der sakralen oder zentralen Nervenleitung bzw. der Mechanorezeptoren an. Zur Narkose mit Pentobarbital, welche für die vorliegende Arbeit verwendet wurde, liegen keine Daten vor. Ein möglicher Einfluss sollte sich jedoch gleichsinnig auf die Kontrollwerte vor Bestrahlung wie auch auf die Verlaufswerte auswirken und somit die Ergebnisse (zur relativen Veränderung der Blasenfunktion) nicht beeinflussen.

Den Einfluss von *Ionen, Osmolarität und pH-Wert der Instillationsflüssigkeit* auf die Ergebnisse der Zystometrie untersuchten HOHLBRUGGER und LENTSCH (1985). Eine erhöhte  $K^+$ -Konzentration, Hyperosmolarität bzw. ein pH-Wert von 5 verringern die Blasenspeicher-

kapazität, während Hypoosmolarität, elektrolytfreie Medien und pH 8 zu einer Erhöhung führen. Instillierte Medikamente können demnach unabhängig vom Wirkstoff durch Veränderung von Kaliumionen-Konzentration oder pH-Wert zu einer Modifikation der Blasen-speicherkapazität führen.

### **2.3.2.2 Strahlenreaktion der Harnblase: Funktion**

#### **2.3.2.2.1 Einzeitbestrahlung**

STEWART et al. (1978) untersuchten die funktionellen Strahlenfolgen an der Harnblase der Maus anhand des Miktionsindex (siehe 2.2.2.1). Nach Einzeitbestrahlung mit 10 - 40 Gy erfolgten die Messungen der Miktionsfrequenz ab dem 1. Monat monatlich bis zum 18. Monat. Nach 18 Monaten wurde zusätzlich eine postmortale Zystometrie durch Instillation von Luft durchgeführt, gefolgt von einer histologischen Untersuchung der Blase (STEWART et al. 1978). Da die ersten Messungen erst einen Monat post radiationem erfolgten, konnte in diesen Untersuchungen eine akute Blasenreaktion nicht beobachtet werden.

Einen Monat nach Bestrahlung war die Miktionsfrequenz gegenüber dem Ausgangswert unverändert. Zwischen dem 5. und 8. Monat erhöhte sich die Frequenz nach Dosen größer als 25 Gy. Zwischen dem 9. und 16. Monat zeigten auch mit 15 Gy bestrahlte Tiere eine deutliche Erhöhung des Miktionsindex. Niedrigere Dosen zeigten keine Wirkung. Den ED<sub>50</sub> –Wert, d. h. diejenige Dosis, bei der eine Reaktion bei der Hälfte der Tiere zu erwarten ist, ermittelten sie für die Spätphase mit ca. 25 Gy. Postmortal konnte 18 Monate nach Bestrahlung eine deutliche Verringerung der Blasenkapazität gegenüber gleichaltrigen, unbestrahlten Kontrolltieren sowie histologisch eine starke Fibrose nachgewiesen werden.

KINSELLA et al. (1988) führten bei erwachsenen Hunden eine intraoperative Bestrahlung der Blase (Trigonum vesicae, Collum vesicae, Ureteren, Urethra) mit Elektronen in einer Dosis von 20, 25, 30, 35 und 40 Gy durch. Sie nahmen Zystometrien ab einem Monat nach Bestrahlung jedes halbe Jahr vor. Außerdem entnahmen sie histologische Proben. In der akuten Phase fanden keine Untersuchungen statt. Bis zu einem Zeitraum von 4 Jahren konnte keine Blasenfunktionseinschränkung gemessen werden. Die fehlende Reaktion ist auf die Bestrahlung nur eines Teilvolumens der Blase zurückzuführen. Histologisch fanden sie Verringerungen der Schleimhautdicke, Teleangiektasien und eine submukosale Fibrose in dosisabhängigem Ausmaß.

Ab 20 Gy führte die Fibrose der Lam. propria und eine chronische Entzündung im Eintrittsbereich der Uretheren in die Blase zu Stenosen und damit zu Hydronephrosen ein Jahr post radiationem.

Zystometrische Untersuchungen an der Ratte wurden von VALE et al. (1993) etabliert. Die Tiere wurden nach Bestrahlung über eine Zeitspanne von zwei Monaten wöchentlich, in der darauffolgenden Zeit aller 3 Wochen zystometriert. Bei Tieren, die in Einzeitbestrahlung eine Dosis >15 Gy erhalten hatten, wurde eine biphasische Reduktion der Blasenspeicherkapazität festgestellt. Die erste Phase war zwischen 4 und 6 Wochen, die zweite ab 10 - 12 Wochen nach Bestrahlung nachzuweisen. Die Anzahl der Reagenten war dabei dosisabhängig. Für eine späte Reaktion war eine Schwellendosis von 10 Gy nötig.

LUNDBECK et al. (1989) untersuchten an Mäusen den Verlauf der Strahlenreaktion für die akute und chronische Strahlenreaktion der Harnblase. Hierzu bestrahlten sie das kaudale Abdomen der Mäuse mit einer Einzeldosis von 20 Gy. Einmalig vor Bestrahlung, sechsmal über einen Zeitraum von 30 Tagen und anschließend aller 14 Tage bestimmten sie das Blasen-volumen mittels Zystometrie. Innerhalb der ersten 28 Tage trat eine akute, reversible Blasenreaktion, ab dem 160. Tag die irreversible späte Blasenreaktion, definiert als Verminderung der Speicherkapazität um mindestens 50 %, ein. Nach dem 300. Tag konnten sie keine weiteren Veränderungen in der Speicherkapazität erkennen.

Ähnliche Untersuchungen mit modifizierter Technik (DÖRR 1992) wurden von DÖRR und SCHULTZ-HECTOR (1992) und DÖRR (1995) an der Maus durchgeführt. Nach dreimaliger Vormessung wurden die Mäuse mit 13, 16, 18, 20 oder 23 Gy auf das kaudale Abdomen bestrahlt. Während der ersten 30 Tage wurde aller 3 bis 5 Tage zystometriert. Ab dem 4. Tag nach Bestrahlung traten die ersten Reagenten auf. Die kleinste Speicherkapazität fand sich in allen Dosisgruppen zwischen Tag 6 und 15. Die meisten Mäuse zeigten zwischen Tag 20 und 30 wieder eine normale Speicherkapazität. Im einzelnen Tier dauerte die akute Strahlenreaktion zwischen 3 und 9 Tage. Die ED<sub>50</sub> ermittelten sie für die akute Phase mit 18,3 Gy. In späteren Versuchen ermittelte DÖRR (1995) im selben Tiermodell eine ED<sub>50</sub> von 18,2 Gy für die akute Phase.

In weitergehenden Analysen (DÖRR und BECK-BORNHOLDT 1999) konnte ein zweiphasiger Verlauf der akuten Reaktion nachgewiesen werden. Die akute Phase I, die sich von Tag 1 bis Tag 15 p. irr. erstreckt, hat ihren Höhepunkt (Anzahl der meisten neuen Reagenten) um Tag 7.

Die akute Phase II dauert von Tag 16 bis 30. Ihr Höhepunkt liegt bei Tag 23. Allerdings sind beide Wellen nicht strikt voneinander zu trennen, Überschneidungen kommen vor. Die ED<sub>50</sub> der akuten Phase I beträgt in dieser Analyse  $21,7 \pm 4,9$  Gy, die der akuten Phase II  $19,3 \pm 3,9$  Gy. Die ED<sub>50</sub> der chronischen Phase betrug  $18,5 \pm 3,4$  Gy (DÖRR und BECK-BORNHOLDT 1999).

Für die chronische Phase konnten DÖRR und BENTZEN (1999) eine signifikante, nichtlineare Abhängigkeit der Latenzzeit von der Dosis nachweisen. Bei einer Bestrahlungsdosis im Bereich der ED<sub>50</sub> traten chronische Funktionsstörungen um den Tag 135 auf.

Es wurde sowohl von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) als auch von DÖRR und BENTZEN (1999) ein positiver Zusammenhang zwischen der Reaktionshäufigkeit in der I. und der II. akuten Phase sowie zwischen der II. akuten Phase und der späten Phase nachgewiesen. Das Risiko einer positiven Reaktion in der akuten Phase II steigt bei positiver Reaktion in Phase I, ebenso das Risiko für Spätfolgen bei positiver Reaktion in der akuten Phase II.

#### **2.3.2.2.2 Fraktionierte Bestrahlung**

Der Fraktionierungseffekt beschreibt den Anstieg isoeffektiver Dosen bei Aufteilung der Gesamtdosis auf steigende Fraktionszahlen (DÖRR und TROTT 2000). Als quantitatives Maß dient der sogenannte  $\alpha/\beta$ -Wert (THAMES et al. 1984, THAMES und HENDRY 1987). Ein hoher  $\alpha/\beta$ -Wert spiegelt einen niedrigen Fraktionierungseffekt wider. Allgemein haben Akutreaktionen einen  $\alpha/\beta$ -Wert  $> 6$  Gy, chronische Strahlenfolgen von 1 – 5 Gy (DÖRR und TROTT 2000).

STEWART et al. (1984) untersuchten nach fraktionierter Bestrahlung (1 – 20 Fraktionen) mit Dosen pro Fraktion von 2,5 – 10 Gy, appliziert über einen Zeitraum von 1 bis 2 Wochen, die Spätreaktion der Harnblase bei der Maus. Sie fanden 10 – 14 Monate nach Bestrahlung eine erhöhte Miktionsfrequenz (s. 2.2.3.1.1) und eine dosisabhängige Reduktion der zystometrisch bestimmten BlasenSpeicherkapazität. Es wurde ein nur geringer Fraktionierungseffekt gefunden. Der mit Hilfe des linear-quadratischen Modells ermittelte  $\alpha/\beta$ -Quotient lag zwischen 5 und 10 Gy.

KOHLER et al. (1992) bestrahlten 50 % des Blasenvolumens (kranial oder kaudal) oder die gesamte Blase bei Kaninchen mit Gesamtdosen von 33, 36 und 39 Gy, täglich fraktioniert über

5 Tage. Die Erfassung der Blasenfunktion erfolgte longitudinal über Miktionsfrequenz und Miktionsvolumen in Stoffwechsellkäfigen. Tiere mit Ganzblasenbestrahlung (36, 39 Gy) reagierten mit erhöhter Miktionsfrequenz während der gesamten Beobachtungszeit von 100 Wochen gegenüber scheinbestrahlten Tieren. Tiere mit 50 % bestrahltem Blasenvolumen reagierten erst ab 36 Gy (Bestrahlung kaudal) bzw. ab 39 Gy (kranial) mit einer leichten Erhöhung der Miktionsfrequenz ca. 20 Wochen nach Bestrahlung. Da in diesen Untersuchungen zum Volumeneffekt nur ein Fraktionierungsprotokoll verwendet wurde, sind Aussagen zum Fraktionierungs-Effekt nicht zu treffen.

Ein ausführliches Fraktionierungsexperiment (LUNDBECK et al. 1989a, 1989b) beinhaltet die Bestrahlung von Mäusen mit Einzeldosen von 5 bis 30 Gy oder fraktionierten Dosen (16 bis 60 Gy Gesamtdosis in 2 - 10 Fraktionen) über einen Zeitraum von 4 - 4,5 Tagen. Eine positive Blasenreaktion war definiert als Verringerung des Blasenvolumens um 50 % im Vergleich zum Median aller Tiere. Die Daten für die Spätphase wurden von BENTZEN et al. (1992) analysiert. Mit steigender Fraktionszahl stieg für die chronische Reaktion der ED<sub>50</sub>-Wert von 15 Gy (1 Fraktion) auf 28 Gy (10 Fraktionen). Dies entspricht einem  $\alpha/\beta$ -Quotienten von 5,8 Gy (95 % Vertrauensbereich 3,6 - 8,8 Gy).

DÖRR und SCHULZ-HECTOR (1992) bestrahlten das kaudale Abdomen der Mäuse nach dreimaliger Zystometrie mit 1, 2, 3, 5 oder 10 gleichgroßen Fraktionen und in den Fraktionierungsarmen mit steigenden Gesamtdosen. Für die Akutreaktion der Harnblase wurde der  $\alpha/\beta$ -Quotient mit 13,9 Gy (95 % Vertrauensbereich 8,4 - 24,6 Gy) ermittelt.

DÖRR und BENTZEN (1999) analysierten die Ergebnisse aus diesem Fraktionierungsexperiment für die Spätphase. Es ergab sich ein  $\alpha/\beta$ -Quotient von 4,4 Gy (95 % Vertrauensbereich 2,0 - 8,4 Gy).

### **2.3.2.3 Strahlenreaktion der Harnblase: Histologie**

#### **2.3.2.3.1 Akutphase**

ANTONAKOPOULOS et al. (1982) fanden bei Ratten nach einer einmaligen Bestrahlung mit 20 Gy in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass bei der akuten Strahlen-

reaktion sowohl die Muskularis als auch die Lam. propria verdickt und ödematös waren. Urotheliale Veränderungen sind für die Akutphase nicht beschrieben.

FÜLLER et al. (1986) charakterisierten die Frühreaktion beim Kaninchen eine Woche nach der letzten Bestrahlung mit Einzeldosen von 5 - 20 Gy bzw. nach der letzten Bestrahlung in einer fraktionierten Serie mit 30 – 75 Gy in Fraktionen zu 1,5 – 20 Gy. Sie fanden ebenfalls Ödeme und eine hyperämische Reaktionen der Submukosa und Muskularis. Im Urothel waren Kernpolymorphie und Vakuolisierung zu beobachten, Veränderungen der Zellzahlen sind nicht beschrieben.

DÖRR et al. (1998) konnten während der akuten Phase nach Einzelbestrahlung von Mäuseharnblasen mit 20 Gy ebenfalls keine Zelldepletion nachweisen. In weitergehenden Untersuchungen wurden Expressionsänderungen von Uroplakin, einem Strukturmolekül, welches Bestandteil der Barriere ist, und von CK 18, einem Differenzierungsmarker (ECKHARDT et al. 1997), sowie für CD 44, einem Zellkommunikationsmolekül (NOACK und DÖRR 1999), aufgezeigt. Dies weist auf eine strahleninduzierte Störung der Zellfunktion hin, die an der akuten Reaktion beteiligt sein kann (WIEGEL et al. 2000, DÖRR et al. 1998).

### **2.3.2.3.2 Spätphase**

ANTONAKOPOULOS et al. (1982) fanden ab 6 Monate nach Bestrahlung von Rattenharnblasen erste *Urothel*veränderungen in der Spätphase, welche aus fokalen Hyperplasien der Basal-zellschicht, später der Intermediärzellen, bestanden. Nach 20 Monaten wiesen 59 % aller Tiere ein Übergangszellkarzinom auf. In der *Muskulatur* traten nach einer Latenzzeit von wenigen Monaten fokale Muskelzelldegenerationen bis hin zur Muskelnekrose auf (ANTONAKOPOULOS et al. 1982). An *Blutgefäßen* waren sowohl im Endothel als auch an den glatten Muskelfasern Veränderungen zu erkennen. Monate nach Bestrahlung wurde zudem eine Fibrose der Harnblasenwand gefunden.

FÜLLER et al. (1986) beschrieben bei Kaninchen 3 bis 6 Monate nach der Bestrahlung (Dosen siehe 2.3.2.3.1) einen erhöhten Bindegewebsanteil in der Submukosa, in der Gefäßwand und zwischen den Muskelbündeln. Auch konnten sie eine gesteigerte Anzahl von eitrig-fibrinösen Entzündungen bei schwer gestörtem Urothel feststellen.

STEWART et al. (1980) untersuchten die Proliferationskinetik des Urothels in der Spätphase der Strahlenreaktion nach 25 Gy (Einzeldosis). Zur Markierung DNA-synthetisierender Zellen im Urothel und Endothel wurde radioaktiv markierte Thyminin-Desoxiribose ( $^3\text{H-TdR}$ ) zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung jeweils über 10 Tage in 8-Stunden-Abständen i. p. verabreicht. In der Folge wurden die Mäuse zur histologischen und autoradiographischen Untersuchung der Blasen getötet. Bereits drei Monate nach Bestrahlung konnte ein Anstieg der Proliferationsaktivität im Urothel bei bestrahlten im Vergleich zu unbestrahlten Tieren festgestellt werden. Zwischen sechs Monaten und 22 Monaten war die Umsatzzeit im Urothel von ca. 1 Jahr auf 1 Monat verkürzt. Im Gegensatz zu diesen spät einsetzenden Veränderungen nach Bestrahlung nimmt die Proliferation von Urothelzellen nach mechanischer (chirurgischer Einschnitt) und chemischer Zerstörung (Cyclophosphamid) innerhalb von Tagen zu (STEWART 1986). Morphologisch waren ab sechs Monaten keine spezialisierten Oberflächenzellen mehr nachzuweisen. Diese wurden auch trotz einer Hyperplasie in der Intermediärschicht nicht ersetzt.

Bei der Maus fanden KRAFT et al. (1996) ab dem 180. Tag nach Bestrahlung (19 bzw. 25 Gy Einzeldosis) einen relativen Anstieg des Muskelvolumens. Die Expression des Wachstumsfaktors (TGF- $\beta$ ), gemessen durch densitometrische Bestimmung der immunhistochemischen Farbreaktion, stieg zwischen Tag 180 und 360 progressiv an. Weiterhin fanden sie ab Tag 180 eine Zunahme des Verhältnisses von Kollagen Typ I zu Typ III. Diese Veränderungen korrelierten jedoch beim Einzeltier nicht mit den chronischen Störungen der Speicherfunktion.

Im Gegensatz dazu konnten Veränderungen am Urothel, wie fokale Urothelverluste und fokales papillomatöses Urothelwachstum, in der Spätphase beobachtet werden, deren Ausmaß beim Einzeltier gut mit den Veränderungen der Speicherkapazität übereinstimmte (KRAFT 1996, KRAFT et al. 1996). Ein Zusammenhang dieser urothelialen Veränderungen mit den Funktionsstörungen kann somit angenommen werden, während dies für die anderen Veränderungen (Muskelmasse, Kollagen, TGF- $\beta$ ) nicht der Fall zu sein scheint.

## **2.4 Pathogenese der Strahlenfolgen an der Harnblase**

### **2.4.1 Akutreaktion**

Die Pathogenese der akuten Strahlenreaktion der Harnblase ist derzeit nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass eine Zelledepletion als Ursache für die akute Strahlenreaktion nicht in Frage

kommt (DÖRR et al. 1998, ANTONAKOPOULOS et al. 1982, FÜLLER et al. 1986, WIEGEL et al. 2000).

Prostaglandine (PG) sind physiologisch an der Steuerung des Blasentonus beteiligt (siehe 2.2.2). Eine Veränderung im Ausmaß der PG-Freisetzung oder im PG-Muster kann zu einer Erhöhung des Detrusor-Grundtonus und damit zu einer Verminderung der Speicherkapazität führen. Nach Bestrahlung konnte eine erhöhte PG-Freisetzung (PGI<sub>2</sub>) aus Gefäßendothelien (ELDOR et al. 1983) sowie eine erhöhte PG-Ausscheidung im Harn (SCHNEIDKRAUT et al. 1984) nachgewiesen werden. Ob diese Prostaglandinveränderungen nach Bestrahlung primär strahlenbedingt sind und wo deren Quelle liegt (Uro- bzw. Endothel), ist nicht geklärt (WIEGEL et al. 2000).

Eine Beeinflussung der akuten Strahlenreaktion in beiden akuten Reaktionswellen ist durch Hemmung der PG-Synthese mittels Acetylsalicylsäure (lokal und systemisch) möglich (DÖRR et al. 1997, 1998, EHME 1998). Dies ist ein indirekter Nachweis für die Beteiligung der PG an der Pathogenese der akuten Funktionsstörungen.

Möglich wäre neben primär strahleninduzierten Effekten auch eine sekundär erhöhte PG-Synthese und Freisetzung infolge einer primären Störung der Barrierefunktion des Urothels. Dabei kann die die Urotheloberfläche bedeckende Glykosaminoglykanschicht als Zielstruktur eine Rolle spielen (siehe 2.2.1). Ein Hinweis darauf ergibt sich aus Untersuchungen, bei denen eine Zerstörung der Glykosaminoglykane durch lokale Applikation von Protaminsulfat beim Menschen zu Symptomen führte, die sowohl der akuten Strahlenreaktion als auch der sogenannten Interstitiellen Zystitis (IC) glichen. Die Interstitielle Zystitis ist eine Blasenkrankung mit erhöhter Miktionsfrequenz (inklusive Nocturie), Schmerz, Pollakisurie und Dysurie bei sterilem Harn (PARSONS et al. 1983), deren Ursache bislang nicht vollständig geklärt ist (HOLM-BENTZEN und LOSE 1987). Da akute Strahlenreaktionen und IC eine identische Symptomatik zeigen, können möglicherweise ähnliche Pathomechanismen zugrunde liegen.

Durch lokale Gabe von Heparin oder Pentosanpolysulfat (PPS) nach der Zerstörung der Glykosaminoglykanschicht mittels Protamin (PARSONS 1979, 1986, 1988, PARSONS et al. 1994) konnte eine Verminderung der Symptome erzielt werden. Diese beruht auf einer Anlagerung der exogenen Glykosaminoglykane ans Urothel und damit einer Restauration der Glykosaminoglykanschicht.

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung der urothelialen Barriere an der akuten Strahlenreaktion ergibt sich aus der Tatsache, dass Patienten mit Interstitieller Zystitis eine niedrigere Harnstoffkonzentration im Urin aufweisen als gesunde Probanden (PARSONS und HURST 1990). Dies beruht vermutlich auf einer stärkeren Resorption von Harnstoff in der Harnblase (PARSONS et al. 1991), was ebenfalls durch eine Barrierefunktionsstörung bedingt sein kann.

Die Barrierefunktion kann indirekt durch Instillation von KCl-Lösung (0,4 M) getestet werden. Die Applikation führt bei bestrahlten Patienten in 100 %, bei IC-Patienten bis 70 %, bei gesunden Probanden aber nur in 4,5 % der Fälle zu erhöhter Miktionsfrequenz, Pollakisurie und Dysurie (PARSONS et al. 1994, PARSONS 1996, HOHLBRUGGER 1996). Diese Symptomatik ist wahrscheinlich begründet durch die vermehrte Penetration von  $K^+$ -Ionen durch die gestörte Barriere und eine nachfolgende Depolarisation der Nervenzellen (HOHLBRUGGER 1996, PARSONS et al. 1998).

PARSONS (1986) gelang es, bei 5 bestrahlten Patienten langfristig durch dreimalige orale Gabe von 100 mg PPS pro Tag den Harndrang zu verringern und die Blutungen zu kontrollieren. Auch bei Patienten mit IC hatte die Behandlung mit PPS eine positive Wirkung (PARSONS et al. 1983, 1993, PARSONS 1994, HOLM-BENTZEN et al. 1997, BARRINGTON und STEPHENSON 1997).

Diese Ergebnisse wurden in weiteren Studien für die IC bestätigt (MULHOLLANDET al. 1990, HWANG et al. 1997, JEPSEN 1998, FRITJOFFSON et al. 1987). Auch die lokale und systemische Applikation von Heparin wurde erfolgreich zur symptomatischen Therapie der IC angewandt (LOSE et al. 1985, PARSONS et al. 1994, 1997).

Ein direkter Nachweis der Barriestörung durch Bestrahlung steht noch aus. Bisher gelang es nicht, die Störung der Glykosaminoglykanschicht bei der Maus histologisch oder elektronenmikroskopisch darzustellen (ECKHARDT et al. 1997), was auf die geringe Ausdehnung dieser Schicht und ggf. nur fokale Veränderungen zurückzuführen sein mag.

Methoden zur Darstellung von Barriestörungen an der Harnblase am größeren Versuchstier (Kaninchen) bestehen in der Penetration von Trypanblaulösung (LEVIN et al. 1990) oder Indigocarmin (MONSON et al. 1991). Derartige Untersuchungen an der Blase der Maus (ECKHARDT et al. 1997) zeigten keine erhöhten Farbstoffkonzentrationen (Indigocarmin) im Gewebe nach Bestrahlung. Dies ist wahrscheinlich ebenfalls auf die geringe Masse der

Blasenwand bzw. des Urothels bei der Maus und damit auf die mangelnde Sensibilität des Tests zurückzuführen.

## 2.4.2 Spätreaktion

Daten zur Pathogenese der Blasenfunktionsstörung in der Spätphase sind in der Literatur bisher kaum zu finden. Untersuchungen von KRAFT (1996) sprechen dafür, dass urotheliale Veränderungen auch in diesem Stadium für die Funktionseinschränkung verantwortlich sind. Das Ausmaß von fokalen Urothelverlusten und fokalen papillomatösem Urothelwachstum korreliert mit der Funktionsstörung.

## 2.5 Verwendete Medikamente

Ausgehend von der Hypothese, dass die Barriestörung die mögliche Grundlage der Funktionsstörung der Harnblase nach Bestrahlung darstellt, sollte in der vorliegenden Arbeit durch Zufuhr exogener Glykosaminoglykane versucht werden, die Barriere zu restaurieren und somit in ihrer Funktion zu erhalten.

### 2.5.1 Heparin

#### 2.5.1.1 Struktur und Metabolismus

Heparin gehört zur Gruppe der Heteroglykane. Diese stellen eine Polysaccharidkette aus Disacchariduntereinheiten dar, wovon ein Teil dieser Untereinheiten ein Aminozucker ist (Tab. 4). Heparin, Heparansulfat, Keratansulfat, Chondroitinsulfat und Hyaluronat sind die wichtigsten Vertreter. Diese Moleküle haben aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Carboxylat- und Sulfatgruppen (an mindestens einem Disaccharid) eine starke bis weniger starke negative Ladung (STRYER 1996).

Tabelle 4: Glukos- und Galaktosaminoglykane im Vergleich

	Aminozucker / Säuren	Anzahl der $-OSO_3$ und $COO-$ Gruppen pro Disaccharid
Heparin	Glukosamin / Uronsäure (D-Glukuronsäure oder L-Iduronsäure)	****

Heparansulfat	Glukosamin / Uronsäure (weniger L-Iduronsäure als bei Heparin)	***
Chondroitinsulfat	Galaktosamin / Glukuronsäure	**
Hyaluronat	Glukosamin / Glukuronsäure	*

Heparin (s. Abb. 2) besteht aus Glukosamin und Uronsäure und ist die stärkste organische Säure im Organismus. Es stellt ein Gemisch aus unterschiedlich langen Polysaccharidketten dar, so dass keine einheitliche Dissoziationskonstante ( $p_{ka}$ ) angegeben werden kann (WELLHÖRNER 1990). Durch Fraktionierung kann nieder- und hochmolekulares Heparin getrennt werden (molare Masse  $\leq 6$  kDa bzw. molare Masse  $\leq 30$  kDa). Beide unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität.

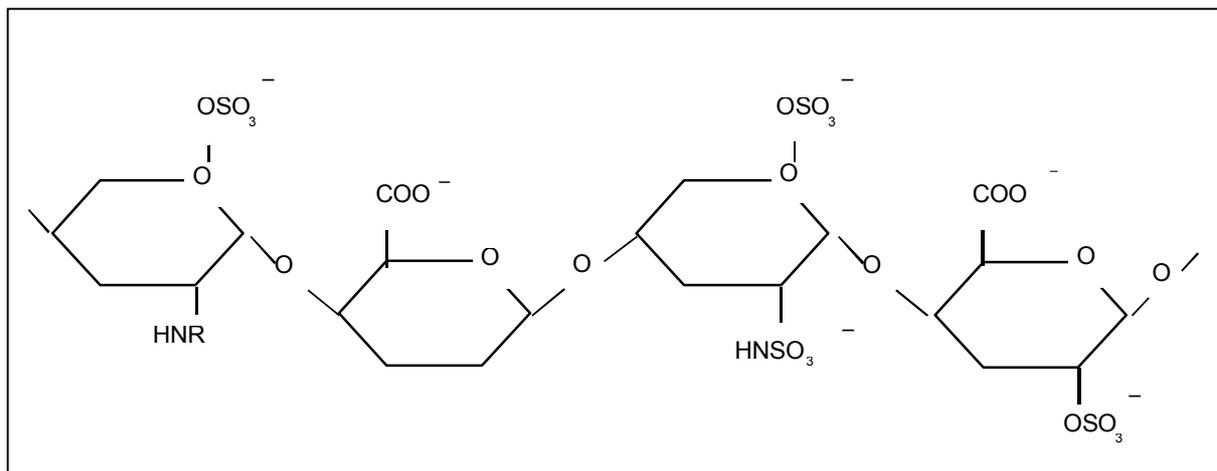


Abbildung 2: Strukturformel des Aminozucker/Säure-Gerüsts von Heparin (nach STRYER 1996)

An die Proteinbindungstelle (HN-R) (KJELLEN und LINDAHL 1991) kann ein Protein mit Serin als endständige Aminosäure gebunden werden (LINDAHL et al. 1994) und sich somit ein Proteoglykan bilden. So bedingt beispielsweise die Bindung von Antithrombin die antikoagulatorische Wirkung des Heparins. Eine Glukosamin-3-O-Sulfatgruppe in dem antithrombinbindenden Pentasaccharid führt die schwach bindende (low affinity) Form des Heparins in eine stark bindende (high affinity) Form über (LINDAHL 1997). Die Anzahl und Lokalisation der Sulfatgruppen reguliert somit die Aktivität des Moleküls (WELLHÖNER 1990).

Heparin hat mit 95 % eine hohe Proteinbindung (RIETHROCK et al. 1994). Es hat ein Verteilungsvolumen von 0,04 - 0,05 l/kg (WELLHÖRNER 1990). Aus der Blutbahn wird es

sehr rasch eliminiert, die biologische Halbwertszeit beträgt 1 Stunde (FORTH et al. 1993). Es wird im retikuloendothelialen System desulfatiert (RIETHROCK et al. 1994), in der Leber über die Heparinase abgebaut und renal eliminiert. Bei direkter renaler Ausscheidung wird ein Großteil reabsorbiert (FORTH et al. 1993), so dass nur bei sehr hohen Dosen Heparin unverändert im Harn ausgeschieden wird (FÜLGRAFF und PALM 1992).

### 2.5.1.2 Wirkungen

Im Säugetierorganismus wird Heparin von Mastzellen produziert und in Granula gespeichert. Bei Bedarf, z. B. im anaphylaktischen Schock oder bei Entzündungsreaktionen, kommt es zur Degranulation und Heparinfreisetzung (LINDAHL 1997).

Die Primärwirkung von Heparin besteht im Rahmen der Blutgerinnung (siehe Abb. 3) in einer Verstärkung der Wirkung von  $\alpha_2$ -Globulin, welches den Faktor Xa inaktiviert. Desweiteren bindet Heparin an Antithrombin III, wodurch Plasmin, IIa, IXa, Xa, XIa und XIIa inaktiviert werden (WELLHÖRNER 1990).

Tabelle 5: Faktoren der Blutgerinnung

Faktor	Bezeichnung	Faktor	Bezeichnung
I	Fibrinogen	VIII	Antihämophiles Globulin
II	Prothrombin	IX	Christmas-Faktor
III	Gewebsthromboplastin	X	Stuart-Prower-Faktor
IV	Ca <sup>2+</sup> -Ionen	XI	Plasmathromboplasmin-Vorstufe
V	Akzeleratorglobulin	XII	Hageman-Faktor
VII	Proconvertin	XIII	Fibrinstabilisierender Faktor

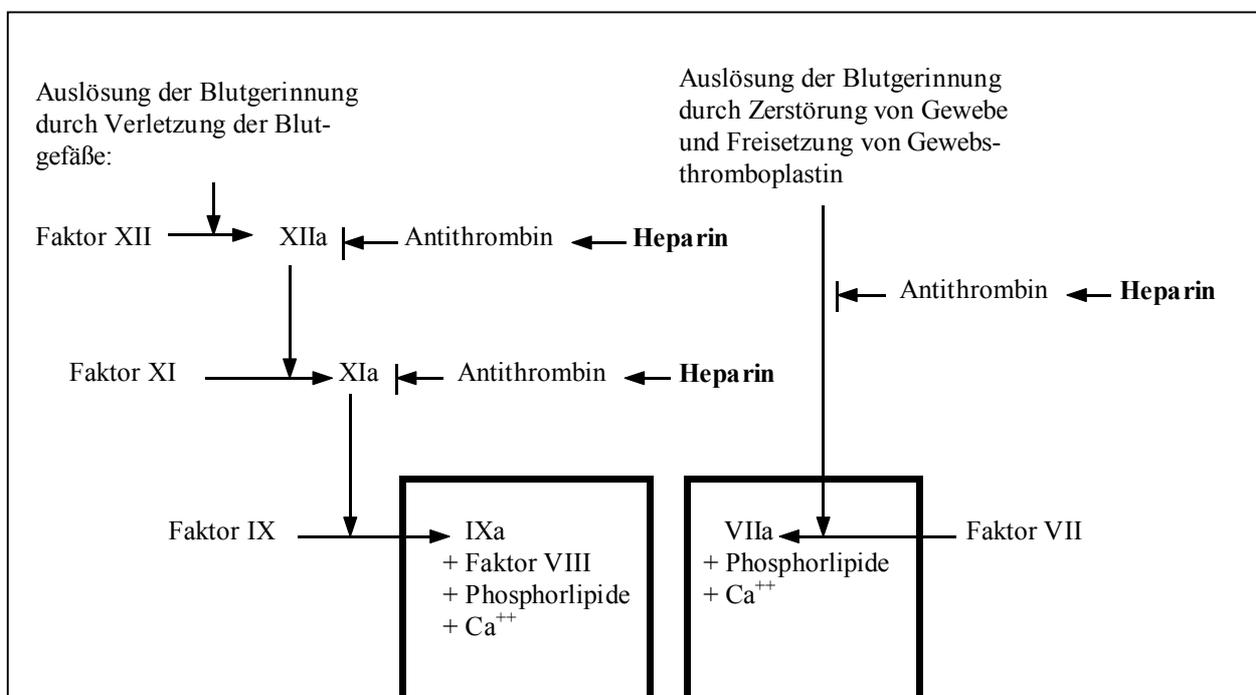


Abbildung 3: Blutgerinnung und deren Beeinflussung durch Heparin nach KOLB und SCHENK (1990)

Heparin verstärkt die Wirkung von  $\alpha_2$ -Globulin und bewirkt über Bindung an Antithrombin die Inaktivierung verschiedener Blutgerinnungsfaktoren. Weitere Wirkungen von Heparin bestehen darin, dass Fibrinogen nicht zu Fibrinmonomeren umgebaut wird, dass weniger Fibrinpolymere entstehen können, dass die Aktivität des Faktors V gesenkt und die Thrombozytenkoagulation verhindert wird (WELFHÖRNER 1990). Nieder- und hochmolekulares Heparin sind unterschiedlich effektiv. Niedermolekulares Heparin wirkt bevorzugt auf die Inaktivierung des Faktors Xa und die Freisetzung von Plasminogenaktivator (Initierung der Fibrinolyse). Unfraktioniertes (vermeehrt hochmolekulares) Heparin bindet vermehrt Antithrombin und hindert die Thrombozytenaggregation.

Therapeutisch wird Heparin zur Prophylaxe von thrombotischen Erkrankungen, bei venösen und arteriellen Thromboembolien sowie als Antikoagulanz bei Behandlungen und Operationen mit extrakorporalem Kreislauf (Herz-Lungen-Maschine, Hämodialyse) eingesetzt.

Zur vollständigen Antikoagulation werden dem Menschen 5000 U als Bolus i. v. und weitere 20000 bis 30000 U als Dauertropfinfusion verabreicht. Zur Thromboseprophylaxe werden 5000 U alle 12 Stunden s. c. gegeben. Dosierungen beim Kleintier richten sich derzeit nach den Empfehlungen beim Menschen.

Eine andere für diese Arbeit relevante Funktion von Heparin besteht in der *antiadhärenten Aktivität*, welche die Anheftung von Bakterien (PARSONS et al. 1980, LERSCH et al. 1996) sowie die Anlagerung von Ionen (PARSONS et al. 1990, 1991) an der Urotheloberfläche verhindert.

## 2.5.2 Pentosanpolysulfat

Pentosanpolysulfat (PPS) ist ein Heparinoid, das nicht natürlich im Organismus vorkommt (FORTH et al. 1993). Es besteht aus Pentosen, hat Carboxyl- und O-Sulfatgruppen. Im Unterschied zum Heparin befinden sich diese jedoch am zweiten (C<sub>2</sub>) und nicht am dritten (C<sub>3</sub>) der C-Atome (Abb. 4). Pentosanpolysulfat hat 3 - 4 Sulfatgruppen pro Disaccharid. Es ist somit ein stark negativ geladenes Molekül. Im Gegensatz zu Heparin besitzt es keine Aminogruppe (keine Proteinbindung) und keine Aminosulfatgruppe. Somit ist es eigentlich kein Glykosaminoglykan, wird aber der Einfachheit halber im Folgenden als Mitglied dieser Gruppe angesprochen.

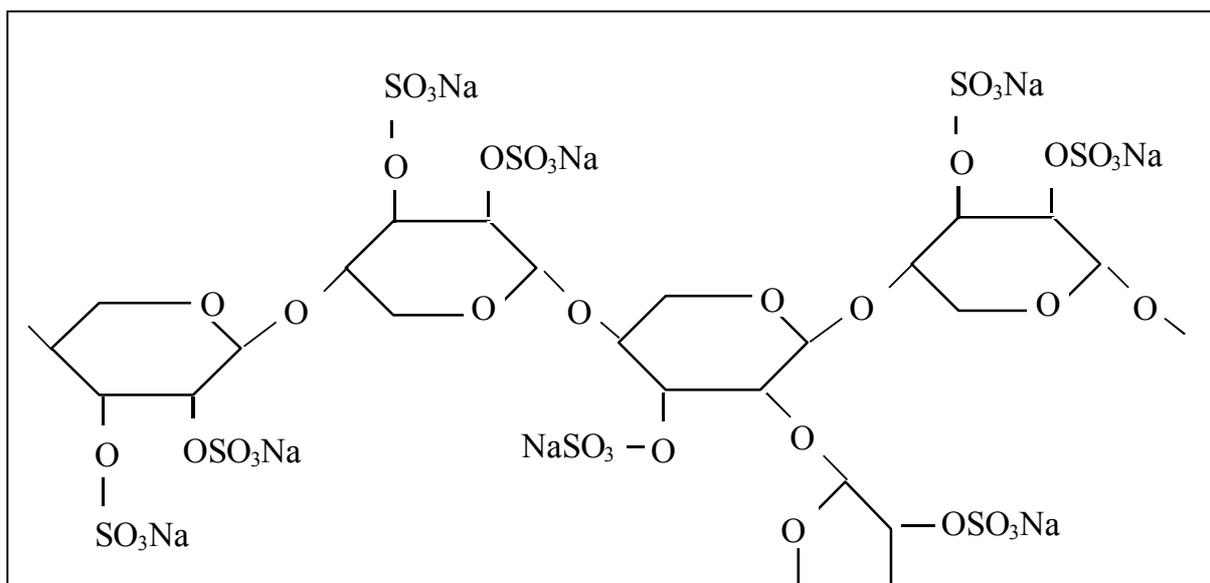


Abbildung 4: Strukturformel von PPS

PPS wird therapeutisch bei akuten, subakuten bzw. chronischen arteriosklerotischen und thrombotischen Gefäßerkrankungen sowie zur Thromboseprophylaxe eingesetzt.

Bei schweren akuten Zuständen werden beim Menschen 12-stündlich 100 mg i. m./i. v. gegeben. Die Dosis kann bis auf 300 mg pro Tag erhöht werden. Für mäßig akute bis chronische Fälle werden dreimal wöchentlich 100 mg gegeben. Dosierungsrichtlinien beim Tier zur Gerinnungshemmung gibt es nicht. Eine therapeutische Anwendung ist in diesem Zusammenhang nicht bekannt. Jedoch wird beim Hund eine chondroprotektive Wirkung nach viermaliger subkutaner Applikation von 3 mg/kg im Abstand von einer Woche bei degenerativen Gelenkerkrankungen beschrieben (DENNY 1996).

### **3 Tiere, Material und Methoden**

Die hier durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Dresden unter dem Aktenzeichen 75-9185.81-1.8/95 genehmigt.

#### **3.1 Versuchstiere**

Es wurden weibliche Mäuse des Stammes C3H/Neu verwendet. Die Zucht erfolgte im Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen

Universität Dresden. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten, wobei auf MHV, Reo 3, TMEV, PVM, Sendai und MVM getestet wurde.

Die Haltung erfolgte in den Räumen der Arbeitsgruppe „Normalgewebs–Strahlenbiologie“ im Experimentellen Zentrum. Die Raumtemperatur lag zwischen 22 und 24 °C, die relative Luftfeuchte bei ca. 60 %. Für einen definierten Hell-Dunkel-Rhythmus wurden die Fenster durch Jalousien abgedunkelt. Die künstliche Beleuchtung wurde im 12-Stunden-Rhythmus über ein Lichtprogramm mit einer Lichtperiode von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr gesteuert.

Die Tiere wurden in durchsichtigen Kunststoffkäfigen der Größe 3 (Makrolon<sup>®</sup>, Fa. Tecniplast) gehalten. Als Einstreu wurden Sägespäne (ssniff-Bedding <sup>3</sup>/<sub>4</sub> Faser, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH) verwendet. Den Mäusen stand pelletiertes Standard-Futter (sniff R/M-H, 10 mm nitrosaminarm - Alleinfutter für Ratten und Mäuse, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH) sowie chloriertes Trinkwasser aus Standard-Kunststoff-Trinkflaschen ad libitum zur Verfügung. Es wurden maximal 10 Tiere je Käfig gehalten.

Zum Versuch wurden nur Tiere herangezogen, die ein Mindestalter von 10 Wochen und ein Mindestgewicht von 20 g erreicht hatten. Die individuelle Kennzeichnung der Mäuse erfolgte vor Versuchsbeginn mittels Ohrmarkierung.

## **3.2 Versuchsdurchführung**

### **3.2.1 Narkose**

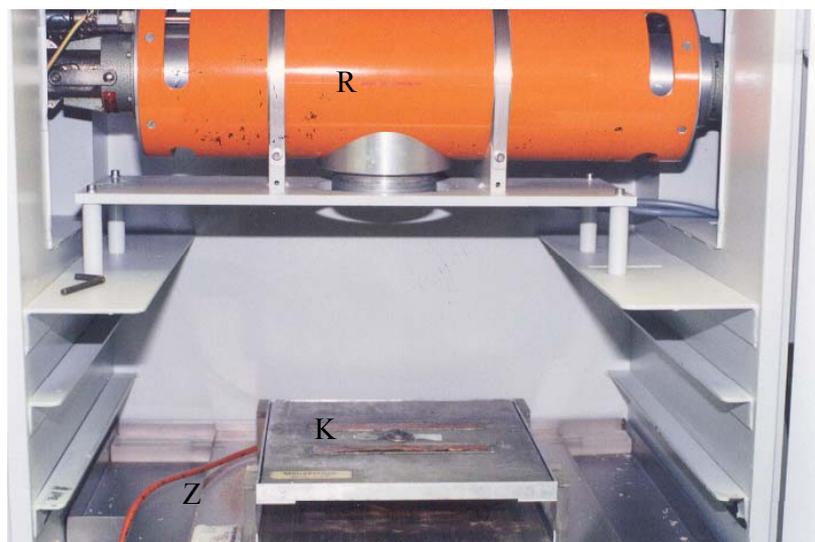
Für jede Zystometrie sowie zur Bestrahlung wurden die Tiere mittels Pentobarbital immobilisiert. Dazu wurde die handelsübliche Pentobarbital-Natrium-Lösung (Narcoren<sup>®</sup>, Fa. Rhone Merieux, jetzt Merial) im Verhältnis von 1+18 mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl-Lösung, Fa. Delta Pharma) verdünnt. Die Ruhigstellung war ca. 5 Minuten nach intraperitonealer Injektion in einer Dosis von ca. 60 mg/kg (entspricht ca. 0,25 ml /Maus) eingetreten.

## 3.2.2 Bestrahlung

### 3.2.2.1 Bestrahlungsanlage

Die Bestrahlungen wurden mit einer Vollschutz-Röntgenanlage Typ Isovolt 320/13 der Fa. Seifert & Co. KG durchgeführt (Abb. 5). Die verwendete Röntgenröhrenspannung betrug 200 kV, der Röhrenstrom 20 mA. Die Filterung der Strahlung erfolgte über ein Berylliumfenster sowie über eine 0,6 mm dicke Kupfer- und 0,1 mm dicke Aluminiumschicht.

Der Fokus-Haut-Abstand im vertikalen Strahlengang betrug 42 cm. Bei den beschriebenen Anlagenparametern ergab sich an der Harnblase eine Dosisleistung von 0,82 Gy/min. Je nach gewünschter Dosis wurde die Bestrahlungszeit an einem Zeitvorwahlgerät adjustiert. Nach Ablauf der eingestellten Bestrahlungszeit schaltete sich die Bestrahlungsanlage automatisch ab. Grundlage für diese Vorgehensweise war ein detaillierter und regelmäßig wiederholter Nachweis der Konstanz der Dosisleistung durch die Medizinhysiker der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie.



#### Abbildung 5: Bestrahlungsanlage

In der Mitte ist die Röntgenröhre (R) zu sehen, unter der sich im Zentralstrahl die Kollimatorplatte (K), sowie die Zuleitung (Z) zur Ionisationskammer befinden. Es handelt sich um eine Vollschutzkammer, deren Tür zur fotografischen Darstellung geöffnet wurde.

### 3.2.2.2 Dosimetrie

Eine Prüfung der Dosisleistung der Anlage erfolgte vor jeder Bestrahlungssitzung. Die Dosimetrie erfolgte mit einer Ionisationskammer (Typ M 23323, Physikalisch-Technische Werkstätten Dr. Pychlau GmbH), deren Kammervolumen  $0,1 \text{ cm}^3$  betrug. Diese wurde in blasenadäquater Position im Zentralstrahl unter der Bestrahlungsplatte platziert (siehe unten) und war über einen Gummischlauch an ein Dosimeter (Typ Dosimeter SN 4, Physikalisch-Technische Werkstätten Dr. Pychlau GmbH) angeschlossen. Vor jeder Messung erfolgte eine Kalibrierung mittels einer  $^{90}\text{Sr}$ -Kontroll-Vorrichtung entsprechend den Angaben des Herstellers.

### 3.2.2.3 Bestrahlung

Die Harnblasen der narkotisierten Mäuse wurden mittels eines transurethral eingeführten Venenverweilkatheters ohne Trokar (Neoflon<sup>®</sup>, Durchmesser 0,6 mm, Fa. Ohmeda GmbH) durch sanften Druck auf das untere Abdomen geleert. Dadurch wurden Variationen in der anatomischen Lage minimiert. Anschließend wurden die Mäuse (max. 8 pro Bestrahlungsgang) auf einer Kunststoffplatte (33 cm x 29 cm x 1 cm) an Schwanz und Hintergliedmaßen mit Klebeband so fixiert, dass der gut tastbare Kranialrand des Os pubis auf der kaudalen Begrenzung des Bestrahlungsfeldes (markiert durch eine Linie auf der Platte) lag. Anschließend wurde der Dünndarm mit Hilfe eines ebenfalls aus Klebeband zurechtgeschnittenen Bauchgurtes nach kranial und damit aus dem Bestrahlungsfeld herausverlagert („Kummerbund-Technik“, Abb. 6).

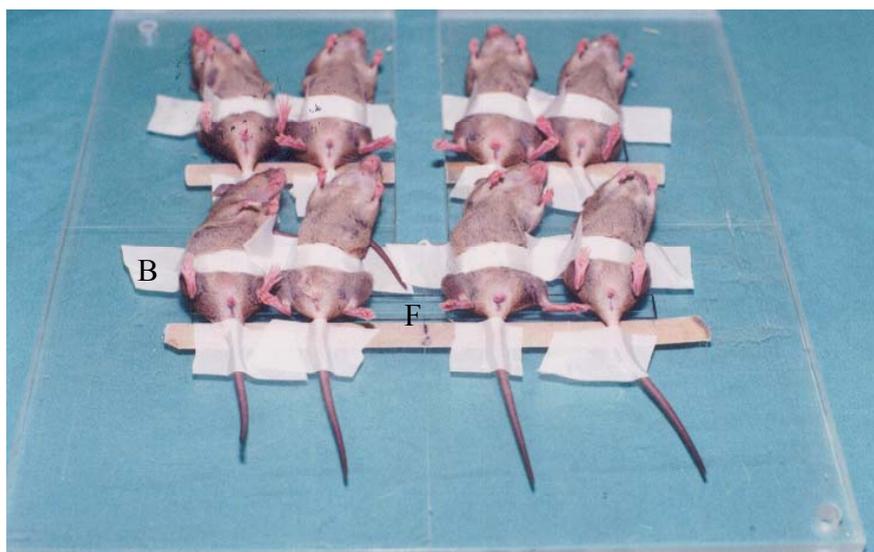


Abbildung 6: Fixation der Mäuse zur Bestrahlung

Die Mäuse wurden in Rückenlage so positioniert, dass der kraniale Beckenrand auf der kaudalen Linie des Bestrahlungsfeldes (F) zu liegen kam. Anschließend wurde das Darmkonvolut mittels Bauchgurt (B) nach kranial aus dem Bestrahlungsfeld herausverlagert.

Die Platte mit den narkotisierten und fixierten Mäusen wurde durch entsprechende Führungen im Zentralstrahl positioniert. Über den Mäusen lag - wie in Abb. 5 dargestellt - zur Abschirmung der Tierkörper eine Kollimatorplatte (33 cm x 28 cm x 1,1 cm) aus bleiäquivalentem Material (MCP-96, HEK Medizintechnik). Die Fenster in dieser Platte dienten der Definition der Bestrahlungsfelder von 18 cm x 1 cm. In diese Fenster waren oben genannte Filter aus Kupfer und Aluminium eingepasst (s. Abb. 7). Somit konnte parallel bei bis zu 8 Tieren ein Bereich von 10 mm kranial des kranialen Randes des Os pubis bestrahlt werden. Durch regelmäßig wiederholte Röntgenkontrollaufnahmen mit Kontrastmittel wurde die sichere Lage der (entleerten) Blase in diesem Bestrahlungsfeld bestätigt.

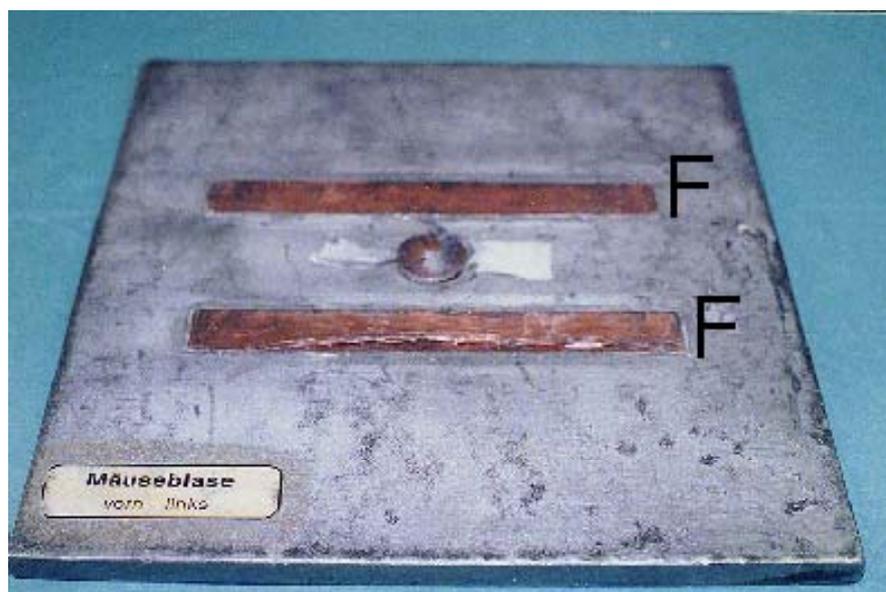


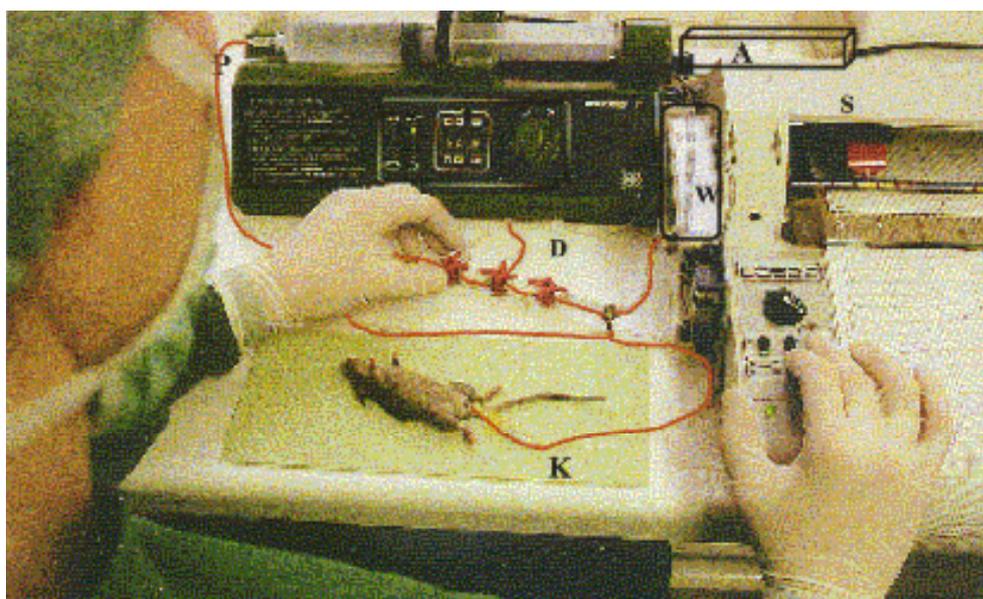
Abbildung 7: Kollimatorplatte

In die Kollimatorplatte sind die Bestrahlungsfenster mit dem Filter (F) aus Aluminium und Kupfer eingearbeitet.

### 3.2.3 Zysto(tono)metrie

Die transurethrale Zystotonometrie (s. Abb. 8) hat sich als minimal invasive Methode zur Bestimmung der Blasenfunktion bei der Maus bewährt (LUNDBECK et al. 1989a, 1989b, DÖRR 1992a, 1992b). Hierbei wird die Blase über einen Harnröhrenkatheter gefüllt und der jeweilige intravesikale Druck aufgezeichnet. So kann die Druck-Volumen-Relation definiert werden.

Zur Zystometrie wurde den narkotisierten Tieren die Harnblase über einen transurethral eingeführten Venenverweilkatheter ohne Trokar (Neoflon<sup>®</sup>, Durchmesser 6 mm, Fa. Ohmeda) durch sanften digitalen Druck auf das untere Abdomen entleert. Daraufhin wurde ein gleichartiger Katheter, welcher mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung (Fa. Delta Pharma) gefüllt war, in die Harnröhre eingeführt. Dieser war über ein NaCl-gefülltes, druckresistentes Schlauchsystem (Fa. Ohmeda GmbH) mittels Dreiwegehähnen (Connecta TH<sup>®</sup>, Fa. Ohmeda) mit einer Infusionspumpe auf der einen Seite (Perfuser VII, E bzw. F, Fa. Braun-Melsungen AG) sowie mit einem Druckwandler (SCX LCD 0 - 100 mm Hg, Fa. Sensym) auf der anderen Seite verbunden. Außerhalb der Messung konnte bei laufender Pumpe Natriumchloridlösung in einen Ablaufschlauch geleitet werden. Dadurch konnten Unregelmäßigkeiten in der Instillationsrate beim Einschalten der Pumpe vermieden werden. Der Druckwandler zeigte den intravesikalen Druck einerseits als digitales Signal an und leitete ihn andererseits als Analogsignal an einen Schreiber (Flachschreiber C 250 E, Fa. Linseis GmbH) weiter. Dort wurde die Druck-Volumen-Kurve dokumentiert.



#### Abbildung 8: Zystotonometrie-Messplatz

Oben im Bild ist die Infusionspumpe (P), rechts im Bild der Druckwandler (W) mit Schreiber (S), unten im Bild das Schlauchsystem mit 3-Wege-Hahnsystem (D) und eingeführtem Katheter (K) in der Harnröhre zu sehen. Der Ablauf (A) ist nur schwer zwischen Pumpe und Schreiber zu erkennen.

Kleine Druckschwankungen im Abdomen der Maus (Atmung, kleine reflektorische Bewegungen) wurden über ein definiertes Luftvolumen von  $0,5 \text{ cm}^3$  im Schlauchsystem direkt vor dem Druckwandler abgepuffert.

Die Blasenfüllung wurde stets bei Erreichen eines Druckes von 20 - 25 mm Hg abgebrochen, um einer Beeinflussung der Harnblasenfunktion durch Blasenwandüberdehnung vorzubeugen. Zur Beurteilung der Speicherfunktion wurde das Volumen bei einem intravesikalen Druck von 10 mm Hg ( $V_{10}$ ) herangezogen. Zu beachten ist, dass durch Dehnung der Infusionsspritze und der Hähne sowie durch Kompression der Luftsäule vor dem Druckwandler ein Druckverlust von ca.  $10 \mu\text{l}/10 \text{ mm Hg}$  auftritt („intrasystemisches Volumen“). Dieses muss bei der Berechnung der wahren Werte für  $V_{10}$  von den Messwerten subtrahiert werden (DÖRR 1995). Alle Messungen fanden zwischen 7.00 Uhr und 13.00 Uhr statt, um Einflüsse des Tagesrhythmus auszuschließen.

### 3.2.4 Medikamente und Applikation

#### 3.2.4.1 Heparin

Zu den vorliegenden Versuchen wurde das Präparat Heparin 5000 U/ml<sup>®</sup> (Fa. Seromed, Biochrom KG) verwendet. Das Produkt ist ein Gemisch aus nieder- und hochmolekularem Heparin. Zur Herstellung einer Heparinlösung mit einer Aktivität von 5000 U/ml wurden 200 mg Pulver (entspricht 25000 U) in 6 ml fassende Glasfläschchen gegeben und in 5 ml Aqua ad injectionem (Serum-Werk Bernburg AG) gelöst. Für die Herstellung einer Heparinlösung mit einer Aktivität von 3000 U/ml wurden 3 ml dieser Ausgangslösung mit weiteren 2 ml Aqua ad injectionem verdünnt.

Da gelöstes Heparin nur über kurze Zeit stabil ist, wurden je 0,5 ml der Gebrauchslösung in kleinen Kunststoffröhrchen (Cryo Tubes "Nunc", Fa. Intermed) bei -20 °C tiefgefroren und nach Bedarf bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die Heparinlösung wurde vor Applikation auf Zimmertemperatur erwärmt.

#### **3.2.4.2 Pentosanpolysulfat (PPS)**

Als Präparat wurde Pentosanpolysulfat SP 54<sup>®</sup> (Fa. bene Arzneimittel GmbH) verwendet. Eine Ampulle à 1 ml enthält 100 mg PPS-Natrium. Für eine Konzentration von 76,9 mg/ml wurde eine Ampulle mit 0,3 ml, für 50 mg/ml mit 1 ml Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) verdünnt. Die entsprechenden Lösungen wurden für jede Applikation frisch angesetzt. Die Mischung erfolgte in kleinen Kunststoffröhrchen (Cryo Tubes "Nunc", Fa. Intermed).

#### **3.2.4.3 Applikation**

Die Instillation der Medikamente wurde nach vorangegangener Entleerung der Harnblase mittels Katheter (Neoflon<sup>®</sup>, Durchmesser 6 mm, Fa. Ohmeda) vorgenommen. Das Medikament wurde in eine 1 ml-Spritze (Omnifix<sup>®</sup>, Fa. Braun) mit aufgesetztem Katheter aufgezogen und nach transurethraler Einführung des Katheters langsam (ca. 0,1 ml/min) in die Harnblase instilliert. Das applizierte Volumen betrug ca. 0,1 ml. Bei strahlenbedingt reduziertem Blasenvolumen erfolgte die Füllung, bis Flüssigkeit neben dem Katheter austrat.

### **3.3 Experimente**

#### **3.3.1 Scheinbestrahlung (Versuch S1)**

Um den Einfluss der Manipulation der Tiere zur Bestrahlung auf die Blasenfunktion zu definieren, wurde eine Gruppe von 10 Tieren scheinbestrahlt (Narkose, Blasenentleerung, Fixierung), ohne dass eine Strahlendosis appliziert wurde. Die Zystometrien erfolgten analog zur bestrahlten Kontrollgruppe (s. 3.3.2).

#### **3.3.2 Alleinige Bestrahlung (Versuch K1)**

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden nur bestrahlt. In diesem Versuch sollte der Einfluss der lokalen Bestrahlung der Harnblase auf die Organfunktion quantifiziert werden. Es erfolgte eine dreimalige Vormessung in einem Zeitraum von max. 14 Tagen vor der Bestrahlung und einem

mindestens zweitägigen Abstand zwischen den einzelnen Vormessungen um den Ausgangswert für das individuelle Blasenvolumen zu ermitteln.

Nach der Bestrahlung am Tag 0 wurden alle Tiere zweimal pro Woche über 30 Tage zystometriert, im späteren Verlauf einmal pro Monat bis maximal Tag 380. Sicher positive Tiere in der chronischen Phase wurden aus dem Versuch genommen.

Die Bestrahlung erfolgte mit jeweils 10 Tieren in 5 Dosisgruppen mit 13, 16, 18, 20 bzw. 23 Gy als Einzeitbestrahlung.

### **3.3.3 Placebogruppen (Versuch B1/01 und B1/02)**

In Versuch B1/01 erfolgte eine Bestrahlung mit 20 Gy. In den ersten 32 Tagen erfolgte die Zystometrie dreimal pro Woche. Bei positiver Strahlenreaktion (Verminderung des Blasenvolumens um mindestens 50 % des Kontrollvolumens in der ersten bzw. zweiten akuten Phase) erfolgte die intravesikale Applikation von NaCl-Lösung (0,9 %) als Placebo. An den beiden auf diese Behandlung folgenden Tagen wurde erneut zystometriert, dann wieder dreimal wöchentlich. Ab Tag 32 bis Tag 340 wurde auch bei diesen Tieren einmal je Monat die Blasenfunktion gemessen. Bei allen Tieren erfolgte eine Messung des Körpergewichtes bei jeder Zystometrie. Die Tierzahlen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

In einer weiteren Placebogruppe (B1/02) wurden die mit gestaffelten Dosen (15 –24 Gy) bestrahlten Tiere jeden zweiten Tag zystometriert. Von Tag 13 – Tag 30 erfolgte eine tägliche intravesikale Behandlung mit 0,9 % iger NaCl-lösung. Nach Tag 30 bis Tag 340 wurden die Tiere einmal im Monat zystometriert. Bei allen Tieren wurde die Zystometrie von einer Messung des Körpergewichtes begleitet.

### **3.3.4 Alleinige Heparinbehandlung (Versuch H1)**

Eine weitere Gruppe von 20 Tieren wurde ohne Bestrahlung nach dreimaliger Zystometrie mit Heparin behandelt und im Abstand von 12 h bis 72 h nach Behandlung erneut zystometriert, um den Einfluss der Glykosaminoglykan-Applikation auf die Funktion der gesunden Harnblase zu ermitteln.

### 3.3.5 Wirksamkeitsuntersuchungen in der akuten Phase (Versuch B1/1 – B1/3)

Ziel dieses Versuches war die quantitative Erfassung der Modifikation einer manifesten Strahlenreaktion durch intravesikale Gabe von Heparin (B1/1 und B1/2) bzw. PPS (B1/3) während der akuten Reaktion. Eine Übersicht gibt Tabelle 6.

In diesen Versuchen erfolgte eine viermalige Zystometrie vor Bestrahlung. Die Bestrahlung bestand aus der Applikation einer Einzeldosis von 20 Gy am Tag 0. Ab Tag 3 wurden alle Tiere jeden zweiten Tag zystometriert. Die Tiere der ersten Untergruppe (15 Tiere) wurden behandelt, sobald in den ersten 15 Tagen nach der Bestrahlung das Blasenvolumen um mindestens 50 % des individuellen Ausgangswertes gesunken war. Bei den Tieren der zweiten Untergruppe (15 Tiere) wurde die Reaktion in den ersten 15 Tagen dokumentiert, sie blieben aber unbehandelt. Die Behandlung erfolgte hier ab dem 16. Tag bis zum Tag 32 bei Diagnose einer positiven Strahlenreaktion. In diesem Zeitraum wurde eine positive Strahlenreaktion in der ersten Untergruppe nur dokumentiert.

Am Folgetag der Instillationsbehandlung wurden die Tiere erneut zystometriert. War das Blasenvolumen wiederum kleiner als 50 % des Kontrollwertes, so wurde erneut behandelt. Es erfolgten maximal 3 Behandlungen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen. Weitere Zystometrien wurden 48 und 72 h nach der letzten Instillation vorgenommen.

Nach Ablauf von 32 Tagen wurden diese Versuchstiere zur Erfassung der Spätreaktion einmal je Monat bis Tag 340 zystometrisch untersucht. Bei jeder Zystometrie wurde das Körpergewicht der Versuchstiere festgehalten.

Tabelle 6: Übersicht über die Wirksamkeitsuntersuchungen (B1/1 – B1/3), zusammen mit den zugehörigen Placebo-Versuchen B1/01, B1/02 und H1.

Versuch	Strahlen-Dosis (Gy)	Wirkstoff	Konzentration	Behandlungszeitraum	Tierzahl
B1/01*	20	NaCl-Lösung	0,9 %	Tag 0 – 15	15
	20	NaCl-Lösung	0,9%	Tag 16 – 30	15
B1/02*	20	NaCl-Lösung	0,9%	Tag 13 – 30 (täglich)	20

H1*	0	Heparin	5000 U/ml	einmalig	20
B1/1	20	Heparin	5000 U/ml	Tag 1 – 15	15
	20	Heparin	5000 U/ml	Tag 16 – 30	15
B1/2	20	Heparin	3000 U/ml	Tag 1 – 15	15
	20	Heparin	3000 U/ml	Tag 16 – 30	15
B 1/3	20	PPS	76,9 mg/ml	Tag 1 – 15	15
	20	PPS	76,9 mg/ml	Tag 16 – 30	15

\* außer bei Versuch B1/02 und H1 erfolgte die Behandlung stets bei positiver Strahlenreaktion

### 3.3.6 Behandlungsversuche in der akuten Phase (Versuch B2)

In dieser Versuchsreihe sollte anhand einer vollständigen Dosis-Effekt-Kurve (DEK) untersucht werden, in welchem Maße sich die isoeffektive Dosis für eine positive Strahlenreaktion in der akuten Phase II durch Heparin bzw. PPS verändert und wie sich dies auf die Ausprägung der chronischen Strahlenreaktion auswirkt. Zur Behandlung wurde Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml (B2/1) bzw. 3000 U/ml (B2/2) oder PPS, 50 mg/ml (B2/3), verwendet (Tabelle 7).

Für jeden Behandlungsarm wurden 40 Tiere am Tag 0 mit gestaffelten Dosen (je 8 Tiere mit 15, 17, 19, 21 und 24 Gy) bestrahlt. Vor Bestrahlung wurden die Tiere dreimal, ab Tag 3 bis Tag 14 zweimal pro Woche, ab Tag 14 bis Tag 32 jeden zweiten Tag zystometriert. Von Tag 14 bis Tag 32 wurden die Tiere bei Diagnose einer positiven Strahlenreaktion behandelt und am Folgetag erneut zystometriert. Wurde kein Anstieg des individuellen Blasenvolumens auf mehr als 50 % des Ausgangswertes verzeichnet, d. h. war noch immer eine positive Reaktion vorhanden, so erfolgte eine erneute Behandlung mit erneuter Folgemessung. Maximal wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Tiere, deren Blasenvolumen nach Behandlung anstieg, wurden entsprechend des 2-Tage-Rhythmus weiter zystometriert. Tiere, die auch nach 5 Behandlungen noch eine positive Blasenreaktion zeigten, wurden ebenso wieder dem 2-Tage-Rhythmus unterzogen.

Bei jeder erneuten Diagnose einer positiven Strahlenreaktion wurde bei den Tieren, die ursprünglich angesprochen hatten, nochmals behandelt. Nach Ablauf der akuten Phase II (ab Tag 32) wurden die Tiere bis maximal Tag 340 einmal je Monat zystometriert.

Auch bei diesen Versuchen wurde bei jeder Zystometrie das Körpergewicht gemessen.

Tabelle 7: Behandlungsversuche in der akuten Phase II (Versuch B2)

Versuch	Behandlungs- zeitraum	Wirkstoff	Konzentration	Dosis [Gy]	Tierzahl
B 2/1	Tag 14 – 32 <sup>x</sup>	Heparin	5000 U/ml	15,17,19,21,24	40
B 2/2	Tag 14 – 32 <sup>x</sup>	Heparin	3000 U/ml	15,17,19,21,24	40
B 2/3	Tag 14 – 32 <sup>x</sup>	PPS	50 mg/ml	15,17,19,21,24	40

<sup>x</sup> die Behandlung erfolgte nur bei Diagnose einer positiven Reaktion

### 3.3.7 Prophylaxeversuche in der akuten Phase (Versuch B3)

Ziel dieser Versuche war es, durch prophylaktische Behandlung mit zwei unterschiedlichen Dosierungen von Heparin zwischen Tag 13 und Tag 30 eine positive Strahlenreaktion in diesem Zeitraum zu verhindern und die Auswirkungen auf die späte Reaktion zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden je 40 Tiere zur Erstellung einer Dosis-Effekt-Kurve am Tag 0 mit Einzeldosen von 15, 17, 19, 21 und 24 Gy bestrahlt (Tabelle 8).

Die Tiere wurden vor Bestrahlung dreimal, ab Tag 3 über 30 Tage zweimal pro Woche, nach dem 30. Tag bis maximal zum 340. Tag post radiationem einmal pro Monat zystometriert. Von Tag 13 bis Tag 30 wurden alle Tiere, unabhängig vom Blasenvolumen, intravesikal mit Heparin behandelt. Die Konzentration betrug 5000 U/ml (B3/1) oder 3000 U/ml (B3/2).

Bei jeder Zystometrie wurden die Tiere gewogen. Als Kontrollversuch diente B1/02 (Tab. 6).

Tabelle 8: Prophylaxeversuche (Versuch B3)

Versuch	Behandlungs-	Wirkstoff	Konzentration	Strahlendosis in Gy	Tierzahl
---------	--------------	-----------	---------------	---------------------	----------

	zeitraum				
B3/1	Tag 13 – 30 (täglich)	Heparin	5000 U/ml	15,17,19,21,24	40
B3/2	Tag 13 – 30 (täglich)	Heparin	3000 U/ml	15,17,19,21,24	40

### 3.3.8 Applikation von Glykosaminoglykanen in der chronischen Phase (Versuch B4)

Ziel dieser Versuche war es zu überprüfen, ob eine Beeinflussung der Strahlenreaktion in der chronischen Phase mittels Glykosaminoglykaninstillation möglich ist. Die Behandlung erfolgte beim Auftreten einer positiven Strahlenreaktion ( $V_{10} \leq 50\%$  des Kontrollvolumens) bzw. gegen Ende der Latenzperiode, d. h. bei Verminderung des individuellen Harnvolumens auf 75%. Dazu wurden am Tag 0 120 Tiere mit 20 Gy bestrahlt.

Während der ersten 32 Tage nach Bestrahlung wurden die Tiere zweimal pro Woche zystometriert. Ab dem 32. Tag erfolgte alle zwei Wochen eine Zystometrie. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tiere bei einer Reduktion des individuellen Blasenvolumens um 50 % (B4/0 - 3) bzw. 25 % (B4/4 - 7) behandelt; instilliert wurde NaCl 0,9 % (Placebogruppe, Versuch B4/0, B4/4), Heparin 5000 U/ml (B4/1, B4/5), Heparin 3000 U/ml (B4/2, B4/6) oder PPS 50 mg/ml (B4/3, B4/7). Die Protokolle sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Nach der Behandlung wurden im Abstand von 24, 48 und 72 h Zystometrien durchgeführt. Bei einer weiter bestehendem oder erneuten Reduktion des Blasenvolumens unter den definierten Wert wurde erneut behandelt. Diejenigen Tiere, die auch nach fünftägiger Behandlung keine Restauration des Blasenvolumens zeigten, wurden aus dem Versuch genommen. Die Zystometrien wurden auch hier von einer Erfassung des Körpergewichtes begleitet.

Tabelle 9: Behandlungsversuche in der chronischen Phase (Versuch B4)

Versuch	Tierzahl	Strahlendosis in Gy	Behandlungszeitraum	Behandlung bei	Wirkstoff	Konzentration
---------	----------	---------------------	---------------------	----------------	-----------	---------------

B4/0	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 50 \%$	Natriumchloridlösg.	0,9 %
B4/1	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 50 \%$	Heparin	5000 U/ml
B4/2	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 50 \%$	Heparin	3000 U/ml
B4/3	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 50 \%$	PPS	50 mg/ml
B4/4	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 75 \%$	Natriumchloridlösg.	0,9 %
B4/5	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 75 \%$	Heparin	5000 U/ml
B4/6	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 75 \%$	Heparin	3000 U/ml
B4/7	15	20	Tag > 32	$V_{10} < 75 \%$	PPS	50 mg/ml

### 3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft® Excel 97 SR-1) und dem Statistical Analysis System (SAS, SAS Institute INC., Version 6.11).

#### 3.4.1 Mittelwertberechnung

Aus den Vormessungen der einzelnen Individuen wurde jeweils der arithmetische Mittelwert von  $V_{10}$  als individueller Kontrollwert berechnet. Die Berechnung der Gruppenmittelwerte für die Gewichtskurven erfolgte aus den Einzelwerten.

#### 3.4.2 T-test

Zur Analyse der Wirksamkeit der Behandlung (siehe 3.3.1 bis 3.3.6) wurde der abhängige sowie der unabhängige Students T-test herangezogen (SAS 1990b, SCHÜMER et al. 1990, GOGOLOK et al. 1990). So wurde geprüft, ob die Behandlung zu einer signifikanten Veränderung des Blasenvolumens an den darauf folgenden Tagen 1 – 5 geführt hat und ob ein Unterschied zwischen Versuchs- und Placebogruppe besteht.

Verwendet wurde die Prozedur TTEST von SAS (1990b), wobei p-Werte  $\leq 0,05$  als signifikanter Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen gewertet wurden.

### **3.4.3 Probit-Analyse und Vergleich von Dosis-Effekt-Kurven**

Bei den Versuchen B2 und B3 (siehe 3.3.4, 3.3.5) wurden mit Hilfe der Probitanalyse Dosis-Effekt-Kurven (DEK) auf der Basis der relativen Häufigkeit positiv reagierender Tiere in den einzelnen Dosisgruppen errechnet (PROC PROBIT: SAS 1990a; SCHÜMER et al. 1990, GOGOLOK et al. 1990). Es wurde eine logarithmische Verteilung zugrunde gelegt (Logit-Analyse). Zur Beschreibung einer DEK eignet sich der ED<sub>50</sub>-Wert (Dosis, bei der bei 50 % aller Tiere eine Reduktion des Blasenvolumens V<sub>10</sub> um  $\geq 50$  % zu erwarten ist), seine Standardabweichung  $\sigma$  und der 95 %-Vertrauensbereich.

Der Vergleich von DEK der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe (siehe 4.) erfolgte mittels Maximum-Likelihood-Chi-Square-Test unter Annahme einer logarithmischen Verteilung ohne Vorgabe eines Schwellenwertes (SCHÜMER et al. 1990, GOGOLOK et al. 1990).

Desweiteren wurden für den Versuch B3 multivariante Analysen durchgeführt (SAS PROC GLM: SAS 1990c), um Einflüsse der Quellenparameter Dosis und Reaktion in der akuten Phase I und II auf die Latenzzeiten bzw. das Risiko für eine späte Reaktion zu ermitteln (Proc GLM: SAS 1990c; SCHÜMER et al. 1990, GOGOLOK et al. 1990).

### **3.5 Histologische Untersuchungen**

Bei einigen Tieren mit schlechtem Allgemeinzustand wurde nach Euthanasie eine Sektion vorgenommen. Bei auffälligen Nierenveränderungen wurden die Nieren entnommen und in Formalin (neutral gepuffert, 4 %) für mindestens 24 h fixiert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet und 3  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt. Nach Hämatoxilin-Eosin-(HE)-Färbung gemäß Standardprotokoll erfolgte die Begutachtung.

Bei einigen Tieren, die trotz Behandlung in der späten Phase keine Restauration des Blasenvolumens aufwiesen, wurde die Blase histologisch untersucht. Zur Fixierung wurden die Blasen der unmittelbar zuvor euthanasierten Tiere entleert, mit 0,1 ml Formalin (neutral gepuffert, 4 %) aufgefüllt, abgebunden, entnommen und für mindestens 24 h in Formalin verbracht. Nach Paraffineinbettung wurden Schnitte (3  $\mu$ m) angefertigt und standardisiert mittels Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Bei den entnommen Organen erfolgte eine patho-histologische Untersuchung. Weitere Untersuchungen wurden nicht vorgenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Speicherfunktion der Harnblase

Mit Hilfe der Zystotonometrie kann die Speicherfunktion der Harnblase quantitativ erfasst werden. Der intravesikale Druck wird in Relation zum intravesikalen Volumen aufgezeichnet. Eine unter standardisierten Bedingungen (siehe 3.2.3) erstellte Druck-Volumen-Kurve eines unbehandelten Kontrolltieres ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

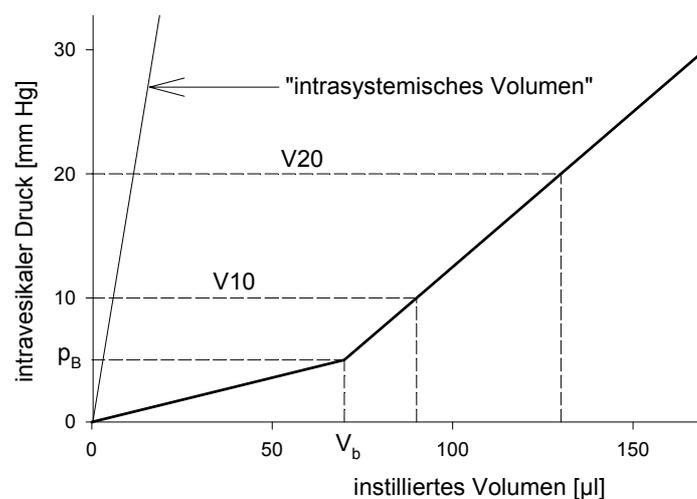


Abbildung 9: Druck-Volumen-Kurve der Harnblase einer unbehandelten Maus unter transurethraler Füllung mit Natriumchloridlösung mit einer Rate von 0,1 ml/min um 10.00 Uhr

V10 (20) ist das maximale Blasenvolumen bei einem Druck von 10 (20) mm Hg.  $p_B$  ist der Druck, bei dem sich der Steigungswinkel der Druck-Volumen-Kurve ändert. Zu beachten ist, dass von den V10- und V20-Werten noch jeweils das intrasystemische Volumen abgezogen werden muss (siehe 3.2.3).

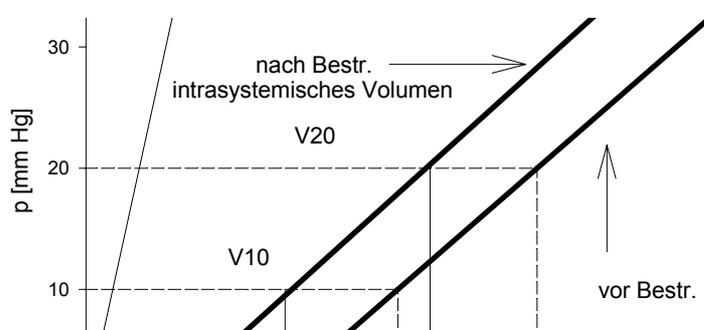
Eine derartige Druck-Volumen-Kurve besteht aus zwei Abschnitten, die durch ihre unterschiedliche Steilheit gekennzeichnet sind. Der erste, flache Abschnitt charakterisiert die passive, nahezu isotonische Dehnung der Harnblasenwand. Bei weiterer Füllung steigt der Druck im Verhältnis zum Volumen steil an (zweiter Abschnitt der Kurve). Ist die maximale Kapazität überschritten, so tritt Natriumchloridlösung am intravesikalen Katheter an der Urethra aus. Dies führt zu einem steilen Druckabfall, der in Abb. 8 nicht gezeigt ist.

Das Volumen bei 10 mm Hg (V10) wird zur Charakterisierung der Speicherkapazität herangezogen. Dabei muss der Druckverlust innerhalb der Messanordnung, bedingt durch Kompression der Luftsäule vor dem Druckwandler, Dehnung der Infusionsspritze und der Hähne, berücksichtigt werden. Dieses „intrasystemische Volumen“ beträgt ca. 10  $\mu$ l/10 mm Hg und wird von den gemessenen Werten abgezogen.

## 4.2 Strahlenreaktion der Harnblase

Bei einer Bestrahlung mit 0 Gy (Scheinbestrahlung, Versuch S1) konnte keine signifikante Verringerung der Blasenkapazität beobachtet werden. Schwankungen der Speicherkapazität zwischen den einzelnen Tagen nach Scheinbestrahlung entsprachen den Schwankungen der Blasenvolumina vor Scheinbestrahlung.

Die Strahlenreaktion der Harnblase äußert sich in einer Verringerung der Blasenspeicherkapazität. Dabei verkürzt sich die Speicherphase der Füllung (Abb. 10), was sich in einer Verkürzung des initialen flachen Schenkels der Druck-Volumen-Kurve manifestiert. Da der zweite Kurventeil von der Strahlenreaktion unbeeinflusst bleibt (DÖRR und SCHULTZ-HECTOR 1992), kann V10 als Maß für diese Veränderung herangezogen werden.



### Abbildung 10: Druck-Volumen-Kurve der Harnblase nach Bestrahlung

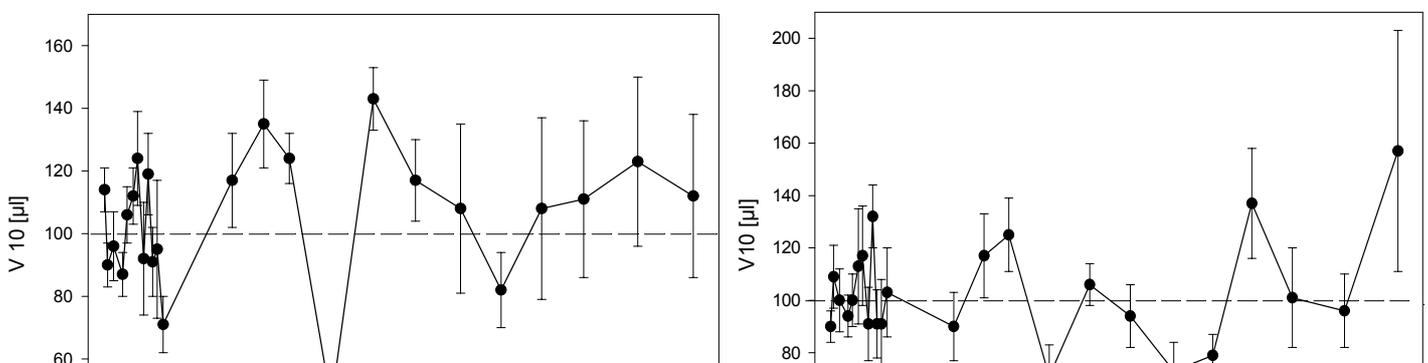
Zum Vergleich ist die Kontrollkurve dargestellt. Die Speicherphase ist deutlich reduziert, während der zweite Kurvenabschnitt unverändert bleibt.

#### 4.2.1 Zeitlicher Verlauf

Zur Erfassung des zeitlichen Verlaufes und der Dosisabhängigkeit der Strahlenreaktion wurde ein Versuch mit alleiniger Bestrahlung durchgeführt (Versuch K1). Die Tiere wurden mit steigenden Dosen (13 bis 23 Gy) am Tag 0 bestrahlt und regelmäßig zystometriert (siehe 3.3.1).

In Abbildung 11 sind für die einzelnen Dosen die Tagesmittelwerte für V10 relativ zum Ausgangsvolumen dargestellt.

In der akuten Phase sind, außer bei 20 Gy, ein Abfallen, Wiederansteigen und erneutes Abfallen der Blasenvolumenkurve zu erkennen. Darin spiegelt sich grob der zweiphasige Verlauf (API und APII) wider. Bei 20 Gy lässt sich dagegen eine kontinuierliche Abnahme des Blasenvolumens über die Gesamtzeit der akuten Phase feststellen. In der Spätphase sind bei allen 5 Dosispunkten Einbrüche in der Kurve im ähnlichen Zeitraum zu registrieren. So sind vermehrt Reagenten um die Tage 150, 250 und nach 300 zu finden. Anstiege in der Spätphase sind dadurch zu erklären, dass reagierende Tiere dem Versuch entnommen wurden.



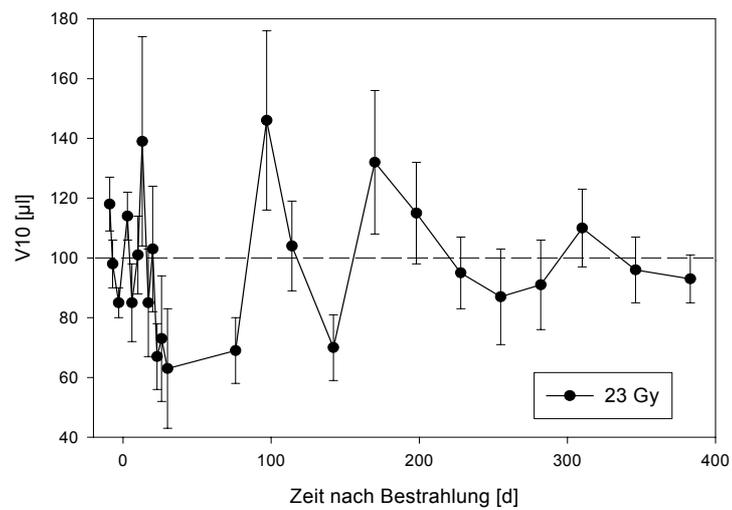
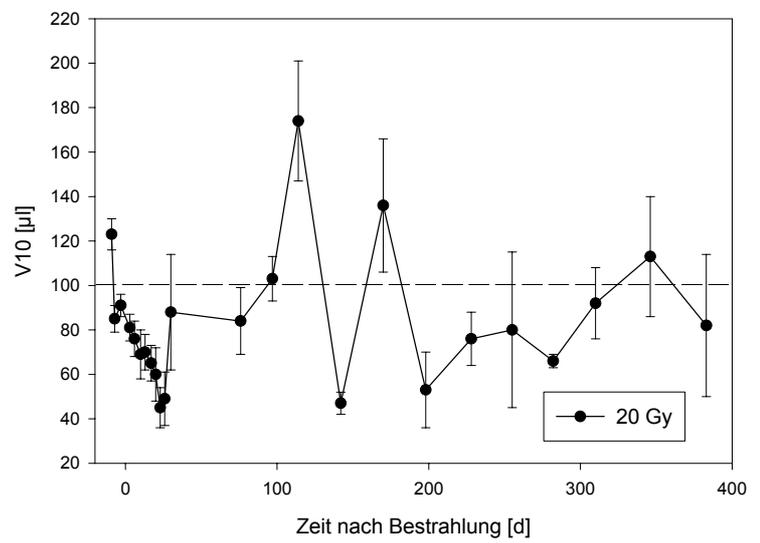
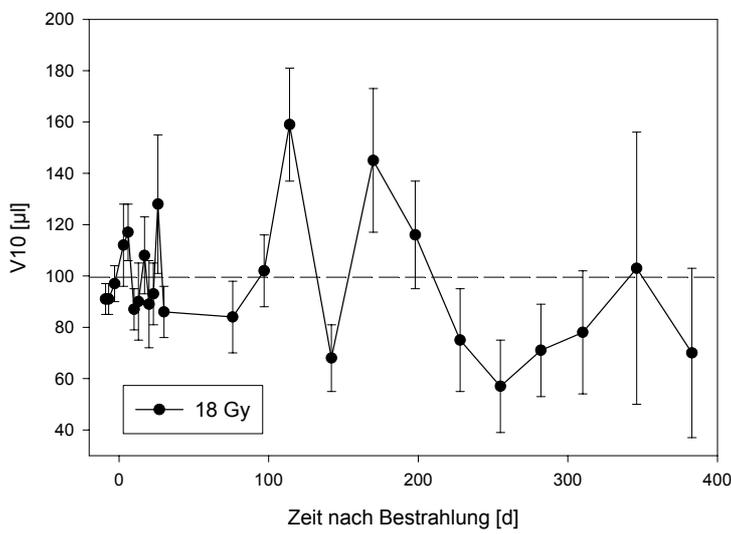


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Veränderung im Blasenvolumen bei Bestrahlung mit unterschiedlichen Einzeldosen

Dargestellt sind die relativen V10-Mittelwerte für die einzelnen Dosisgruppen. Jeder Dosispunkt war mit 10 Tieren besetzt; die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Definiert wurde die akute Phase der Strahlenreaktion von Tag 1 – 30; spätere Reaktionen wurden der späten Phase zugerechnet. Um den zeitlichen Verlauf der akuten Reaktion weiter zu charakterisieren, wurde die Häufigkeit von Neudiagnosen analysiert. In Abbildung 12 ist die Anzahl der neuen Reagenten gegen die Tage nach Bestrahlung aufgetragen. Diese folgt einem biphasischem Verlauf mit einem Tiefpunkt am Tag 17 und je einem Maximum an den Tagen 7 und 23 – 26.

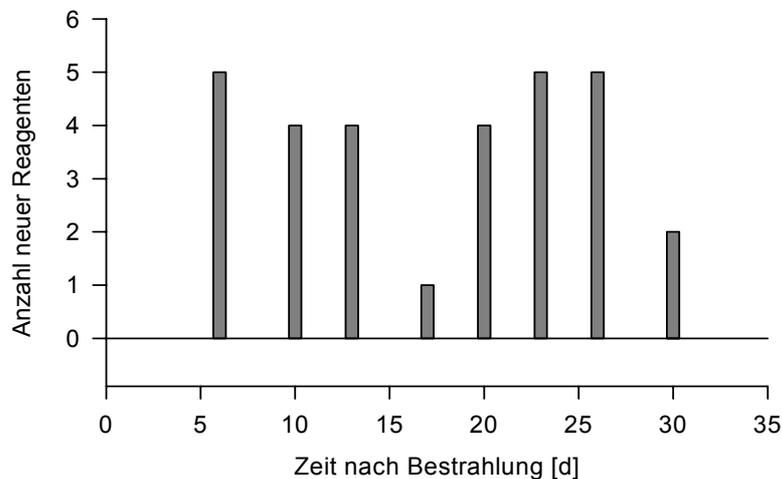


Abbildung 12: Anzahl neuer Reagenten nach Bestrahlung

Die Abbildung lässt eine Verteilung der Reagenten in 2 Wellen erkennen. Der Höhepunkt der ersten Welle liegt um den Tag 7, der der zweiten Welle zwischen Tag 23 und 26. Ein Tiefpunkt ist am Tag 17 erkennbar.

Eine Log-likelihood-Analyse ergibt für den vorliegenden Datensatz keine signifikante Trennung in zwei Wellen (EHME 1998). Die detaillierte Analyse eines umfangreicheren Datensatzes (DÖRR und BECK-BORNHOLDT 1999) ergab eine signifikante Auftrennung in eine erste und eine zweite akute Welle mit Trennung am Tag 15/16. Diese Ergebnisse und die entsprechende Einteilung werden weitergehenden Analysen zugrunde gelegt.

Die Latenzzeiten für die akute Reaktion sind in beiden Phasen unabhängig von der Dosis: Die mittlere Latenzzeit für die akute Phase I liegt bei 7 Tagen, die der akuten Phase II zwischen 23 und 26 Tagen. Die Varianzanalyse ergibt  $p = 0,33$  für Phase I und  $p = 0,14$  für Phase II. Aus

diesem Grund wurden für die Darstellung der neuen Reagenten im zeitlichen Verlauf (Abb. 11) alle Dosisgruppen zusammengefasst. Auch die Latenzzeit für die Spätphase ist im vorliegenden Datensatz nicht signifikant abhängig von der Dosis ( $p = 0,156$ ).

#### 4.2.2 Dosisabhängigkeit der Reaktion

Als positive Reaktion wird die Reduktion des Blasenvolumens um 50 % gegenüber dem Ausgangsvolumen definiert. Die Dosisabhängigkeit der Reaktion wird getrennt für alle Reaktionsphasen, d. h. für die erste und zweite akute Welle sowie für die Spätphase, analysiert. Die entsprechenden Dosis-Effekt-Kurven sind in Abbildung 13 dargestellt.

Die  $ED_{50}$ -Werte liegen bei 21,1 Gy ( $\sigma = 3,7$ ) für die erste akute Welle (Tag 1 – 15), bei 19,5 Gy ( $\sigma = 3,7$ ) für die zweite akute Welle (Tag 16 – 30) und bei 16,2 Gy ( $\sigma = 5,3$ ) für die Spätphase. Die dazugehörigen p-Werte für die Abhängigkeit der Reaktion von der Dosis, welche mittels Probit-Analyse ermittelt wurden, betragen 0,01; 0,004 und 0,003.

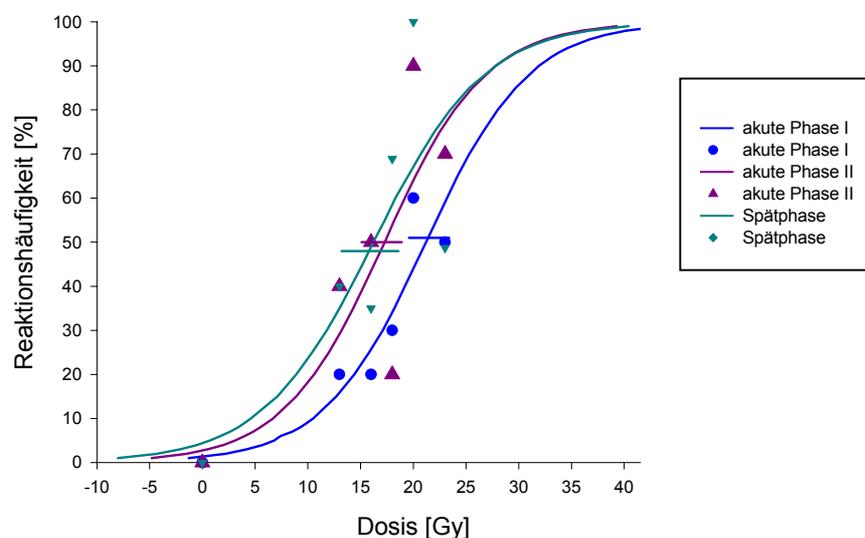


Abbildung 13: Dosis-Effekt-Kurven für die 1. und 2. Welle der akuten Blasenreaktion sowie für die Spätphase

Eine positive Strahlenreaktion ist definiert als eine Verringerung des individuellen Blasenvolumens um 50 %. Dieses Diagramm zeigt die Häufigkeit dieses Effektes in Abhängigkeit von der Dosis. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der  $ED_{50}$ -Werte.

Die Anzahl der im Versuch verbleibenden Tiere reduziert sich in der Spätphase um diejenigen, die eine sichere positive Reaktion zeigten oder die aus anderen Gründen ausgeschieden sind.

Letztere bestanden im vorliegenden Versuch aus Veränderungen am Genitaltrakt (Tumoren, Ovarialzysten) bei einem Tier nach Bestrahlung mit 20 Gy. Die Zahl der im Versuch verbleibenden Tiere lässt sich aus der Überlebenskurve im zeitlichen Verlauf entnehmen (Abb. 14).

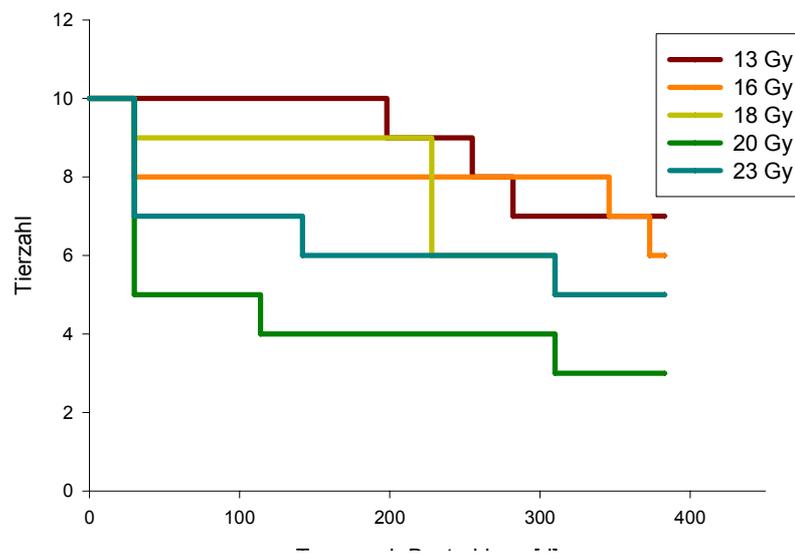


Abbildung 14: Überlebenskurven

Alle Dosispunkte wurden anfänglich (Tag 0) mit 10 Tieren besetzt. Bei den höheren Dosen war die Abnahme der Tierzahl größer als bei den niedrigeren Dosen.

#### 4.2.3 Zusammenhang zwischen den einzelnen Phasen der Strahlenreaktion

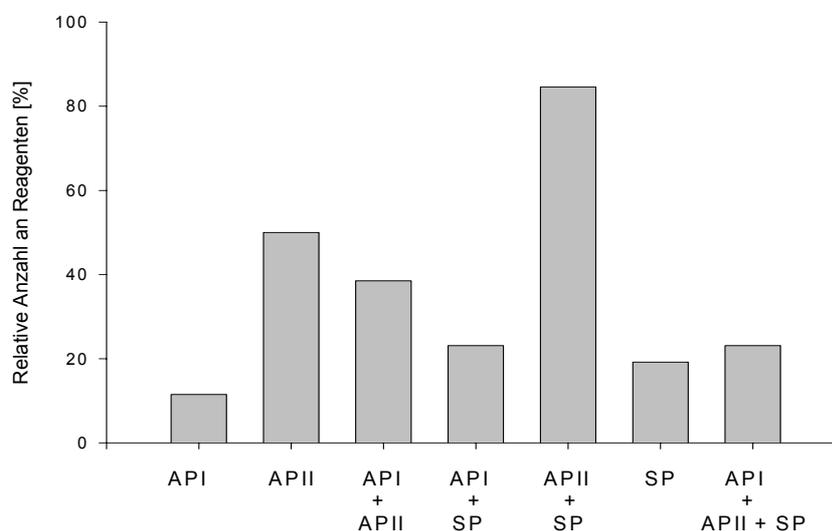


Abbildung 15 : Relative Anzahl an Reagenten in den entsprechenden Phasen (bei 26 Reagenten in der akuten Phase)

Die Säulen repräsentieren die relative Anzahl an Reagenten in den entsprechenden Phasen. Die ersten 3 geben die Anzahl der Reagenten der Akutphase wieder, die Säulen 4, 5 und 7 fassen die akute Phase und die Spätphase zusammen. Die vorletzte Säule gibt die Anzahl der nur in der Spätphase reagierenden Tiere wieder. Auffällig ist, dass die Gruppe der Tiere mit den meisten Reagenten in der Spätphase diejenigen darstellt, die die Reagenten in der akuten Phase II enthält.

Die Anzahl der Reagenten betrug für die akute Reaktion insgesamt 26 (Abb. 15). Zehn Tiere zeigten sowohl in der ersten als auch in der zweiten Welle eine positive Strahlenreaktion, während nur in der ersten Phase 3 Tiere und nur in der zweiten Phase 13 Tiere reagierten. Die Varianzanalyse ergab mit einem  $p$  von 0,148 keinen signifikanten Einfluss einer positiven Reaktion in der 1. Welle auf die Wahrscheinlichkeit eines positiven Strahleneffektes in der 2. Welle.

Betrachtet man die Anzahl der Reagenten in der Spätphase, so sind in der Gruppe der Tiere, die sowohl in der zweiten akuten Phase als auch in der Spätphase reagierten, mit 22 die meisten Tiere zu finden, gefolgt von denen, welche in allen Phasen eine positive Reaktion zeigten. Demgegenüber reagierten nur 6 in der ersten Phase und in der Spätphase. Ausschließlich in der Spätphase wurden 5 Tiere als Reagenten registriert.

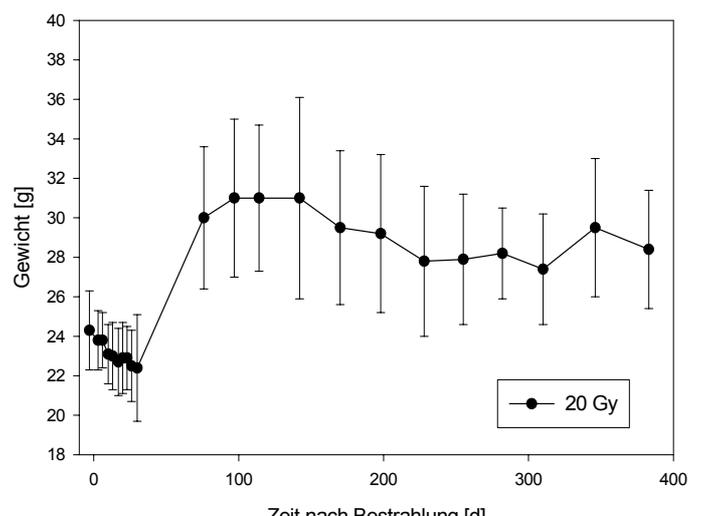
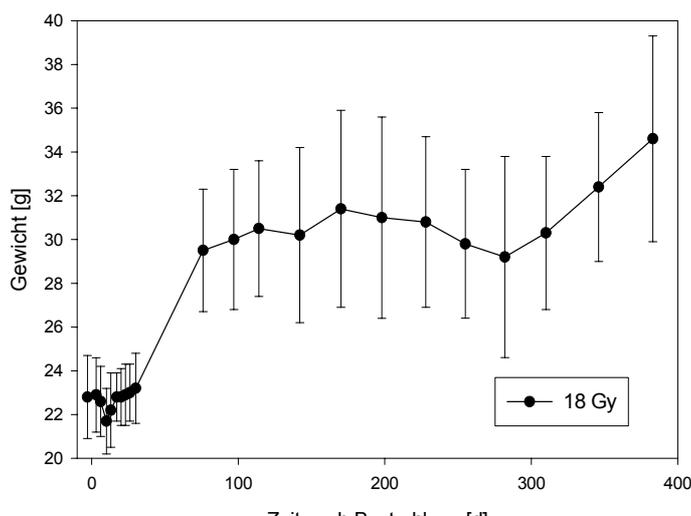
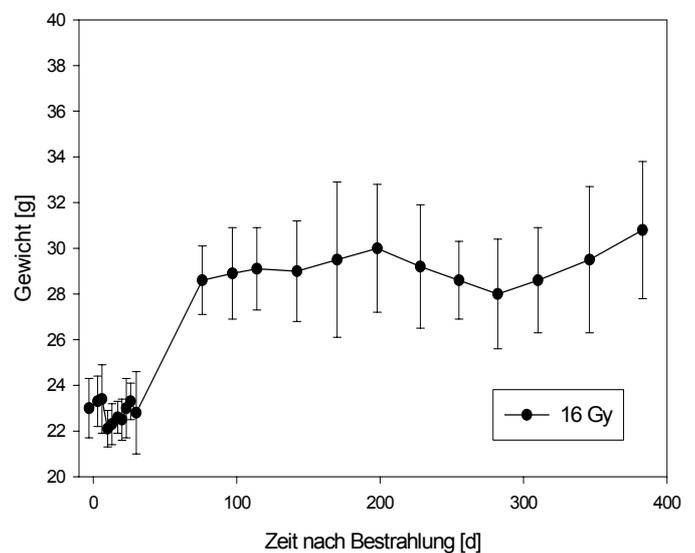
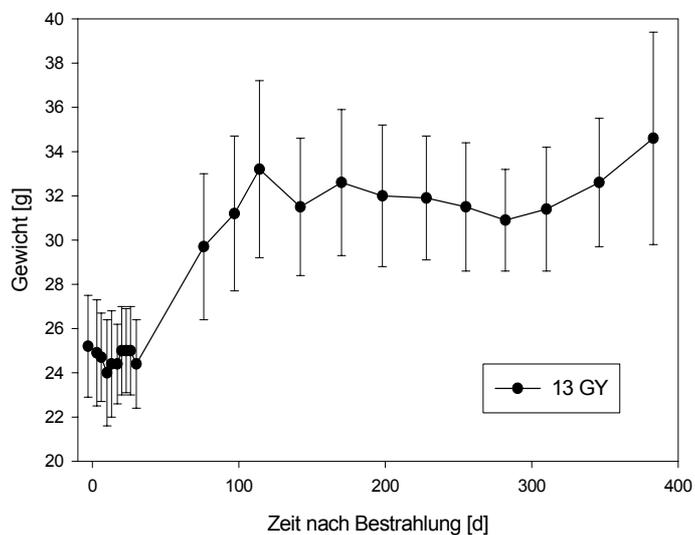
Die Varianzanalyse ergab, dass die Reaktion in der akuten Phase I keinen Einfluss auf die Spätphase hat. Zwischen akuter Phase II und Spätreaktion zeigt sich ein Trend ( $p = 0,075$ ).

#### **4.2.4 Nebenwirkungen und Gewichtsverlauf**

Eine Störung des Allgemeinbefindens kann bei der Maus am veränderten Verhalten (Körperhaltung, Verweigerung der Futteraufnahme, Sozialverhalten) festgestellt werden. Das Verhalten der Tiere in der akuten Phase wie auch in der Spätphase ließ keine derartige Beeinträchtigung erkennen. Der Gewichtsverlauf wurde als objektivierbarer Parameter für den Allgemeinzustand der Tiere analysiert. Als Kontrolle wurde der Gewichtsverlauf unbestrahlter, gleichaltriger Tiere herangezogen. In Abbildung 16 sind diese Verläufe in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlung dargestellt. Als Ausgangsgewicht wurde das Durchschnittsgewicht vor Bestrahlung verwendet.

Bei den niedrigen Dosisbereichen (13 - 18 Gy) ist während der akuten Phase nur eine geringe Schwankung des Gewichtes zu registrieren, während bei 20 und 23 Gy das Gewicht in diesem Zeitraum erst einmal abnimmt. Insgesamt ist das Gewicht am Tag nach der ersten Messung (Stress) niedriger als am Tag zuvor. In der chronischen Phase ist dann ein starkes Variieren des Gewichtes mit wechselnder Ab- und Zunahme zu sehen. Anzumerken ist, dass vor allem in der akuten Phase die Mittelwerte wesentlich durch nicht reagierende Tiere beeinflusst werden (außer bei den Dosen von 20 und 23 Gy), da die Reaktion beim einzelnen Tier nur 3 – 6 Tage andauert (DÖRR et al. 1992, 1998). Zu beachten ist weiterhin, dass alle sicher positiven Tiere (Blasenkapazität unter 50%) in der chronischen Phase aus dem Versuch genommen wurden und somit nicht mehr im Tagesmittelwert erfasst sind. Dies erklärt die starke Variation der Werte in der chronischen Phase.

Das Gewicht der bestrahlten Tiere unterlag den gleichen Schwankungen wie bei den Kontrolltieren. Eine signifikante Abhängigkeit des Gewichtes von der Behandlung bzw. der Dosis war in keinem Fall zu erkennen. In der chronischen Phase zeigten die Mäuse insgesamt eine Gewichtszunahme.



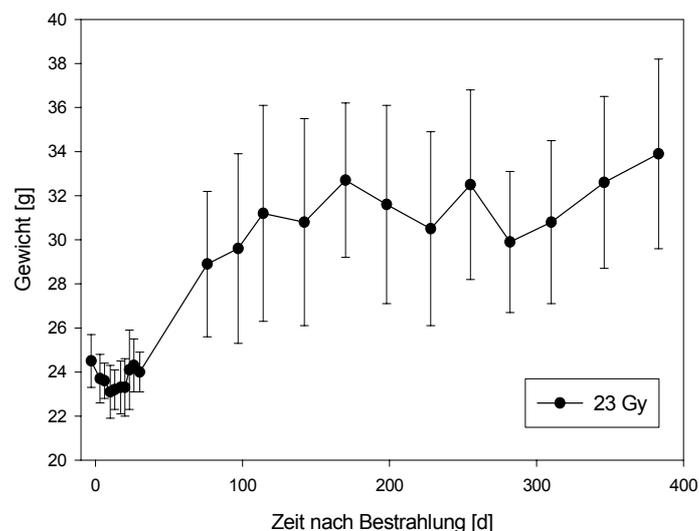


Abbildung 16: Gewichtsverlauf von Tag -9 bis 380 bei Bestrahlung mit 13 bis 23 Gy  
 Jeder Dosispunkt wurde bei Versuchsbeginn mit 10 Tieren besetzt. Die Datenpunkte stellen den Tagesmittelwert in der jeweiligen Dosisgruppe dar. Zu beachten ist die Abnahme der Tierzahl im Verlauf des Versuches (siehe 4.2.2), die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

### 4.3 Placebogruppe (Versuch B1/01 und B1/02)

Die Behandlung mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung wurde als Kontrolle für die mit Heparin und PPS behandelten Tiere durchgeführt. In B1/01 erfolgte eine Bestrahlung mit 20 Gy, gefolgt von Zystometrien in zweitägigen Abständen. Bei Auftreten einer positiven Strahlenreaktion in der akuten Phase I wurden 15, in der akuten Phase II 13 Tiere behandelt. Die Zahl der anschließend durchgeführten Zystometrien ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Anzahl der behandelten Tiere B1/01

Zeit nach Bestrahlung	AP I	AP II
24 h	15	13

48 h	4	6
72 h	2	3

Die starke Reduktion der Tiere im Verlauf der Nachbeobachtung ist auf ein aufgetretenes Narkoseproblem zurückzuführen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 17 dargestellt.

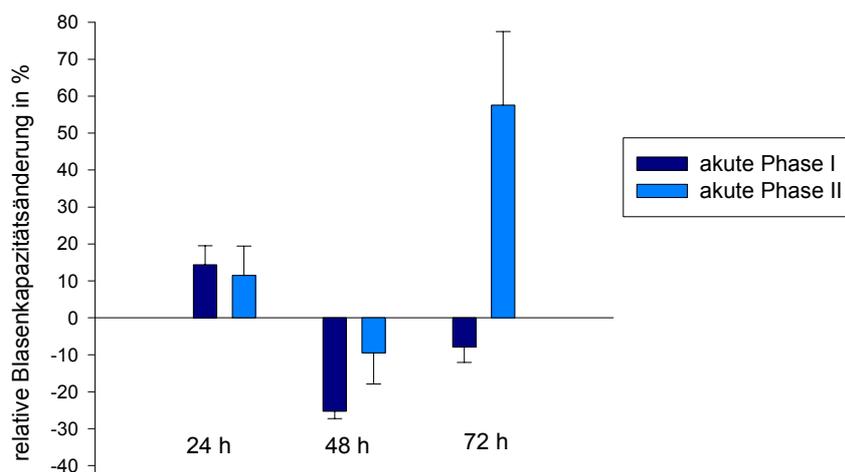


Abbildung 17: Blasenkapazitätsänderung nach Natriumchloridanwendung (0,9 %) in der akuten Phase I und II

Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung. Die Blasenkapazitätsänderungen sind alle signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den Werten vor Instillation. Während nach 24 h noch in beiden Phasen eine geringgradige Verbesserung der Blasenkapazität registriert werden kann, ist nach 48 h in beiden akuten Phasen eine Verringerung zu erkennen. Nach 72 h war die Anzahl der Tiere sehr gering.

Nach 24 h resultiert die Instillation von NaCl in einer signifikanten Zunahme der Blasenkapazität um 15  $\mu$ l (AP I) bzw. 11  $\mu$ l (AP II). Dies entspricht 14 (AP I) bzw. 12 (AP II) Prozentpunkten. Demgegenüber ist nach 48 h das Volumen gegenüber dem Wert vor Instillation weiter reduziert. Nach 72 h ist der Wert für die akute Phase II deutlich erhöht. Allerdings ist hier die geringe Zahl auswertbarer Messungen zu berücksichtigen.

In einem weiteren Versuch (B1/02) wurden 30 Tiere mit gestaffelten Dosen (15 – 24 Gy) bestrahlt. Die Zystometrien erfolgten in zweitägigen Abständen. Von Tag 13 – 30 wurden die Tiere zusätzlich mit NaCl behandelt. Die  $ED_{50}$ -Werte betragen in der akuten Phase  $21,2 \pm 4,9$  Gy, in der akuten Phase II  $17,3 \pm 4,8$  Gy und in der Spätphase  $16,2 \pm 5,9$  Gy. Sie weichen damit nicht signifikant von denen der unbehandelten Tiere ab.

#### 4.4 Behandlung unbestrahlter Tiere mit Heparin (Versuch H1)

Es wurden 10 Tiere über 5 Tage täglich im Abstand von 24 h mit Heparin behandelt und alle 24 h zystometriert.

Die Behandlung führte zu keiner signifikanten Veränderung der Blasenkapazität. Es wurden Schwankungen der Blasenspeicherkapazität ähnlich der Variationen vor Behandlung festgestellt.

#### 4.5 Wirksamkeit der Glykosaminoglykanbehandlung in der akuten Phase

Bei diesen Versuchen (B1/1 – 4) wurden je 40 Tiere mit 20 Gy bestrahlt. Die Tiere wurden nach Bestrahlung in zweitägigen Abständen zystometriert. Die Hälfte der Tiere wurde bei Auftreten einer positiven Strahlenreaktion in der akuten Phase I, die andere Hälfte in der akuten Phase II zur Behandlung vorgesehen. Die Behandlung bestand in der intravesikalen Applikation von Natriumchloridlösung (0,9 %ig), Heparin (3000 U/ml bzw. 5000 U/ml) oder PPS (76,9 mg/ml). Im Abstand von 24, 48 und 72 Stunden nach dieser Instillation wurden die Tiere erneut zystometriert, um Veränderungen der Blasenkapazität zu erfassen.

##### 4.5.1 Heparinbehandlung

Heparin wurde in Konzentrationen von 5000 U/ml bzw. 3000 U/ml getestet. Die Anzahl der nach der Behandlung durchgeführten Zystometrien gibt Tabelle 11 wieder.

Tabelle 11: Anzahl der behandelten Tiere B1/1 und B 1/2

	Heparin	AP I			AP II		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
B1/1	5000 U/ml	5	5	5	7	6	6
B1/2	3000 U/ml	15	15	14	11	11	10

##### 4.5.1.1 Heparin 5000 U/ml

Im ersten Versuch wurde **Heparin** in einer Dosierung von **5000 U/ml** herangezogen. Hier zeigten sich in der akuten Phase I 5, in der akuten Phase II 7 Reagenten. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 18 dargestellt.

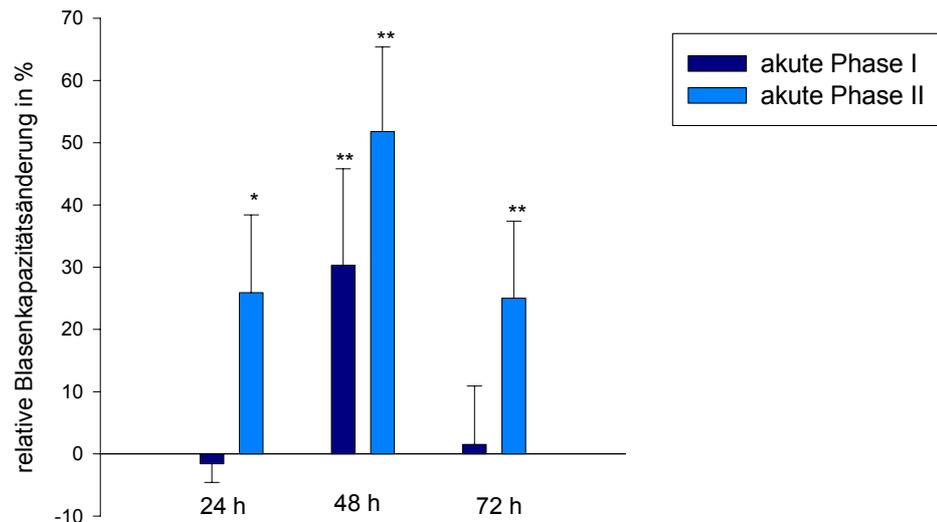


Abbildung 18: Blasenkapazitätsänderung nach Heparinanwendung (5000 U/ml) in der akuten Phase I und II

Die Säulen repräsentieren die relative Blasenkapazitätsänderung mit Standardabweichung (\*  $p < 0,050$ ; \*\*  $p < 0,010$ ). Nach 48 h ist in beiden akuten Phasen eine deutliche Erhöhung der Blasenkapazität zu registrieren. Zusätzlich ist in der akuten Phase II schon nach 24 h sowie noch nach 72 h eine deutliche Blasenkapazitätszunahme zu verzeichnen.

In der akuten Phase I ist 24 Stunden nach Behandlung keine signifikante Veränderung des Blasenvolumens festzustellen. Demgegenüber ist nach 48 Stunden eine Zunahme um 30 % zu verzeichnen, nach 72 h liegt wiederum keine signifikante Veränderung vor. In der akuten Phase II ist dagegen stets eine Zunahme des Blasenvolumens zu erkennen. Diese beträgt 25 % nach 24 und 72 h bzw. 52 % nach 48 h.

In Bezug auf die Anzahl der Heilungen (Blasenvolumen nach Behandlung größer als 50 % des Kontrollwertes vor Bestrahlung), findet sich in der akuten Phase II eine größere Anzahl als in

der akuten Phase I. Die größte Heilungsquote lag mit 45 % der behandelten Tiere bei 48 h. Nach 72 h sinkt die Heilungsquote wieder auf 30 % ab (Abb.19) .

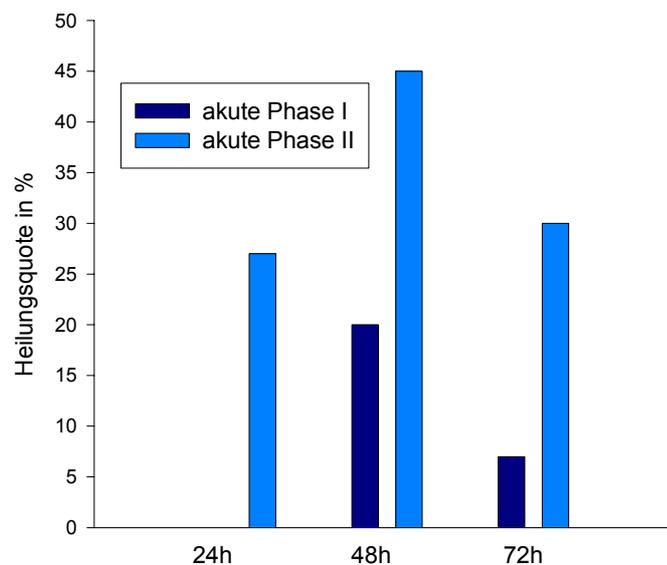


Abbildung 19: Heilungsquoten bei Behandlung mit Heparin 5000 U/ml in der akuten Phase I und II

Die Säulen nach Behandlung repräsentieren die Heilungsquote, d. h. die relative Anzahl an Tieren, die eine Blasenkapazität größer als 50 % des Ausgangsvolumens erreichen. Nach 24 h konnte in Phase I keine Heilung erreicht werden. Zum Vergleich die Heilungsquoten der Placebogruppe: nach 24 h ca. 14 % in API bzw. 12 % in APII und nach 48 h 0 %. Dagegen ist nach 48 h die Heilungsquote gegenüber NaCl deutlich erhöht.

Vergleicht man die Wirkung der Behandlung mit Heparin mit der Placebowirkung, so zeigt sich nach 48 Stunden in beiden Phasen ein signifikanter Unterschied. Nach 24 h konnte nur in Phase II ein signifikanter Anstieg des Blasenvolumens erreicht werden, nach 72 h war die Wirkung von Heparin nicht signifikant von der Placebogruppe verschieden.

Für die Heilungen ist in der akuten Phase I nach 24 Stunden die Heparinwirkung signifikant schlechter (60 %,  $p = 0,0004$ ), während in der akuten Phase II nach 48 Stunden eine Verbesserung um 45 % eintritt ( $p = 0,0004$ ).

Bei den mit Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml behandelten Tieren wurden häufig (ca. 50 %) Nebenwirkungen (Exsikkose und blasse Schleimhäute) beobachtet. Bei den getöteten

Tieren ergab die Sektion intraperitoneale Blutungen. Deshalb wurde in einem zweiten Versuch die Dosis auf 3000 U/ml herabgesetzt. Die starke Reduzierung der Tierzahl auf 50 % war auf eine durch *Klebsiella hämolytica* verursachte Nephritis (histologische und bakteriologische Untersuchungen) zurückzuführen.

#### 4.5.1.2 Heparin 3000 U/ml

Die Ergebnisse der Behandlung mit **Heparin** in einer Konzentration von **3000 U/ml** (B1/2) sind in Abb. 20 illustriert. In der akuten Phase I wurde durchweg eine Erhöhung (27 – 15 %) des Blasenvolumens im Vergleich zum prätherapeutischen Volumen erreicht. In der akuten Phase II ist dies nur nach 48 Stunden (12 %) der Fall, nach 72 Stunden liegt ein Trend vor (7%).

Beim Vergleich der mit Heparin behandelten Tiere mit der Placebogruppe findet sich nach 24 Stunden weder in der akuten Phase I noch in der akuten Phase II eine signifikante Blasenkapazitätszunahme. Dagegen ist die Heparinwirkung nach 48 Stunden sowohl in der akuten Phase I (20 %) als auch in der akuten Phase II (12 %) signifikant besser.

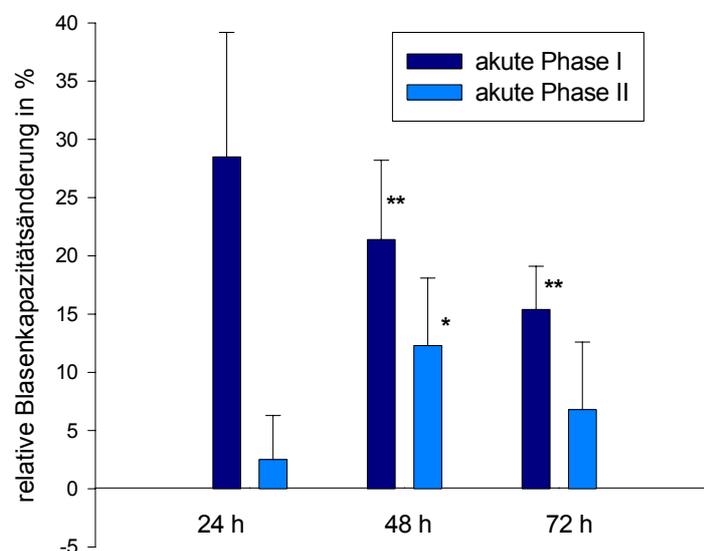


Abbildung 20: Blasenkapazitätsänderung nach Heparininstillation (3000 U/ml) in der akuten Phase I und II (\*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ )

Die Säulen repräsentieren die relative Blasenkapazitätsveränderung, bezogen auf das Volumen direkt vor Heparininstillation, mit Standardabweichung. Sowohl 24, 48 als auch 72 h nach Instillation ist eine Erhöhung des Blasenvolumens zu sehen. Nach 48 h ist diese in beiden Phasen, nach 72 h nur in der akuten Phase I gegenüber der NaCl-Behandlung signifikant.

Betrachtet man nun die Heilungsquote, so sind sowohl in Phase I als auch in Phase II nach 24 h mit 27 % die meisten Heilungen zu verzeichnen (Abb. 21) .

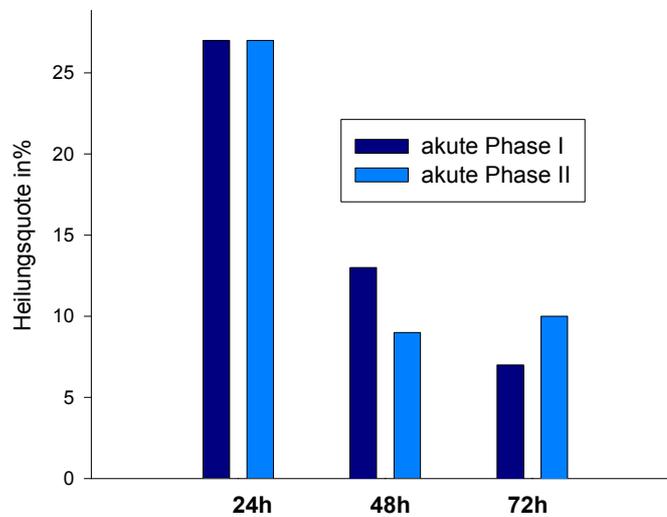


Abbildung 21: Heilungsquote bei Behandlung mit Heparin 3000 U/ml

Die Säulen repräsentieren die Heilungsquote. Zum Vergleich die Ergebnisse der Placebogruppe mit Heilungsquoten nach 24 h von 14 % in API bzw. 12 % in APII und 0 % nach 48 h. Die Heilungsquote ist stets positiv, wenn auch nach 24 h deutlich höher als nach 48 h.

Vergleicht man die relative Anzahl geheilter Tiere, so ist nach 24 Stunden in der akuten Phase I eine signifikant schlechtere Wirkung des Heparin ( $p = 0,0072$ ) festzustellen. Nach 72 Stunden ist in der akuten Phase II die Wirkung der Heparinbehandlung dagegen signifikant besser ( $p = 0,0001$ ) als bei NaCl-Behandlung. Es konnten 10 % mehr Tiere als nach Placebobehandlung als geheilt eingestuft werden.

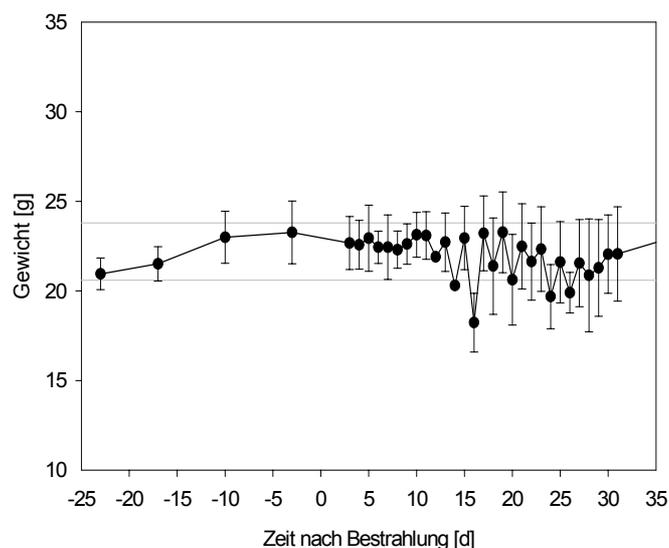


Abbildung 22: Gewichtsverlauf während der akuten Phase unter der Behandlung mit Heparin 3000 U/ml  
 Das horizontale Band beschreibt den Mittelwert samt Standardabweichung vor Bestrahlung. Im Kurvenverlauf sind nur kleine Schwankungen zu erkennen. Lediglich um Tag 15 wird einmalig das mittlere Gewicht kurzzeitig unterschritten.

Die Gewichtskurve, welche ein recht empfindliches Maß für Befindlichkeitsstörungen bei der Maus darstellt, lässt über den gesamten Beobachtungszeitraum keine nennenswerten Schwankungen erkennen (s. Abb. 22).

#### 4.5.2 Behandlung mit Pentosanpolysulfat (PPS)

Die Behandlungen mit nachfolgender Zystometrie wurden auch in diesem Versuch getrennt in den zwei akuten Phasen vorgenommen. Die Anzahl der im Versuch verwendeten Tiere ist aus Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Anzahl der behandelten Tiere B1/3

Zeit nach Bestrahlung	AP I	AP II
24 h	14	10
48 h	13	9
72 h	12	9

In diesem Versuch wurde sowohl in der akuten Phase I als auch in der akuten Phase II unmittelbar nach 24, 48 und 72 Stunden je eine signifikante Erhöhung des Blasenvolumens (um ca. 40 %) gegenüber den prätherapeutischen Messungen erreicht.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 23 zusammengefasst.

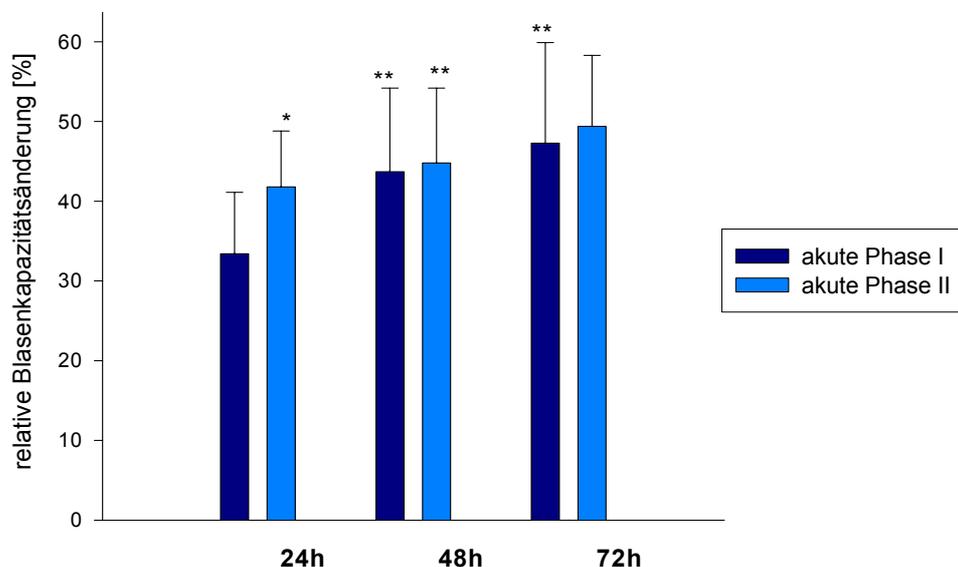


Abbildung 23: Blasenkapazitätsänderung nach PPS-Anwendung (76,9 mg/ml) in der akuten Phase I und II (\*  $p < 0,050$ , \*\*  $p < 0,010$ )

Die Säulen repräsentieren die relative Blasenkapazitätzunahme mit Standardabweichung. Sowohl nach 24, 48 als auch nach 72 h ist eine deutliche Blasenkapazitätzunahme in beiden Phasen zu erkennen.

Im Vergleich der PPS-Behandlung mit der Placebobehandlung ergibt sich nach 24 Stunden in der akuten Phase II (41 %) eine signifikant bessere Wirkung. Nach 48 Stunden gilt dies für beide akute Phasen (43 %). Nach 72 Stunden ist der Unterschied nur in der akuten Phase I signifikant.

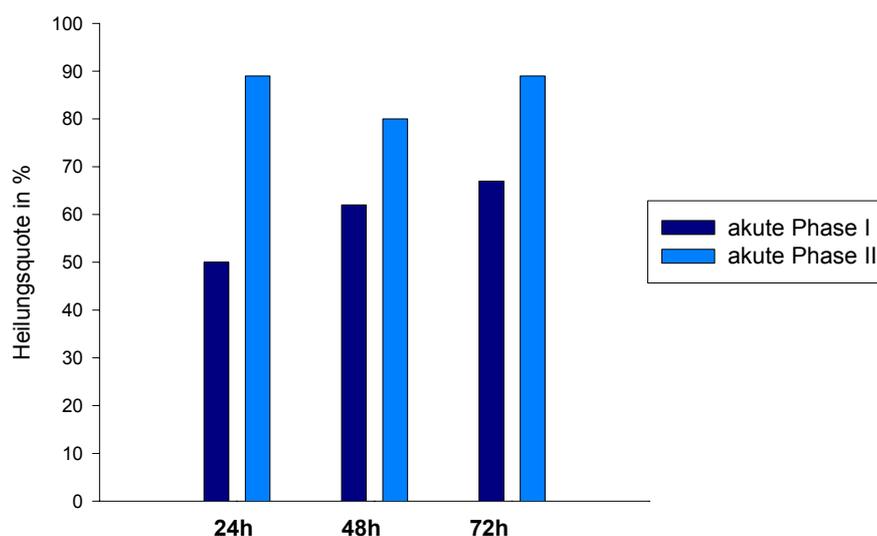


Abbildung 24: Heilungsquote bei PPS-Behandlung

Die Säulen repräsentieren die Heilungsquote. Zum Vergleich die Ergebnisse der Placebogruppe mit Heilungsquoten von: 14% in API bzw. 12 % in APII nach 24 h und 0 % nach 48 h. In allen Phasen lässt sich jederzeit nach Behandlung eine Heilungsquote  $\geq 50$  % erkennen.

Auch bei der Betrachtung der Heilungen (Abb. 24) lässt sich diese Tendenz erkennen. Die Heilungsquote in der akuten Phase I lag stets über 50 %, in der akuten Phase II bei über 80 %.

In Bezug auf den Heilungserfolg lässt sich nach 24 Stunden in der akuten Phase II ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0165$ ) feststellen. Es erfolgt hier durch PPS-Behandlung eine Erhöhung der Heilungsquote um 89 %. Nach 48 Stunden ist dieser Unterschied sowohl in der akuten Phase I als auch in der akuten Phase II signifikant. In der akuten Phase I kommt es zu einer Anhebung der Heilungsquote um 62 % ( $p = 0,0011$ ), in der akuten Phase II um 80 %

( $p = 0,0002$ ). Nach 72 Stunden ist ein signifikanter Unterschied nur in der akuten Phase I zu beobachten: Es konnten 67 % mehr Tiere geheilt werden ( $p = 0,0022$ ).

Nebenwirkungen der PPS-Behandlung äußerten sich in einer teils temporären Exsikkose (Hauttugorabnahme) für ca. 3 Tage bei fast allen Tieren. Bei 25 % (stark exsikkotische Tiere), die getötet wurden, wurden intraperitoneale Blutungen festgestellt.

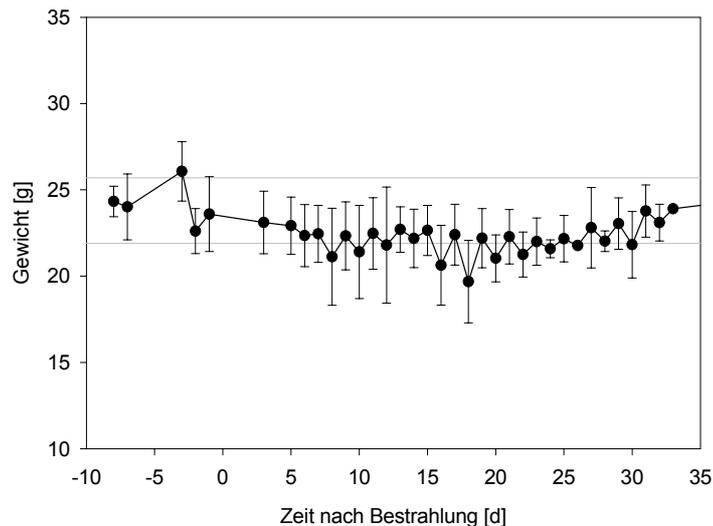


Abbildung 25: Gewichtsverlauf während der akuten Phase unter der Behandlung mit PPS 76,9 mg/ml  
Das horizontale Band beschreibt den Mittelwert ( $\pm$  SD) vor Bestrahlung.

Im Gewichtsverlauf selbst sind nur kleine Schwankungen zu erkennen (Abb.25). Dies ist auf den Anteil der erkrankten Tiere in der Gesamtpopulation pro Tag zurückzuführen. Gewichtsabnahmen einzelner Tiere lassen jedoch auf ein deutlich gestörtes Allgemeinbefinden schließen.

#### 4.5.3 Vergleiche zwischen Placebo-, Heparin- und PPS-behandelten Tieren

In der akuten Phase I zeigen sowohl PPS als auch Heparin in einer Konzentration von 3000 U/ml nach 24 h eine signifikant bessere Wirkung als Heparin 5000 U/ml. Ein Unterschied zwischen Heparin 3000 U/ml und PPS konnte nicht festgestellt werden. Auch nach 48 Stunden zeigt Heparin keine dem PPS überlegene Wirkung.

Nach 24 Stunden in der akuten Phase II ist PPS signifikant wirksamer als Heparin in der niedrigen Dosierung, jedoch nicht signifikant wirksamer als Heparin in der hohen Dosierung. Allerdings ist der Unterschied zwischen beiden Heparinkonzentrationen nicht signifikant.

Ein signifikanter Unterschied besteht nach 48 Stunden bei Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml gegenüber einer Konzentration von 3000 U/ml ( $p = 0,0323$ ). Die höhere Konzentration führt zu einer größeren Blasenkapazitätszunahme. Auch PPS ist zu diesem Zeitpunkt signifikant wirksamer als Heparin 3000 U/ml. Zwischen Heparin 5000 U/ml und PPS besteht kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 13: Vergleich der Blasenkapazitätsänderung in der akuten Phase I nach 48 h Heparin und PPS-Behandlung im Vergleich zur NaCl-Anwendung

	Heparin 3000 U/ml	Heparin 5000 U/ml	PPS 76,9 mg/ml
NaCl	>	>	>

Tabelle 14: Vergleich der Blasenkapazitätsänderung in der akuten Phase II nach 48 h Heparin und PPS-Behandlung im Vergleich zur NaCl-Anwendung

	Heparin 3000 U/ml	Heparin 5000 U/ml	PPS 76,9 mg/ml
NaCl	>	>>	>>

Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine Behandlung mit Glykosaminoglykanen bessere Resultate im Hinblick der Restaurierung der Speicherkapazität liefert als die Behandlung mit Natriumchlorid. Durch Natriumchloridinstillation kann die Speicherkapazität der Blase stets nur kurzfristig erhöht werden (Tab. 13 und 14). Bei Applikation von Glykosaminoglykanen hingegen hält dieser Effekt länger an. Hierbei scheint PPS am wirksamsten, wenn auch mit den meisten Nebenwirkungen behaftet zu sein. Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml scheint wirksamer als Heparin in der niedrigeren Konzentration von 3000 U/ml.

#### 4.6 Chronische Strahlenreaktion nach Behandlung der Strahlenreaktion in der akuten Phase II

Die Tiere dieses Versuches wurden einmalig mit gestaffelten Dosen (15, 17, 19, 21 und 24 Gy) bestrahlt. In den ersten 14 Tagen wurden die Tiere zweimal wöchentlich zystometriert, von Tag 16 bis Tag 32 alle zwei Tage. Wurde in der zweiten akuten Phase eine positive Strahlenreaktion registriert ( $V_{10} \leq 50\%$  des individuellen Kontrollvolumens), so wurden die Tiere intravesikal mit PPS oder Heparin behandelt. An den beiden auf die Behandlung folgenden Tagen wurde erneut zystometriert. Zeigte sich bei dieser Folgemessung oder später wiederum eine positive Strahlenreaktion, wurde die Behandlung samt Folgemessungen wiederholt. Nach Beendigung

der akuten Phase II wurden die Tiere bis Tag 340, dem Ende des Beobachtungszeitraumes, einmal im Monat zystometriert.

Die Latenzzeit für die späte Reaktion erstreckte sich hierbei über einen Zeitraum von Tag 116 bis Tag 318, mit einer Häufung um Tag 215 bis 290. Ein einzelnes Tier reagierte schon am Tag 65, zwei weitere erst am Tag 318.

#### 4.6.1 Wirksamkeit der Glykosaminoglykanbehandlung in der akuten Phase II

Der Erfolg der Instillation von **5000 U/ml Heparin** nach Eintreten der Strahlenreaktion in der akuten Phase II ist in Abb. 25 illustriert.

Die Behandlung führt zu einer deutlichen Zunahme des Blasenvolumens. Auffallend ist, dass die Zunahme am zweiten Tag größer ist als am ersten Tag. Im Vergleich gegenüber einer Placebo-behandlung mit Natriumchloridlösung ist die Wirkung an beiden Tagen statistisch signifikant. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Wirksamkeitsuntersuchungen (siehe 4.3.1.2).

Eine intravesikale Behandlung mit **Heparin** in einer Konzentration von **3000 U/ml** führt ebenfalls sowohl am ersten als auch am zweiten Tag nach Behandlung zu einer deutlichen Zunahme der Blasenkapazität. Alle Änderungen der Blasenkapazität sind gegenüber placebobehandelten Tieren statistisch signifikant (siehe Abb. 26/27).

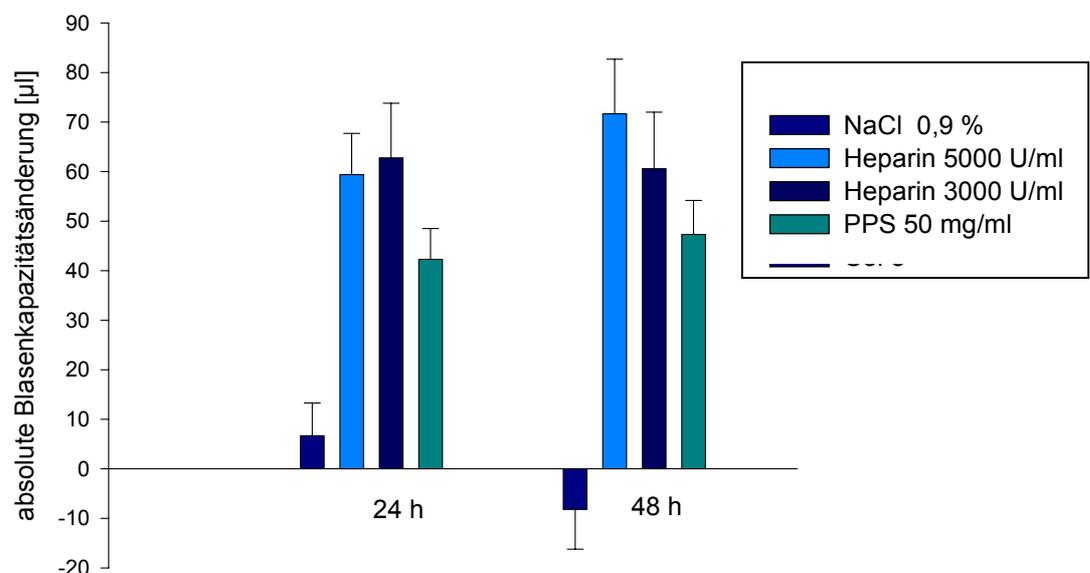


Abbildung 26: Absolute Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung mit Heparin (5000 und 3000 U/ml) sowie PPS (50mg/ml) in der akuten Phase II  
Die Säulen repräsentieren die Blasenkapazitätszunahme mit ihrer Standardabweichung. Die Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber den Werten vor Behandlung

betrug weniger als 0,0001.

Auffällig ist, dass auch bei NaCl-Behandlung nach 24 h die Blasenkapazität ansteigt, wenn auch nicht so stark wie bei den Behandlungen mit Glykosaminoglykanen. Dagegen nimmt die Blasenkapazität nach 48 h nur noch bei den mit Glykosaminoglykanen behandelten Tieren zu.

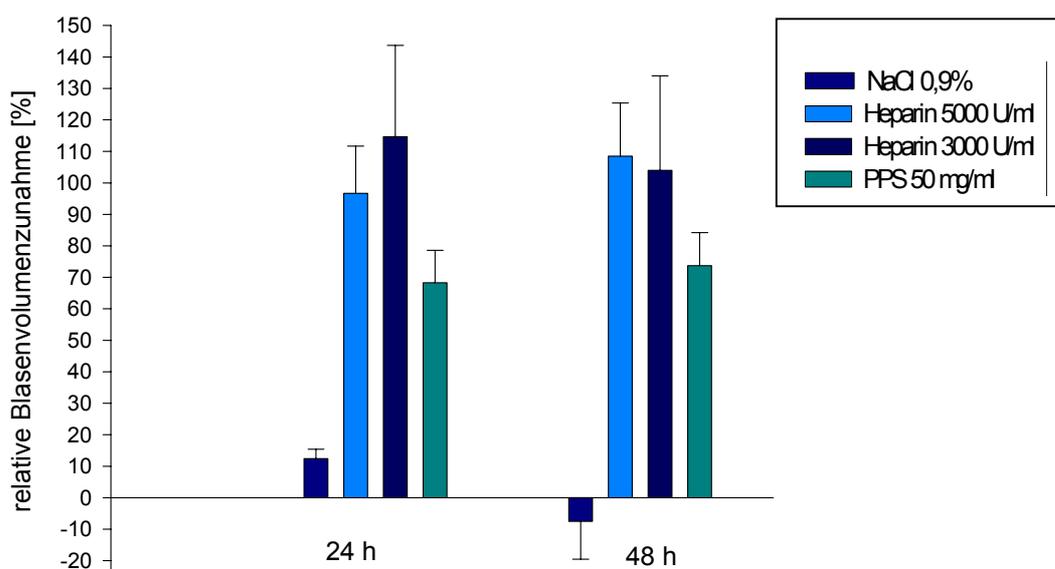


Abbildung 27: Relative Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung mit Heparin (5000 und 3000 U/ml) sowie PPS (50mg/ml) in der akuten Phase II

Die Säulen repräsentieren die relative Blasenkapazitätzunahme mit Standardabweichung. Die Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber den Werten vor Behandlung betrug weniger als 0,0001.

Auch durch die intravesikale **PPS**-Behandlung steigt das Blasenvolumen signifikant. Die Änderung der Blasenspeicherkapazität ist ebenfalls statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abb.26).

#### 4.6.2 Dosis-Effekt-Beziehung für die akute Strahlenreaktion

Die  $ED_{50}$  –Werte für die erste akute Phase betragen  $21,6 \pm 3,4$  Gy,  $21,2 \pm 3,3$  Gy und  $18,7 \pm 4,1$  Gy für die Versuche mit Instillation von Heparin 5000 U/ml, 3000 U/ml bzw. PPS. Die Werte sind nicht signifikant verschieden vom Kontrollversuch mit  $21,2 \pm 3,7$  Gy (siehe 3.3.2).

In diesen Versuchen betragen die  $ED_{50}$  –Werte für die akute Phase II  $17,1 \pm 3,2$  Gy,  $20,6 \pm 6,5$  Gy und  $17,8 \pm 3,8$  Gy für Tiere, bei denen eine Instillation mit Heparin 5000 U/ml,

3000 U/ml bzw. PPS nach Auftreten einer Reaktion durchgeführt wurde. Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zum Kontrollversuch mit  $ED_{50} = 19,5 \pm 3,7$ .

Tabelle 15:  $ED_{50}$ -Werte in den akuten Phasen I und II nach Heparin- und PPS-Behandlung in der akuten Phase II

	$ED_{50}$ -Werte [Gy]	
	AP I	AP II
Kontrollversuch	$21,1 \pm 3,7$	$19,5 \pm 3,7$
Heparin 5000 U/ml	$21,6 \pm 3,4$	$17,1 \pm 3,2$
Heparin 3000 U/ml	$21,2 \pm 3,3$	$20,6 \pm 6,5$
PPS 50 mg/ml	$18,7 \pm 4,1$	$17,8 \pm 3,8$

In der akuten Phase II waren ca. 25 % der Tiere vorübergehend exsikkotisch. Bis auf 4 Tiere erholten sich alle wieder. Von letzteren Tieren wurde nach Euthanasie eine Sektion durchgeführt, welche bei einem Tier eine Nephritis auf bakterieller Ursache erkennen ließ. Intraperitoneale Blutungen wurden bei 3 Tieren gefunden.

Es konnten in keiner Versuchsgruppe während des gesamten Beobachtungszeitraumes weitere klinisch sichtbare Veränderungen festgestellt werden.

Im Behandlungszeitraum lässt sich in keiner Behandlungsgruppe eine deutliche Schwankung des Körpergewichts erkennen. Eine altersbedingte Zunahme des Körpergewichtes zwischen Tag 30 und Tag 200 war zu registrieren.

#### 4.6.3 Dosis-Effekt-Beziehung für die chronische Strahlenreaktion

Bei Heparinbehandlung (5000 U/ml) ist gegenüber dem Kontrollversuch in der Spätphase eine Erhöhung des  $ED_{50}$ -Wertes um 7,4 Gy von  $16,2 \pm 5,3$  auf  $23,6 \pm 5,9$  Gy festzustellen (Abb. 28).

Dieser Anstieg ist statistisch signifikant ( $p = 0,011$ ). Dies entspricht einem Dosismodifikationsfaktor<sup>2</sup> (DMF) von 1,5 durch die Behandlung in der akuten Phase II.

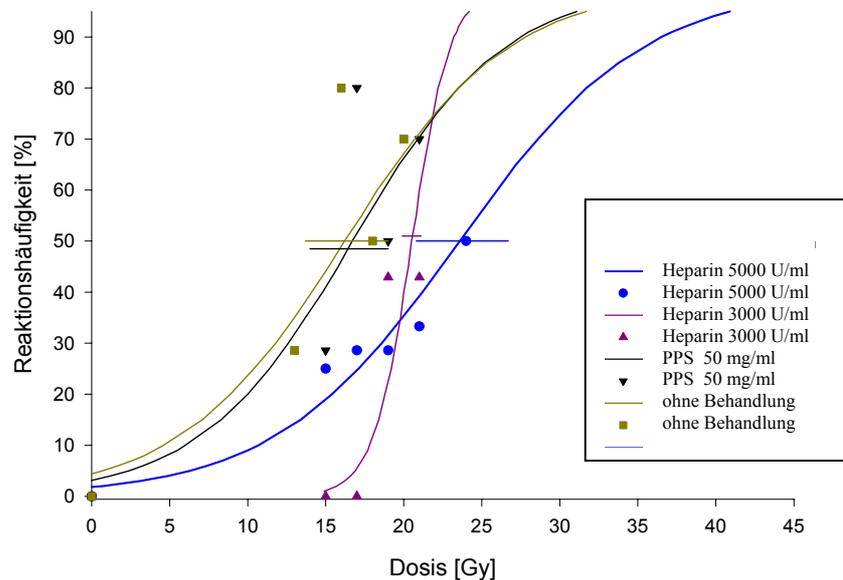


Abbildung 28: Dosis-Effekt-Kurven der Spätphase für Bestrahlung mit gestaffelten Dosen und Instillation von Heparin 5000, 3000 U/ml und PPS 50 mg/ml im Vergleich zu der Kontrollgruppe

Während sich die PPS-Kurve und die der Kontrollgruppe nahezu decken, sind die Heparinkurven deutlich nach rechts verschoben. Außerdem ist bei Heparin in einer Konzentration von 3000 U/ml der Kurvenverlauf steiler.

Bei Behandlung mit Heparin in einer Konzentration von 3000 U/ml ist die DEK gegenüber Natriumchlorid ebenfalls deutlich nach rechts verschoben. Der ED<sub>50</sub>-Wert beträgt  $20,5 \pm 1,2$  Gy ( $p = 0,0051$ ) (s. Abb.28). Der Dosismodifikationsfaktor liegt in diesem Versuch bei 1,3.

Für PPS ist in der Spätphase keine signifikante ( $p = 0,867$ ) Erhöhung des ED<sub>50</sub>-Wertes mit  $16,7 \pm 4,9$  Gy, d. h. keine verringerte Reaktionshäufigkeit, zu erkennen (s. Abb.28).

<sup>2</sup> Der Dosismodifikationsfaktor gibt das Verhältnis der ED<sub>50</sub> mit Glykosaminoglykan-Behandlung zur ED<sub>50</sub> ohne Behandlung an.

## 4.7 Prophylaktische Glykosaminoglykanbehandlung während der akuten Phase II

Die Tiere dieses Versuches wurden einmalig mit gestaffelten Dosen (15, 17, 19, 21 und 24 Gy) bestrahlt. Die Mäuse wurden in zweitägigen Abständen zystometriert. Zwischen Tag 13 und Tag 30 wurden sie zusätzlich, unabhängig vom Blasenvolumen, täglich mit einer Heparinlösung von 3000 U/ml bzw. 5000 U/ml intravesikal behandelt. Nach Ablauf der akuten Phase wurden die Tiere einmal pro Monat zystometriert.

In dieser Versuchsreihe wurde für die akute Phase I und II sowie für die Spätphase je eine Dosis-Effekt-Kurve erstellt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 29 dargestellt.

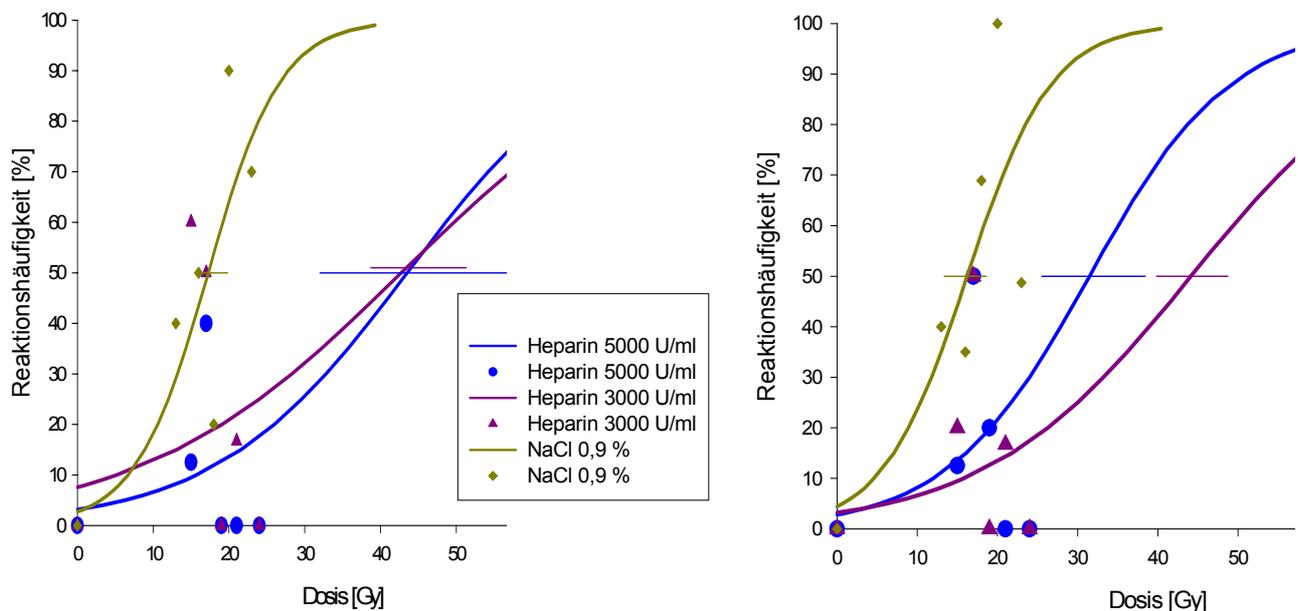


Abbildung 29: Dosis-Effekt-Kurven bei prophylaktischer Behandlung mit Heparin 5000 und 3000 U/ml im Vergleich mit NaCl 0,9 % in der akuten Phase II (A) und in der Spätphase (B)

Sowohl in der akuten Phase II als auch in der Spätphase kommt es bei den mit Heparin behandelten Tieren zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Dosis-Effekt-Kurven. Die Kurven flachen in ihrem Verlauf ab.

Es konnte durch die prophylaktische Behandlung in der akuten Phase II sowohl die Anzahl der Reagenten in der akuten Phase II als auch in der chronischen Phase deutlich reduziert werden. Dies drückt sich statistisch in den erhöhten ED<sub>50</sub>-Werten von  $42,7 \pm 17,1$  Gy bzw.  $43,5 \pm 12,6$  Gy (Heparin 5000 U/ml und Heparin 3000 U/ml) in der akuten Phase II und von  $44,1 \pm 12,9$  Gy bzw.  $31,5 \pm 8,9$  Gy in der Spätphase aus, welche signifikant von denen der Kontrolltiere abweichen (Tabelle 16). So konnte für Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml ein

Dosismodifikationsfaktor von 2,5 für die akuten Phase II und von 2,7 für die Spätphase ermittelt werden. Der Dosismodifikationsfaktor sank bei einer Heparinkonzentration von 3000 U/ml in der Spätphase auf 1,9. Die große Fehlerbreite der ED<sub>50</sub>-Werte der akuten Phase II und der Spätphase beruht auf der geringen Anzahl von Reagenten.

Tabelle 16: ED<sub>50</sub>-Werte bei prophylaktischer Behandlung

Die p-Werte geben die Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber den Werten der Kontrollgruppe an. Damit weichen die Werte der akuten Phase I nicht, dagegen aber die der akuten Phase II und der Spätphase deutlich von der der Kontrolltiere ab. Die Behandlung setzte erst in der akuten Phase II ein.

	ED <sub>50</sub> -Wert [Gy] Akute Phase I	P <sub>AP I</sub> -Wert	ED <sub>50</sub> -Wert [Gy] Akute Phase II	P <sub>AP II</sub> -Wert	ED <sub>50</sub> -Wert [Gy] Spätphase	P <sub>Sp</sub> -Wert
Kontrollversuch	21,2 ± 4,9	-	17,3 ± 4,8	-	16,2 ± 5,9	-
Heparin 5000 U/ml	20,5 ± 6,1	p > 0,05	42,7 ± 17,1	0,0026	44,1 ± 12,9	0,0007
Heparin 3000 U/ml	17,8 ± 3,2	p > 0,05	43,5 ± 12,6	0,0099	31,5 ± 8,9	0,0046

Für die Tiere dieses Versuches ist der Gewichtsverlauf in den folgenden Abbildungen dargestellt. Eine Strahlendosisabhängigkeit wurde nicht gefunden. Die Daten werden deshalb für alle Dosisgruppen zusammengefasst (siehe Abb. 29).

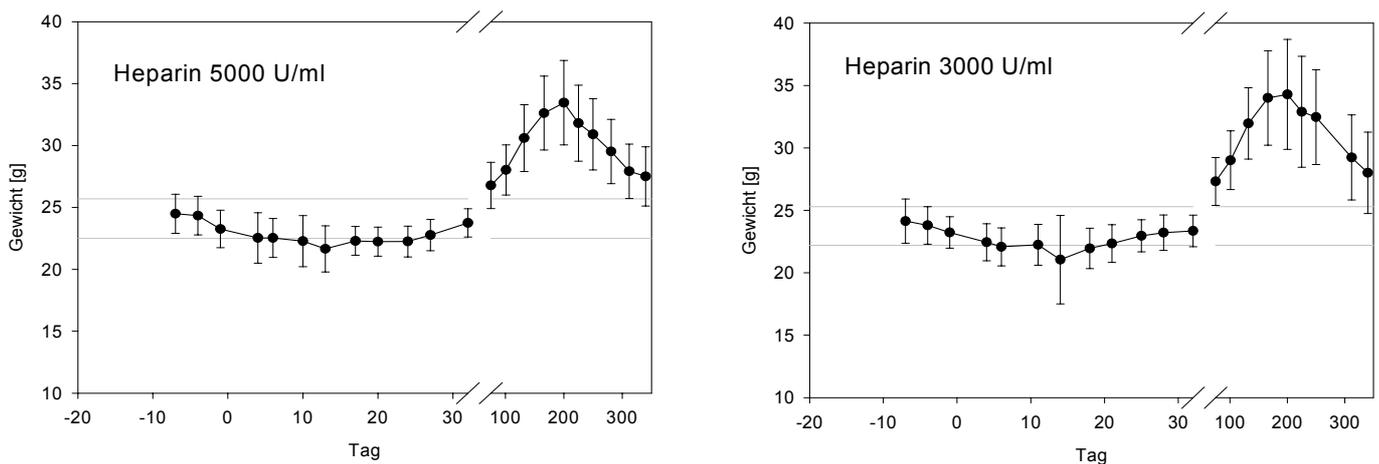


Abbildung 30: Gewichtsverläufe während der akuten und chronischen Phase bei prophylaktischer Behandlung in der akuten Phase II  
Das Band gibt das mittlere Gewicht der Tiergruppe vor Behandlung an.

Eine prophylaktische Behandlung länger als 4 Tage zeigte deutliche Nebenwirkungen in Form von Exsikkose und intraperitonealen Blutungen, die bei 11 von 36 Tieren eine Euthanasie verlangten. Auch bei einer Dosisreduzierung auf 3000 U/ml sind nach viertägiger Behandlung deutliche Nebenwirkungen zu verzeichnen. Exsikkose und intraperitoneale Blutungen machten eine Euthanasie bei 6 von 38 Tieren nötig.

Bei beiden Versuchen lässt sich im Behandlungszeitraum keine deutliche Schwankung des Gewichtes erkennen. Eine Zunahme des Körpergewichtes war zwischen Tag 30 und Tag 200 zu registrieren.

## **4.8 Behandlungsversuche in der chronischen Phase**

Die Tiere dieser Versuche wurden einmalig mit 20 Gy bestrahlt. In den akuten Phasen wurden die Tiere zweimal pro Woche zystometriert. Um festzustellen, ob eine Verringerung der Blasenkapazität in der Spätphase auf weniger als 75 % bzw. 50 % vorlag, wurden sie im Anschluss in zweiwöchigen Abständen gemessen. Im Fall einer entsprechenden Reduktion wurde intravesikal entweder Natriumchloridlösung (Placebogruppe), Heparin oder Pentosanpolysulfat appliziert. An den darauffolgenden 3 Tagen wurden die Tiere zystometriert. War das Blasenvolumen über 50 % bzw. 75 % des individuellen Ausgangswertes, so wurden die Tiere wieder in 14-tägigem Rhythmus gemessen und bei erneuter Verschlechterung bis zu siebenmal wiederholt behandelt. Bei gleichbleibenden Werten oder weiterer Verschlechterung wurden die Tiere nach diesen 7 Behandlungstagen aus dem Versuch genommen.

### **4.8.1 Glykosaminoglykaninstillation bei Reduktion des Blasenvolumens um 25 %**

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind in Tabelle 17 zusammengefasst und in Abb. 31 illustriert.

Tabelle 17: Absolute und relative (bezogen auf den Wert prae instillationem) Blasenkapazitätsänderung nach Instillation von NaCl, Heparin und PPS in der Spätphase  
Die Zahl in Klammern in der 2., 3. und 4. Spalte gibt den p-Wert für den Vergleich mit der Blasenkapazitätsänderung bei NaCl-Anwendung an.

Substanz (Tierzahl)	Blasenkapazität nach		
	24 h	48 h	72 h
	<b>absolut [<math>\mu</math>l] (p gegenüber NaCl)</b>		
<b>NaCl (11)</b>	23,1 $\pm$ 11,0	17,8 $\pm$ 11,6	18,4 $\pm$ 11,0
<b>Heparin 5000 U/ml (14)</b>	20,2 $\pm$ 7,3 (0,828)	29,8 $\pm$ 8,4 (0,409)	34,1 $\pm$ 6,5 (0,231)
<b>Heparin 3000 U/ml (12)</b>	36,0 $\pm$ 8,9 (0,371)	24,5 $\pm$ 9,0 (0,651)	26,5 $\pm$ 8,5 (0,587)
<b>PPS 50 mg/ml (14)</b>	33,3 $\pm$ 8,3 (0,460)	31,0 $\pm$ 9,3 (0,381)	43,3 $\pm$ 12,6 (0,146)
	<b>relativ [%] (p gegenüber NaCl)</b>		
<b>NaCl</b>	37,5 $\pm$ 17,2	29,6 $\pm$ 17,1	31,7 $\pm$ 17,8
<b>Heparin 5000 U/ml</b>	25,3 $\pm$ 10,3 (0,547)	38,5 $\pm$ 11,1 (0,667)	44,2 $\pm$ 8,4 (0,533)
<b>Heparin 3000 U/ml</b>	50,8 $\pm$ 13,8 (0,554)	35,0 $\pm$ 13,3 (0,806)	39,3 $\pm$ 13,8 (0,737)
<b>PPS 50 mg/ml</b>	41,4 $\pm$ 11,0 (0,852)	36,6 $\pm$ 11,2 (0,737)	53,9 $\pm$ 16,1 (0,363)

Bei den mit **Natriumchlorid** behandelten Tieren besteht für das absolute Blasenvolumen ein Trend für einen Anstieg am ersten Tag nach Behandlung (23,1  $\pm$  11,0  $\mu$ l, p = 0,0525). Für die relative Änderung der Blasenkapazität ist dies mit 37,5  $\pm$  17,2 % (p = 0,0458) signifikant. An den Tagen 2 und 3 wurde eine geringere Erhöhung der Blasenspeicherkapazität registriert.

Durch **Heparinbehandlung (5000 U/ml)** wird an allen 3 Tagen eine signifikante (p < 0,01) Erhöhung der Blasenspeicherkapazität im Vergleich zu prätherapeutischen Werten erreicht. Beim Vergleich mit natriumchloridbehandelten Tieren konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden.

An allen 3 Tagen ist eine signifikante (p < 0,01) Blasenvolumenzunahme nach Behandlung mit **Heparin (3000 U/ml)** zu erkennen. Dabei scheint am ersten Tag nach Behandlung die Wirkung am größten zu sein. Verglichen mit der durch NaCl hervorgerufenen Blasenkapazitätssteigerung ist diese jedoch an keinem der 3 Tage signifikant.

Obwohl bei den mit **PPS-Lösung (50 mg/ml)** behandelten Tieren an allen 3 Tagen eine signifikante Steigerung (p < 0,001) des Blasenvolumens gegenüber prätherapeutischen Werten zu erkennen ist, ist auch hier keine signifikante Abweichung zu den natriumchloridbehandelten Tieren vorhanden.

In allen Behandlungsgruppen finden sich 14 Tage nach Behandlung Blasenvolumina, die den Ausgangswerten vor NaCl- bzw. Glykosaminoglykanbehandlung entsprechen. Eine bleibende Wirkung der Applikation wird somit nicht erreicht.

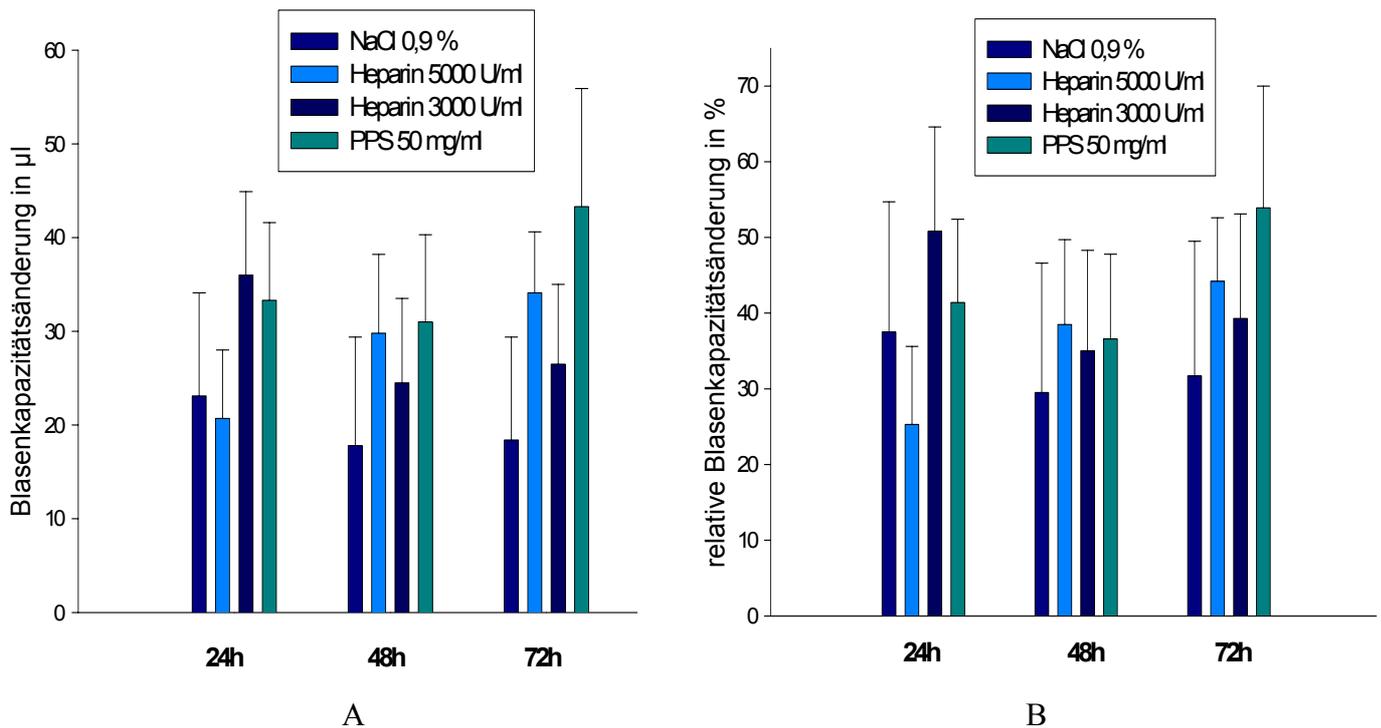


Abbildung 31: Absolute (A) und relative (B) Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung in der Spätphase bei einer Reduktion des Blasenvolumens um 25 %  
 Die Säulen repräsentieren die Blasenkapazitätszunahme in µl bzw. % mit ihrer Standardabweichung. Die Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber den Werten vor Behandlung ist stets < 0,01. Es ist bei jeder Behandlung sowohl 24, 48 als auch 72 h danach eine Erhöhung der Blasen-speicherkapazität zu erkennen. Gegenüber der NaCl-Behandlung ist keine signifikante Erhöhung der Blasen-speicherkapazität festzustellen.

In Abbildung 31 ist die Erhöhung der Blasen-speicherkapazität 24, 48 und 72 h nach Behandlung mit Natriumchlorid, Heparin 3000 U/ml sowie 5000 U/ml und PPS (50mg/ml) graphisch dargestellt.

#### 4.8.2 Behandlung bei einer chronischen Reduktion des Blasenvolumens um 50 %

Nach Behandlung mit **Natriumchlorid** steigt am ersten Tag das Blasen-volumen signifikant um  $23,9 \pm 7,9 \mu\text{l}$  ( $p = 0,016$ ) bzw. um  $23,1 \pm 11,0 \%$  ( $p = 0,0467$ ) an. Am zweiten und dritten Tag ist keine signifikante Wirkung nachzuweisen.

Die Ergebnisse sind in Abb. 32 graphisch dargestellt. Tab. 18 fasst die Werte zusammen.

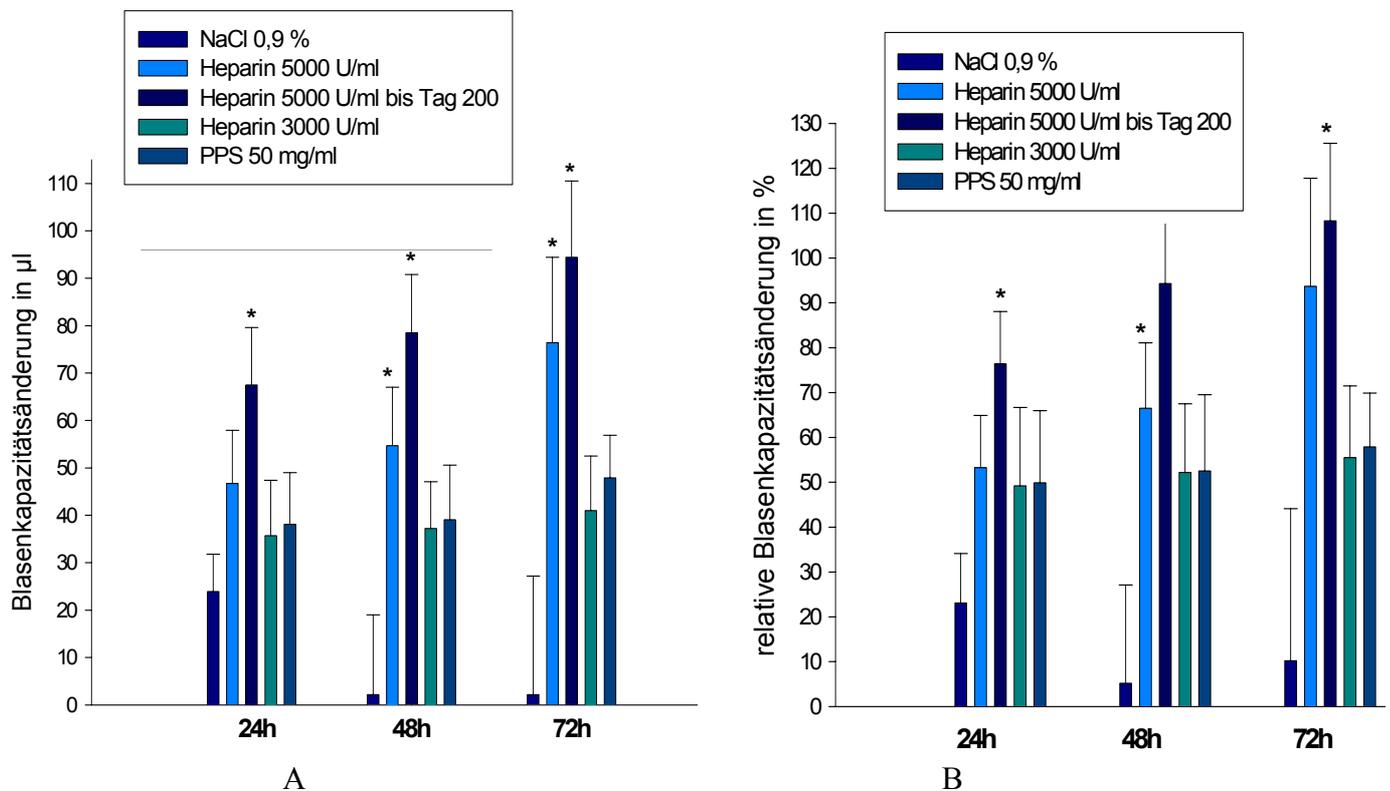


Abbildung 32: Absolute (A) und relative (B) Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung in der Spätphase bei einer Reduktion des Blasenvolumens um 50 %  
 Die Säulen repräsentieren die Blasenkapazitätszunahme in µl bzw. % mit ihrer Standardabweichung. Die Irrtumswahrscheinlichkeit gegenüber den Werten vor Behandlung ist stets < 0,01. Sowohl 24, 48 als auch 72 h nach jeder Behandlung ist eine Erhöhung der Blasen volumina zu sehen, bei NaCl-Anwendung ist diese allerdings nach 48 und 72 h niedriger als bei Heparin- oder PPS-Instillation. Eine Signifikanz gegenüber NaCl (\*) ist jedoch nur bei Heparin 5000 U/ml feststellbar.

Tabelle 18: Absolute und relative (bezogen auf den Wert prae instillationem) Blasenkapazitätsänderung nach Instillation von NaCl, Heparin und PPS in der Spätphase  
 Die Zahl in Klammern in der 2., 3. und 4. Spalte gibt den p-Wert für den Vergleich mit der Blasenkapazitätsänderung bei NaCl-Anwendung an.

Substanz (Tierzahl)	Blasenkapazität nach		
	24 h	48 h	72 h
	<b>absolut [µl] (p gegenüber NaCl)</b>		
<b>NaCl (9)</b>	23,9 ± 7,8	2,2 ± 16,8	2,2 ± 25,0
<b>Heparin 5000 U/ml (8)</b>	46,7 ± 11,2 (0,110)	54,7 ± 12,3 (0,023)	76,4 ± 18,0 (0,029)

<b>Heparin 3000 U/ml (10)</b>	35,7 ± 11,7 (0,409)	37,1 ± 9,9 (0,095)	41,0 ± 11,5 (0,186)
<b>PPS 50 mg/ml (12)</b>	38,1 ± 10,9 (0,300)	39,1 ± 11,5 (0,090)	47,9 ± 9,0 (0,116)
	<b>relativ [%] (p gegenüber NaCl)</b>		
<b>NaCl</b>	32,8 ± 13,9	5,2 ± 21,9	10,2 ± 33,9
<b>Heparin 5000 U/ml</b>	53,3 ± 11,6 (0,273)	66,5 ± 14,6 (0,034)	93,7 ± 24,1 (0,062)
<b>Heparin 3000 U/ml</b>	49,2 ± 17,5 (0,468)	52,2 ± 15,3 (0,097)	55,5 ± 16,0 (0,251)
<b>PPS 50 mg/ml</b>	49,9 ± 16,1 (0,429)	52,5 ± 17,0 (0,106)	57,9 ± 12,0 (0,215)

Durch **Heparinbehandlung (5000 U/ml)** wird eine signifikante Erhöhung der Blasen-speicher-kapazität erzielt. Im Vergleich mit den Ergebnissen der natriumchloridbehandelten Gruppe ergibt sich am 2. Behandlungstag eine signifikante Verbesserung der Blasen-speicher-kapazität für die absoluten wie auch für die relativen Werte ( $p = 0,0229$  bzw.  $0,0344$ ). Am 3. Behandlungstag ist die Änderung in dieser Gruppe bezogen auf die absoluten Werte ebenso signifikant mit  $p = 0,0287$ , während sie bezogen auf die relative Änderung mit  $p = 0,0624$  nur noch einen Trend darstellt.

Da nach Tag 200 behandelte Reagenten regelmäßig in ihrer Blasenkapazität wieder absanken, wurden in einer weiteren Analyse alle Tiere, die erst nach Tag 200 behandelt wurden, nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 31 integriert. Eine signifikante Erhöhung des Blasen-volumens ist nun an allen 3 Tagen nach Behandlung sowohl bei den absoluten als auch bei den relativen Werten zu verzeichnen ( $p$  zwischen  $0,005$  und  $0,0455$ ).

Auch für die Behandlung mit **3000 U/ml Heparin** ist eine signifikante, progressive Zunahme des Blasen-volumens zu erkennen. Im Vergleich zu den natriumchloridbehandelten Tieren lässt sich jedoch an keinem der drei Tage eine signifikante Blasenkapazitätsveränderung feststellen. Auch beim Ausschluss aller ab Tag 200 gewonnenen Werte sind keine signifikanten Unterschiede zu placebobehandelten Tieren vorhanden.

Bei Behandlung mit **PPS (50 mg/ml)** ließ sich an allen Tagen nach Behandlung eine signifikante Erhöhung der Blasen-speicher-kapazität gegenüber dem Wert vor Behandlung erkennen. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der natriumchloridbehandelten Tiere ( $p$ -Werte siehe Tab. 17), so ist keine signifikante Abweichung zu finden.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Einleitung**

Ein limitierender Faktor in der Strahlentherapie im Beckenbereich sind Nebenwirkungen an der Harnblase. Strahlenfolgen an diesem Organ treten als akute und späte Funktionsstörungen auf. Die akute Reaktion ist im Gegensatz zur Spätreaktion reversibel und manifestiert sich bei der Maus nach Einzeitbestrahlung innerhalb der ersten 30 Tage. Sie äußert sich, wie auch die chronische Reaktion, in Polyurie, Dysurie, Nokturie sowie Strangurie, bedingt durch eine Einschränkung der Speicherkapazität. Eine Beeinflussung könnte die Lebensqualität deutlich erhöhen. In der Tiermedizin betrifft dies u. a. die Belastung der Besitzer durch das häufige

Miktionsverlangen der Tiere. Jedoch ist auch eine erhöhte Infektionsanfälligkeit durch die Strahlenreaktion zu bedenken. Eine effektive Intervention setzt jedoch genaue Kenntnisse der pathogenetischen Abläufe, die letztendlich zum klinischen Bild führen, voraus. Diese sind derzeit aber weder für die akute noch für die chronische Strahlenreaktion im Detail bekannt. Es existieren experimentelle Hinweise, dass sowohl Prostaglandine als auch Glykosaminoglykane an der Pathogenese der akuten Funktionsstörungen beteiligt sind. Eine Zelledepletion wird nicht gefunden. In experimentellen Untersuchungen ist durch systemische Applikation von Acetylsalicylsäure (ASS) eine Beeinflussung der akuten Reaktion möglich (DÖRR et al. 1997, 1998, WIEGEL et al. 2000). Eine Beteiligung von Glykosaminoglykanen ergibt sich auch aus der erfolgreichen Behandlung mit PPS (per os) nach Beckenbestrahlung (PARSONS 1986). Eine sekundäre Beteiligung von Prostaglandinen nach einer primären Beeinträchtigung der Glykosaminoglykanschicht als Bestandteil der urothelialen Barriere ist möglich.

Die vorliegenden Untersuchungen dienen der Pathogenesefindung der späten Reaktion über Beeinflussung dieser durch lokale Applikation von Glykosaminoglykanen zu verschiedenen Zeitpunkten und der darauf folgenden Kapazitätsänderung der Harnblase.

## **5.2 Experimentelles Modell**

### **5.2.1 Zystometrie**

Die vorliegenden Untersuchungen zu funktionellen Strahlenfolgen an der Harnblase wurden mittels transurethraler Zystometrie durchgeführt. Diese minimal invasive Methode ermöglicht eine zuverlässige und präzise Beurteilung der Blasenspeicherkapazität. Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit zur Erfassung von Veränderungen im zeitlichen Verlauf durch wiederholte Messungen am gleichen Tier.

Während jeder Zystometrie wird eine Druck-Volumen-Kurve erstellt, die stets aus zwei Abschnitten besteht. Der erste flache Abschnitt, welcher nach Bestrahlung verkürzt ist, sich aber in seiner Steilheit nicht ändert, charakterisiert die nahezu isotonische Füllung der Harnblase. Auch der zweite, steile Abschnitt der Kurve bleibt in seiner Steigung von der Bestrahlung unbeeinflusst. Deshalb lässt sich die Verkürzung des Anfangsteils der Kurve durch das Volumen bei einem bestimmten Druck gut quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde V10 (V bei 10 mm Hg) zur Definition der Harnblasenfunktion gewählt. Als positive Strahlenreaktion wurde

eine Verringerung des individuellen Blasenvolumens um mindestens 50% des V10-Mittelwertes vor Bestrahlung definiert. In früheren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass eine Reduktion in diesem Ausmaß die Schwankungsbreite zwischen den Messungen übersteigt und eindeutig auf die Bestrahlung zurückgeführt werden kann (DÖRR 1992, DÖRR und SCHULTZ-HEKTOR 1992).

### **5.2.2 Zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion**

Die vorliegenden Ergebnisse zum zeitlichen Verlauf der Strahlenreaktion decken sich im Wesentlichen mit früheren Untersuchungen an diesem Tiermodell. Die Strahlenreaktion lässt sich in eine akute und eine chronische Phase einteilen. Untersuchungen von LUNDBECK et al. (1989, 1989), DÖRR und SCHULTZ-HEKTOR (1992), DÖRR (1995) und von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) grenzen die akute Phase auf 30 Tage nach Bestrahlung ein, da nach 30 Tagen keine neuen Reagenten registriert wurden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen traten vereinzelt Reagenten bis Tag 32 auf. Möglicherweise zeigten diese schon am Tag 30 eine Reaktion.

Nach neueren Untersuchungen von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) besteht die akute Phase aus zwei Wellen. Eine solche Aufteilung ließ sich im vorliegenden Versuch mit ausschließlich bestrahlten Tieren ebenfalls erkennen, ist jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Dies ist auf die geringe Zahl an Reagenten (26) zurückzuführen. Deshalb wird in der weiteren Analyse auf die Ergebnisse von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) zurückgegriffen.

Die chronische Phase schließt sich nach einer dosisabhängigen Latenz an die akute Phase an und ist im Gegensatz zur akuten, reversiblen Blasenreaktion durch ihren progressiven Verlauf gekennzeichnet. Während LUNDBECK et al. (1983) noch bis Tag 401 neue Reagenten in der chronischen Phase ermittelten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nur bis Tag 281 neue Reagenten registriert. Bei Untersuchungen von DÖRR und KRAFT (1997) wurden letzte Reagenten am Tag 250 identifiziert. Die vorliegenden Daten zur Latenzzeit passen sich in die Ergebnisse einer detaillierten Latenzanalyse von DÖRR und BENTZEN (1999) ein.

### **5.2.3 Dosisabhängigkeit**

Für die beiden Wellen der akuten Blasenreaktion war die Anzahl an Reagenten dosisabhängig. So ergab sich für die erste akute Phase ein ED<sub>50</sub>-Wert von  $21,1 \pm 3,7$  Gy für die zweite akute

Phase von  $19,5 \pm 3,7$  Gy. Dies entspricht den Ergebnissen von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) mit ED<sub>50</sub>-Werten von  $21,7 \pm 4,1$  Gy und  $19,3 \pm 3,9$  Gy.

Die Latenzzeiten für die akute Phase I und II zeigten keine Abhängigkeit von der applizierten Dosis. Reagiert ein Tier in der akuten Phase I, so ist die Wahrscheinlichkeit, in der akuten Phase II zu reagieren, gegenüber einem Nichtreagenten in Phase I erhöht. Dasselbe gilt für eine Reaktion in der chronischen Phase, wenn das betreffende Tier in der akuten Phase II reagiert hat. Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999).

Für die späte Strahlenreaktion wurde ebenfalls eine klare Dosisabhängigkeit festgestellt. Der ED<sub>50</sub>-Wert für die späte Strahlenreaktion wurde mit  $16,2 \pm 5,3$  Gy ermittelt. Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) mit  $18,7 \pm 2,4$  Gy. STEWART et al. (1978) ermittelten mittels Messung der Miktionsfrequenz einen ED<sub>50</sub>-Wert von 20 Gy. LUNDBECK et al. (1989) bestimmten bei einem Beobachtungszeitraum von 300 Tagen den ED<sub>50</sub>-Wert der Spätphase mit  $10 \pm 2$  Gy. Zu beachten ist bei diesem Vergleich aber zum einen, dass in diesen Untersuchungen nur eine Kontrollmessung vorlag und dass zum anderen die Tageszeit der Messung nicht berücksichtigt wurde. Außerdem könnten Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Mäusestämme vorliegen. Ergebnisse der Lundbeck-Daten ergaben bei detaillierter Analyse von Bentzen, dass der ED<sub>50</sub>-Wert der Spätphase bei 15 Gy (einem Diagramm entnommen) liegt und eine signifikante nicht lineare Abhängigkeit der Latenzzeit der Spätphase von der Dosis besteht.

Die Latenzzeit der chronischen Phase ist dosisabhängig. Je größer die applizierte Dosis, desto kleiner ist die Latenz. Diese Ergebnisse decken sich ebenfalls mit Untersuchungen von DÖRR und BENTZEN (1999).

### **5.3 Überlegungen zur Pathogenese der akuten Strahlenreaktion**

In früheren Untersuchungen konnten im kleinen Rahmen die akuten Strahlenreaktion der Harnblase Zelldepletionen nicht nachgewiesen werden (DÖRR et al.1998). Untersuchungen von DÖRR et al. (1997, 1998) zeigen, dass Prostaglandine an der Pathogenese der akuten Strahlenreaktion beteiligt sind. Sowohl in der akuten Phase I als auch in der akuten Phase II konnte eine signifikante Erhöhung der Blasenspeicherkapazität 24 Stunden nach intravesikaler Gabe eines Prostaglandinsynthesehemmers (Acetylsalicylsäure) nachgewiesen werden. Allerdings wurde

kein Effekt von länger als 48 bzw. 72 Stunden erzielt. Auch konnte in diesen Untersuchungen nicht geklärt werden, ob die erhöhte Prostaglandinsynthese primär oder aber sekundär, z. B. nach einer Barrierestörung der Urothels mit folgender Gewebsirritation durch Urinkontakt, auftritt.

Ein wesentlicher Bestandteil der urothelialen Barriere sind Glykosaminoglykane auf der Oberfläche der superfiziellen Urothelzellen, die durch ihre negative Ladung zur Ausbildung einer monomolekularen Wasserschicht führen. Diese verhindert den direkten Kontakt des hyperosmolaren Harns mit dem Urothel.

Hinweise, dass eine Störung der Barriere an der Pathogenese der akuten Strahlenfolgen an der Harnblase beteiligt ist, ergeben sich aus mehreren Untersuchungen. PARSONS (1986) konnte durch orale Gabe von PPS, einem Glykosaminoglykan, bei fünf Patienten die akute Strahlenreaktion vermindern. Dies könnte auf eine Restauration der Glykosaminoglykanschicht zurückzuführen sein. In späteren Versuchen (PARSONS et al. 1998) wurde bei freiwilligen Probanden die Glykosaminoglykanschicht auf chemischem Weg (Protaminsulfat) zerstört. Dies führte zu Symptomen ähnlich der akuten Strahlenreaktion oder der interstitiellen Zystitis, welche nach topischer Gabe von Heparin wieder aufgehoben werden konnten. Dies wird auf die Restauration der Glykosaminoglykanschicht zurückgeführt.

Untersuchungen von ECKHARDT et al. (1997, 1998) konnten im Tiermodell nach Bestrahlung systematische Veränderungen der Proteinexpression im Urothel nachweisen. Diese deuten auf eine urotheliale Funktionstörung hin, die auch die Barrierefunktion betreffen kann.

Ein direkter Nachweis der Störung der Glykosaminoglykanschicht gestaltet sich schwierig. Auch in der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist die Darstellung der sehr dünnen Lage von Glykosaminoglykanen auf der Plasmamembran schwierig; fokale Störungen der Glykosaminoglykanschicht können übersehen werden (ECKHARDT et al. 1998). Zum Nachweis mittels Farbstoffpenetration ist die Menge penetrierten Farbstoffes aufgrund der geringen Größe der Blase nicht ausreichend genug, um mittels Photometer registriert werden zu können (ECKHARDT et al. 1998). Eine Möglichkeit, Defekte der Glukosaminoglykanschicht bei der Maus direkt darstellen zu können, fehlt somit bis heute.

Zum indirekten Nachweis einer Störung der Glykosaminoglykanschicht wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung einer lokalen intravesikalen Behandlung mit Glykosaminoglykanen (Heparin, PPS) getestet. Als Applikationsform erschien die intravesikale Gabe geeignet, da hier eine direkte Interaktion mit dem Urothel ohne störende metabolische Einflüsse

möglich ist. Die Konzentration der Glykosaminoglykane wurde auf Grund mangelnder Vorkenntnisse an der Anwendung bei thrombotischen Erkrankungen orientiert. Da es in einem Vorversuch mit Pentosanpolysulfat (100 mg/ml) zu toxischen Nebenerscheinungen (Blutungen, plötzliche Todesfälle ohne nachgewiesene Ursache) kam (DÖRR und NOACK, persönliche Mitteilung), wurde die Dosis auf 76,9 mg/ml reduziert.

## **5.4 Beeinflussung der Blasenfunktion durch die Eigenschaften der instillierten Lösung**

Bereits 1985 stellten HOHLBRUGGER und LENTSCH fest, dass Hyperosmolarität, eine erhöhte  $K^+$ -Konzentration sowie ein pH von 5 das Blasenspeichervolumen verringern, während Hypo-osmolarität, elektrolytfreie Medien und ein pH von 8 das Speichervolumen erhöhen. In der vorliegenden Arbeit lag der pH-Wert der instillierten Flüssigkeiten im neutralen bis schwach sauren Bereich (pH 7 – 6,5), die Lösungen waren normosmolar. Zudem waren die Lösungen kaliumfrei. Ein Einfluss der Lösungen selbst auf die Blasenfunktion ist hier somit nicht zu erwarten.

## **5.5 Beeinflussung der akuten Strahlenreaktion**

### **5.5.1 Natriumchloridinstillation**

Die intravesikale Instillation von Natriumchloridlösung in einer Konzentration von 0,9 % führt in der akuten Phase in beiden Wellen nach 24 h zur Erhöhung der Blasenspeicherkapazität um ca. 11 %. Nach 48 h und 72 h ist die Blasenkapazität jedoch gegenüber dem Wert vor der Instillation erniedrigt. Der Grund für die kurzzeitige Erhöhung des Blasenvolumens ist unbekannt. Möglich wäre ein „Trainingseffekt“ der Blasenwand durch die iatrogene Dehnung. Eine Instillation in der chronischen Phase bewirkt ebenfalls nach 24 h einen Anstieg des Blasenvolumens, was ebenfalls einen Dehnungseffekt darstellen kann. Auch hier nimmt nach 48 und 72 h die Blasenkapazität wieder deutlich ab, sinkt allerdings nicht unter den Ausgangswert.

### **5.5.2 Glykosaminoglykaninstillation**

Berichte zur Wirksamkeit einer lokalen Glykosaminoglykan-Applikation im Rahmen der Strahlenreaktion der Harnblase liegen in der Literatur nicht vor. In der vorliegenden Arbeit

fürte die intravesikale Behandlung mit Heparinlösung in einer Konzentration von 5000 U/ml bzw. 3000 U/ml beim Vorliegen einer manifesten akuten Strahlenreaktion in beiden Wellen nach 48 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der Blasen-speicherkapazität. Nach 24 Stunden ist in der 2. Welle eine signifikante Erhöhung nur bei 5000 U/ml und nur gegenüber unbehandelten Tieren, jedoch nicht gegenüber natriumchloridbehandelten Tieren festzustellen.

Bei Verwendung des synthetischen Glykosaminoglykans PPS in einer Konzentration von 76,9 mg/ml war nach 24 Stunden in der akuten Phase II und nach 48 Stunden sowohl in Phase I als auch in Phase II eine signifikante Erhöhung der Blasen-speicherkapazität zu beobachten.

Im Vergleich der Glykosaminoglykane untereinander ist die größte Wirkung durch PPS zu verzeichnen: über einen Zeitraum von 48 Stunden wird eine Erhöhung von 35 – 45 % beobachtet. Dies gilt für beide akute Wellen. Heparin bewirkt dagegen nur in einer Konzentration von 5000 U/ml eine Verbesserung der Blasen-funktion nach 48 h, die 30 - 50 % beträgt. Bei Heparin in einer Konzentration von 3000 U/ml beträgt diese Erhöhung nur 12 – 20 %. Während die Blasenkapazitätserhöhung bei PPS auch nach 72 h unverändert anhält, nimmt sie bei Heparinbehandlung in diesem Zeitraum bereits wieder ab.

### **5.5.3 Schlussfolgerungen zur Pathogenese der akuten Strahlenreaktion der Harnblase**

Die Glykosaminoglykanschicht stellt die oberflächlichste Struktur der urothelialen Barriere dar. Die vorliegenden Versuche hatten zum Ziel, die Beteiligung der Glykosaminoglykanschicht an der akuten Strahlenreaktion der Harnblase indirekt nachzuweisen. Extern zugeführte Glykosaminoglykane sollten zur Restauration der Glykosaminoglykanschicht eingesetzt werden. Ausgangspunkt für diesen Versuch war die Behebung einer Barrierestörung nach Zerstörung der Glykosaminoglykanschicht durch PARSONS et al. (1988) nach Protaminsulfat-Applikation. Eine Wirksamkeit der Glykosaminoglykaninstillation nach Bestrahlung kann somit als positiver Nachweis der Barrierestörung betrachtet werden.

Da durch lokal zugeführte Glykosaminoglykane die höchsten Konzentrationen unmittelbar an der Glykosaminoglykanschicht zu erwarten sind, bot sich eine intravesikale Instillation über einen Harnkatheter an. Somit konnte die gesamte Urotheloberfläche benetzt werden.

In den vorliegenden Versuchen wurde die maximale Wirksamkeit der Glykosaminoglykaninstillation erst nach 48 h beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Barrierestörung den Blasentonus nur indirekt beeinflusst. Möglicherweise wird sekundär der Prostaglandinspiegel erhöht, was in der Konsequenz zu Funktionsstörungen führt. Hinweise hierauf ergeben sich aus der Modifikation der akuten Strahlenreaktion durch ASS (DÖRR et al. 1997, 1998, EHME 1998).

Die bevorzugte Wirksamkeit der Glykosaminoglykane in der zweiten akuten Welle deutet an, dass möglicherweise in der ersten akuten Welle auch eine direkte strahleninduzierte Prostaglandinfreisetzung aus Uro- oder Endothel beteiligt ist.

## **5.6 Beeinflussung der chronischen Strahlenreaktion**

Der vorliegenden Arbeit vergleichbare Untersuchungen zur Beeinflussung der chronischen Strahlenreaktion durch Glykosaminoglykanapplikation aus der Literatur sind nicht bekannt.

### **5.6.1 Beeinflussung der Spätreaktion durch Behandlung der manifesten akuten Reaktion in Phase II**

Veröffentlichungen von DÖRR und BECK-BORNHOLDT (1999) und DÖRR und BENTZEN (1999) weisen darauf hin, dass die akute Reaktion in der Phase II für die Entwicklung einer Spätreaktion von besonderer Bedeutung ist. Sollte dies zutreffen, so müsste durch eine Verringerung der Akutreaktion in Phase II, beispielsweise durch intravesikale Behandlung mit Glykosaminoglykanen, eine verringerte Reaktionshäufigkeit in der Spätphase bewirkt werden. Dies konnte in der vorliegende Arbeit bestätigt werden. Die Behandlung der akuten Reaktion in Phase II führt zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der DEK, was durch die Erhöhung der ED<sub>50</sub>-Werte für die Spätphase quantitativ illustriert wird (Abb. 28).

Die größte Anhebung des ED<sub>50</sub>-Wertes ist durch Heparin 5000 U/ml (Dosismodifikationsfaktor: 1,55) zu erreichen. Ein signifikanter Unterschied zu Heparin 3000 U/ml (Dosis-modifikationsfaktor: 1,3) besteht jedoch nicht. Im Gegensatz dazu steigt zwar bei PPS-Behandlung in der akuten Phase II die Blasenkapazität sofort an, aber die Reaktionshäufigkeit in der Spätphase kann nicht gesenkt werden. Möglicherweise kann PPS im Gegensatz zu Heparin die Barriere nicht mit der gleichen Wirksamkeit restaurieren.

## **5.6.2 Auswirkungen der prophylaktischen Behandlung in der akuten Phase II auf die Spätphase**

Eine prophylaktische Behandlung während der gesamten akuten Phase II, d. h. von Tag 13 – 30, unabhängig von einer manifesten Strahlenreaktion, führt in der Spätphase zu einem signifikanten Anstieg der ED<sub>50</sub>-Werte. Die DMF's betragen 2,7 für Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml und 1,9 für Heparin in einer Konzentration von 3000 U/ml. Zwischen den beiden Konzentrationen des Heparins besteht hinsichtlich der Wirksamkeit kein signifikanter Unterschied.

Durch dieses Ergebnis wurde somit der Nachweis für die starke konsekutive Komponente der späten Strahlenfolgen an der Harnblase erbracht.

## **5.6.3 Behandlung der chronischen Strahlenreaktion**

Am ersten Tag nach der Behandlung konnte sowohl durch Natriumchlorid als auch durch Glykosaminoglykaninstillation gegenüber unbehandelten Tieren eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) der Blasen-speicherkapazität erreicht werden. Dies ist mit einem „Trainingseffekt“ infolge der Dehnung zu erklären. An den Folgetagen ist nach Natriumchloridinstillation bei einer Blasenkapazität  $\leq 50$  % keine signifikante Blasenkapazitätserhöhung gegenüber dem Ausgangswert zu erkennen. War die Blasenkapazität erst um 25 % gesunken, so konnte auch am 2. und 3. Tag noch eine Erhöhung des Blasenvolumens registriert werden, welche jedoch niedriger als am 1. Tag war. Nach intravesikaler Gabe von Glykosaminoglykanen ist sowohl bei Behandlung bei einem Blasenvolumen von 50 % als auch von 75 % des Ausgangsvolumens, eine signifikante Erhöhung der Speicherkapazität an allen 3 Tagen gegenüber dem Ausgangswert vor Instillation zu registrieren. Vergleicht man jedoch die durch Glykosaminoglykane hervorgerufene Erhöhung der Blasen-speicherkapazität mit derjenigen durch Natriumchloridlösung, so lässt sich nur bei Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml ein signifikanter Unterschied nachweisen. Am zweiten und dritten Tag nach Instillation lässt sich bei einer Blasenkapazität  $< 50$  % eine signifikante Zunahme erkennen. Eine länger anhaltende Verbesserung der Blasen-speicher-kapazität konnte nicht erreicht werden.

#### **5.6.4 Pathogenese der Spätreaktion**

Die Pathogenese der funktionellen Spätfolgen der Harnblase ist bisher nicht geklärt. Histologische Untersuchungen (KRAFT 1996, KRAFT et al. 1996) zeigen eine Beteiligung des Urothels: Neben fokaler Hyperplasie liegen Bereiche mit signifikanter Zelldepletion vor. Diese korrelieren im einzelnen Tier mit den Funktionsstörungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein wesentlicher Einflussfaktor der Spätreaktion bereits im Rahmen der Akutreaktion, bevorzugt in der Phase II, liegt. Ein plausibler Mechanismus ist, dass durch die Barrierestörung infolge Glykosaminoglykanveränderungen Zellveränderungen, möglicherweise ausgelöst durch Urinkontakt, induziert werden. Diese manifestieren sich in der akuten Phase selbst in Veränderungen der Proteinexpression (ECKHARDT 1997). Offensichtlich wirken diese Veränderungen aber erst nach einer relativ langen Latenzzeit zytoletal, was zu den oben genannten Zelldepletionen und regenerativen Hyperproliferationen führt. Es ist anzunehmen, dass akut sowohl primär als auch sekundär nach Glykosaminoglykan- und damit Barrierestörung eine erhöhte Prostaglandinsynthese bzw.-änderung des PG-Musters vorliegt, was zu der Funktionseinschränkung der Harnblase führt. Eine funktionelle Störung der Glykosaminoglykanschicht scheint auch in der Spätphase zu existieren, da Instillationen von Glykosaminoglykanen in dieser Zeit kurzfristig zur Erhöhung der Speicherkapazität führen. Jedoch sind diese Störungen im Gegensatz zur Akutphase durch Instillation von Glykosaminoglykanen nur kurzfristig und nur in hohen Konzentrationen zu beheben.

Aufgrund der gezeigten Nebenwirkungen (Exsikkose, intraperitoneale Blutungen) muss mit einer Resorption des Arzneimittels beim Einsatz an der Blase mit gestörter Barriere gerechnet werden. Die Bestimmung der Blutgerinnung nach Applikation könnte über die Art und den Umfang der Resorption Aufschluss geben.

#### **5.7 Ausblick**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Störung der urothelialen Glykosaminoglykanschicht im Sinne einer Barrierestörung an der Pathogenese der akuten und auch der späten Strahlenreaktion beteiligt ist. Durch intravesikale Applikation von Glykosaminoglykanen können beide Reaktionsphasen signifikant moduliert werden.

Allerdings ist diese Modulation mit deutlichen Nebenwirkungen verbunden, so dass für einen eventuellen Einsatz in der Radioonkologie nach anderen Glykosaminoglykanen (z. B. Hyaluronsäure oder Chondrotinsulfat) gesucht werden muss. Auch birgt die intravesikale Applikation nicht unerhebliche Risiken, so dass bei Prüfung dieser Stoffe besonderes Augenmerk einer evtl. systemischen Applikation gewidmet werden sollte. Eine systemische Applikation erscheint aufgrund positiver Erfolge von PARSONS (1986) und LOSE et al. (1985) durchaus denkbar, auch wenn die Gefahr von Blutgerinnungsstörungen (speziell bei Heparin und PPS) besteht.

Auch eine systematische Aufklärung der intra- und interzellulären Veränderungen im Gewebe der Blasenwand, die sich nach Bestrahlung in Änderungen der Proteinexpression und letztendlich auch in einer Störung der Glykosaminoglykanschicht äußern, kann ein gezieltes Eingreifen ermöglichen.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit die Abklärung der pathogenen Grundlagen der Strahlenreaktion der Harnblase vorantreiben. Auch ein Nachweis der konsekutiven Spätfolgen wurde erbracht. Gezielte therapeutische Implikationen ergeben sich jedoch aus den genannten Gründen derzeit nicht.

## **6 Zusammenfassung**

**Beeinflussung der chronischen Strahlenreaktion der Harnblase (Maus) durch intravesikale Applikation von Glykosaminoglykanen**

**Doreen Krumsdorf**

**Klinik und Poliklinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig**

**und der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden**

**Dezember 2002**

88 Seiten, 32 Abbildungen, 18 Tabellen, 130 Literaturangaben, Anhang

Die Bestrahlung von Tumoren im Beckenbereich führen regelmäßig zu Nebenwirkungen an der Harnblase. Vor allem chronische Komplikationen sind ein dosislimitierender Faktor der Strahlentherapie. Grundlage für eine gezielte Behandlung der Strahlenreaktion der Harnblase sind detaillierte Kenntnisse der Pathogenese der Strahlenreaktion.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Modifikation der akuten und späten Harnblasenreaktion durch Instillation von Glykosaminoglykanen zu untersuchen. Als Tiermodell wurden Mäuse verwendet. Die Quantifizierung der Blasenfunktion erfolgte mittels transurethraler Zystotonometrie. Hierzu wurde die Blase mittels einer Infusionspumpe (Rate 0,1 ml/min) über einen Katheter (0,6 mm Außendurchmesser) mit Natriumchloridlösung gefüllt und die sich ergebenden Druck-Volumen-Kurven dokumentiert. Das Blasenvolumen bei einem Druck von 10 mm Hg wurde als Maß für die Blasenfunktion herangezogen. Durch wiederholte Messungen

beim einzelnen Tier konnte die individuelle Reaktion auf die Bestrahlung und auf die Glykosaminoglykanbehandlung im zeitlichen Verlauf dargestellt werden.

Die Bestrahlung erfolgte als Einzeitbestrahlung. Zur Erfassung der Strahlenreaktion nach alleiniger Bestrahlung wurden die Tiere mit gestaffelten Dosen von 13 bis 23 Gy bestrahlt. Für die Glykosaminoglykanwirksamkeitsuntersuchungen bei Gabe in der akuten Phase sowie in der Spätphase wurde eine Einzeitbestrahlung mit 20 Gy gewählt. In einem weiteren Versuchsarm wurde die Auswirkung einer intravesikalen Applikation von Glykosaminoglykanen in der Akutphase bei positiver Reaktion bzw. prophylaktisch in einem Zeitraum von 13 – 30 Tagen nach Bestrahlung mit gestaffelten Dosen zwischen 15 und 24 Gy getestet, um vollständige DEK zu gewinnen.

Als positive Strahlenreaktion wurde eine Reduktion der Blasen-speicherkapazität auf  $\geq 50\%$  des individuellen Ausgangsvolumens definiert. Die Strahlenreaktion in der akuten Phase verläuft in zwei Wellen. Die erste akute Phase dauert von Tag 1 - 15, die zweite von Tag 16 - 30. Die Höhepunkte beider Wellen liegen um die Tage 7 und 24. Die mittlere Latenzzeit für die Spätphase beträgt ca. 180 Tage. Die ED<sub>50</sub>-Werte (Dosis, bei der bei 50 % der Tiere eine Strahlenreaktion erwartet wird) betragen für die akute Phase I  $21,1 \pm 3,7$  Gy, für die akute Phase II  $19,5 \pm 3,7$  Gy und für die Spätphase  $16,2 \pm 5,3$  Gy.

Durch intravesikale Applikation von Glykosaminoglykanen konnte die Strahlenreaktion der Harnblase gemindert werden. Bei Verwendung von Heparin (5000 U/ml, 3000 U/ml) und Pentosanpolysulfat (76,9 mg/ml) konnte nach 48 Stunden in den beiden akuten Phasen eine signifikante Zunahme der Blasen-speicherkapazität gegenüber der Applikation von Natriumchloridlösung erreicht werden. Bei Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml und PPS war dies auch nach 24 Stunden in der akuten Phase II zu beobachten.

Die intravesikale Behandlung manifester Strahlenfolgen in der akuten Phase II führt zu einer reduzierten Reaktionshäufigkeit in der Spätphase. Bei Heparin in einer Konzentration von 3000 U/ml wurde die ED<sub>50</sub> der Spätphase auf  $20,5 \pm 1,2$  Gy (DMF 1,3), bei einer Konzentration von 5000 U/ml auf  $23,6 \pm 5,9$  Gy (DMF 1,5) erhöht. PPS brachte keine Erhöhung des ED<sub>50</sub>-Wertes für die Spätphase. Die prophylaktische Applikation mit Heparin im Zeitraum der zweiten akuten Phase führte zu einer signifikanten Erniedrigung der Reaktionshäufigkeit in dieser Phase, was sich in dem erhöhten ED<sub>50</sub>-Werten von  $42,7 \pm 17,1$  Gy (bei 5000 U/ml, DMF 2,5) und  $43,5 \pm 12,6$  Gy (bei 3000 U/ml, DMF 2,7) zeigte. Durch diese prophylaktische Gabe konnte auch in der Spätphase eine signifikante Erhöhung der ED<sub>50</sub>-Werte auf  $44,1 \pm 12,9$  Gy (DMF 2,7) bei 5000 U/ml bzw.  $31,5 \pm 8,9$  Gy (DMF 1,9) bei 3000 U/ml erreicht werden.

Die direkte Beeinflussung der Spätreaktion durch Glykosaminoglykangabe in dieser Phase ist ebenfalls möglich, jedoch hat nur Heparin in einer Konzentration von 5000 U/ml eine signifikant bessere Wirkung als NaCl. Ein anhaltender Erfolg stellte sich nicht ein.

Die Wirksamkeit von Glykosaminoglykanen kann auf einer Restauration der urothelialen Barriere durch lokale Glykosaminoglykanapplikation beruhen. Es konnte indirekt nachgewiesen werden, dass eine Störung der Glykosaminoglykanschicht an der Pathogenese der akuten Strahlenreaktion beteiligt ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die intravesikale Applikation von Glykosaminoglykanen in der akuten Phase sowohl therapeutisch (bei Reaktion) als auch prophylaktisch zu einer Verringerung der Reaktionshäufigkeit in der Spätphase führt. Es konnte belegt werden,

dass durch die Beeinflussung der Reaktion in der akuten Phase II die Reaktionswahrscheinlichkeit in der Spätphase modifiziert wird. Das Vorhandensein einer ausgeprägten konsekutiven Komponente (consequential late effect) konnte dadurch bestätigt werden.

## **7 Summary**

### **Modification of late radiation sequels in mouse urinary bladder by intravesical administration of glycosaminoglycans**

**Doreen Krumsdorf**

**Department of Small Animal Medicine; Veterinary Faculty; University of Leipzig**

**and Department of Radiation Therapy and Radiation Onkology; Medical Faculty Carl Gustav Carus, University of Dresden**

**December 2002**

88 pages, 32 figures, 18 tables, 130 references, appendix

Radiation treatment of pelvic malignancies frequently induce side effects in the urinary bladder. Chronic complications in particular represent a dose-limiting factor of radiotherapy. Basis for specific modulation of urinary bladder radiation effects is detailed knowledge of the pathogenesis of the radiation response.

Aim of the present study was to demonstrate modification of acute and late radiation reactions in the urinary bladder by instillation of glycosaminoglycans (GAG). In a mouse model bladder function was assessed quantitatively by transurethral cystometry. For this, the bladder was filled with saline by an infusion pump at a rate of 0.1 ml/min via a catheter with an outer diameter of 0.6 mm and the resulting pressure-volume-curves were recorded. The bladder volume at a pressure of 10 mm Hg was used as a measure of bladder function. Repeated measurements in individual animals allowed for longitudinal identification of the response to irradiation and glycosaminoglycan administration.

Single dose irradiation was performed under anaesthesia. In order to assess the radiation response alone, graded doses of 13 to 23 Gy were applied. In contrast, GAG-effects after administration in the acute or chronic phase were studied after a dose of 20 Gy. In a further

experiment, effects of intravesical application of GAG during the acute phase at manifestation of a positive radiation response, or in a prophylactic approach between days 13 and 30 after irradiation were taken. Graded doses between 15 Gy and 24 Gy were applied in order to generate full dose effect curves.

A positive radiation response was defined as a reduction in bladder capacity to  $\leq 50\%$  of the individual pre-irradiation volume. The acute response occurs in two waves, between days 1 - 15 and 16 - 30, respectively. Maximum reactions are observed on days 7 and 24. The mean latency for late effects is about day 180. The ED<sub>50</sub>-values, i. e. the doses after which a positive response is expected in 50 % of the animals, are  $21.1 \pm 3.7$  Gy for acute phase I,  $19.5 \pm 3.7$  Gy for acute phase II and  $16.2 \pm 5.3$  Gy for late effects.

Intravesical administration of glycosaminoglycans resulted in a reduction of the radiation response. Heparin (5000 or 3000 U/ml) or pentosanpolysulfate (PPS, 76,9 mg/ml) resulted in a significant increase in bladder capacity 48 h after instillation in both acute waves as compared to NaCl application. With heparin in a concentration of 5000 U/ml and PPS a similar effect was seen after 24 h in acute phase II.

Intravesical heparin treatment of manifest radiation effects in acute phase II resulted in a reduced incidence of late effects. Heparin in a concentration of 3000 U/ml and 5000 U/ml yielded an ED<sub>50</sub> for late reactions of  $20,5 \pm 1.2$  Gy (DMF 1.3) and  $23.6 \pm 5.9$  Gy (DMA 1.5), respectively. PPS did not change the ED<sub>50</sub> of the late reaktion. Prophylactic heparin administration during the time of acute Phase II resulted in a significant reduction of bladder side effects in this phase, with an ED<sub>50</sub> of  $42,7 \pm 17,1$  Gy (DMF 2,5) with 5000 U/ml and  $43,5 \pm 12,6$  Gy (DMF 2,7) with 3000 U/dml. This treatment protocol also resulted in a significant increase of ED<sub>50</sub>-values for the late response to  $44.1 \pm 12.9$  Gy (DMF 2.7) and 5000 U/ml and  $31.5 \pm 8.9$  Gy (DMF 1.9) with 3000 U/ml.

Moreover, a direct modification of late effects by GAG administration in this phase is observed. However, a significant effect, which was reversible, was seen only with heparin in a concentration of 5000 U/ml.

The efficacy of local GAG administration may be based on restoration of the urothelial GAG barrier. This is indirect evidence that an impairment of the GAG layer of the urothelium is involved in the pathogenesis of the acute bladder response to radiation.

Moreover, GAG instillation in the acute phase, therapeutically at a positive response as well as prophylactically results in a reduced probability for late reactions. This illustrates a substantial consecutive component (consequential late effect) of chronic radiation sequels in the urinary bladder.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Harnblasenwand.....	9
Abbildung 2: Strukturformel des Aminozucker/Säure-Gerüsts von Heparin .....	26
Abbildung 3: Blutgerinnung und deren Beeinflussung durch Heparin.....	28
Abbildung 4: Strukturformel von PPS .....	30
Abbildung 5: Bestrahlungsanlage .....	33
Abbildung 6: Fixation der Mäuse zur Bestrahlung .....	34
Abbildung 7: Kollimatorplatte .....	35
Abbildung 8: Zystotonometrie-Messplatz.....	36
Abbildung 9: Druck-Volumen-Kurve der Harnblase einer unbehandelten Maus .....	46
Abbildung 10: Druck-Volumen-Kurve der Harnblase nach Bestrahlung.....	47
Abbildung 11: Blasenvolumen bei Bestrahlung mit unterschiedlichen Einzeldosen .....	48/48
Abbildung 12: Anzahl neuer Reagenten nach Bestrahlung.....	49
Abbildung 13: Dosis-Effekt-Kurven für AP I, AP II und SP.....	50
Abbildung 14: Überlebenskurven .....	51
Abbildung 15: Relative Anzahl an Reagenten in den entsprechenden Phasen.....	52
Abbildung 16: Gewichtsverlauf von Tag -9 bis 380 bei Bestrahlung mit 13 bis 23 Gy ...	54/54
Abbildung 17: Blasenkapazitätsänderung nach Natriumchloridanwendung (0,9 %) in der AP I und II.....	55
Abbildung 18: Blasenkapazitätsänderung nach Heparinanwendung (5000 U/ml) in der AP I und II .....	57
Abbildung 19: Heilungsquoten bei Behandlung mit Heparin 5000 U/ml in der AP I und II ..	58
Abbildung 20: Blasenkapazitätsänderung nach Heparininstillation (3000 U/ml)	

in der AP I und II.....	59
Abbildung 21: Heilungsquote bei Behandlung mit Heparin 3000 U/ml.....	60
Abbildung 22: Gewichtsverlauf während der akuten Phase unter der Behandlung mit Heparin 3000 U/ml.....	61
Abbildung 23: Blasenkapazitätsänderung nach PPS-Anwendung (76,9 mg/ml) in der AP I und II.....	62
Abbildung 24: Heilungsquote bei PPS-Behandlung.....	62
Abbildung 25: Gewichtsverlauf während der akuten Phase unter der Behandlung mit PPS 76,9 mg/ml.....	63
Abbildung 26: Absolute Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung mit Heparin (5000 und 3000 U/ml) sowie PPS (50mg/ml) in der akuten Phase II .....	65
Abbildung 27: Relative Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung mit Heparin (5000 und 3000 U/ml) sowie PPS (50mg/ml) in der akuten Phase II .....	66
Abbildung 28: Dosis-Effekt-Kurven der Spätphase für Bestrahlung mit gestaffelten Dosen und Instillation von Heparin 5000, 3000 U/ml und PPS 76,9 mg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	68
Abbildung 29: Dosis-Effekt-Kurven bei prophylaktischer Behandlung mit Heparin 5000 und 3000 U/ml im Vergleich mit NaCl (0,9 %) in der AP II und in der SP.....	69
Abbildung 30: Gewichtsverläufe während der akuten und chronischen Phase bei prophylaktischer Behandlung in der akuten Phase II.....	70
Abbildung 31: Absolute (A) und relative (B) Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung in der Spätphase bei einer Reduktion des Blasenvolumens um 25 %.....	73
Abbildung 32: Absolute (A) und relative (B) Blasenkapazitätsänderung nach Behandlung in der Spätphase bei einer Reduktion des Blasenvolumens um 50 %.....	74

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Akute Strahlenreaktion an der Harnblase: RTOG/EORTC-Systematik.....	12
Tabelle 2: Chronische Strahlenreaktion an der Harnblase: RTOG/EORTC- Systematik.....	12
Tabelle 3: LENT/SOMA-Bewertungssystem für späte Strahlenfolgen an der Harnblase.....	12
Tabelle 4: Glukos- und Galaktosaminoglykane im Vergleich.....	25
Tabelle 5: Faktoren der Blutgerinnung .....	27
Tabelle 6: Übersicht über die Wirksamkeitsuntersuchungen (B1/1 – B1/3), zusammen mit den zugehörigen Placebo-Versuchen B1/01, B1/02 und H1.....	39
Tabelle 7: Behandlungsversuche in der akuten Phase II (Versuch B2).....	41
Tabelle 8: Prophylaxeversuche (Versuch B3).....	41
Tabelle 9: Behandlungsversuche in der chronischen Phase (Versuch B4).....	42
Tabelle 10: Anzahl der behandelten Tiere B1/01 .....	54
Tabelle 11: Anzahl der behandelten Tiere B1/1 und B1/2.....	56
Tabelle 12: Anzahl der behandelten Tiere B1/3 .....	61
Tabelle 13: Vergleich der Blasenkapazitätsänderung in der akuten Phase I nach 48 h Heparin und PPS-Behandlung im Vergleich zur NaCl-Anwendung .....	64
Tabelle 14: Vergleich der Blasenkapazitätsänderung in der akuten Phase II nach 48 h Heparin und PPS-Behandlung im Vergleich zur NaCl-Anwendung .....	64
Tabelle 15: ED <sub>50</sub> -Werte in den akuten Phasen I und II nach Heparin- und PPS-Behandlung in der akuten Phase II.....	67
Tabelle 16: ED <sub>50</sub> -Werte bei prophylaktischer Behandlung .....	70
Tabelle 17: Absolute und relative Blasenkapazitätsänderung nach Instillation von NaCl, Heparin und PPS in der Spätphase bei einer Reduktion des Blasenvolumens um 25 %.....	72
Tabelle 18: Absolute und relative Blasenkapazitätsänderung nach Instillation	

von NaCl, Heparin und PPS in der Spätphase bei einer Reduktion  
des Blasenvolumens um 50 %..... 74

## 10 Literaturverzeichnis

1.           ANDERSON K. E., C. SJOEGREN (1982)  
Aspects on the physiology and pharmacology of the bladder and urethra.  
Prog. Neurobiol. 19, 71-89
  
2.           ANTONAKOPOULOS, G.N., R.M. HICKS, E. HAMILTON, R.J. BERRY (1982)  
Early and late morphological changes (including carcinoma of the urothelium)  
induced by irradiation of the rat urinary bladder  
Br. J. Cancer 46, 403
  
3.           BARRINGTON, I.W., T.P STEPHENSON (1997)  
Pentosanpolysulfat for interstitial cystitis  
Int. Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunct. 8:5, 293-295
  
4.           BARSANTI, J.A., D.R. FINCO (1987)  
Evaluation of techniques for diagnosis of canine prostatic diseases  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 48-52
  
5.           BATEMANN, K.E., P.A. CATTON, P.W. PENNOCK, et al. (1994)  
0-7-21 radiation therapy for the treatment of canine oral melanoma  
J. Vet. Int. Med. 8, 267-272
  
6.           BEHR, J., M. WINKLER, F. WILLGEROTH (1990)  
Funktionveränderungen an den unteren Harnwegen nach Bestrahlung des  
Kollumkarzinoms  
Strahlenther. Onkol. 166, 135-139

7. BELL, F.W., J.S. KLAUSNER und S.D. JOHNSTON (1988)  
Clinical and pathologic features of spontaneous prostatic adenocarcinoma in 31 dogs  
Annual Conference of the Vet. Cancer Society, Estes Park; Book of abstracts
  
8. BENTZEN, S.M., F. LUNKBECK, L..L. CHRISTENSEN und J. OVERGARD (1992)  
Fractionation sensitivity and latency of late radiation injury to the mouse urinary bladder.  
Radiother. Oncol. 25, 301–307
  
9. BLACK, R.J., F. BRAY, J. FERLAY und D.M. PARKIN (1990)  
Cancer incidence and Mortality in the European Union: Cancer Registry Data and Estimates of National Incidence for 1990  
Eur J Cancer 33, No.7, 1075-1107
  
10. BLACKWOOD, L., und J.M. DOBSON (1996)  
Radiotherapy of oral malignant melanomas in dogs  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 209, 98-102
  
11. BURNIE, A.G., und A.D. WEAVER (1983)  
Urinary bladder neoplasia in the dog; a review of seventy cases  
J. Small Anim. Pract. 24, 129-143
  
12. COTARD, J.P., und P.DEVAUCHELLE (1985)  
Treatment of bladder tumors in dogs: A new approach  
Proc. Ann. Concr. ESVIM Cambridge,
  
13. DENNY, H. (1996)  
Orthopädische Chirurgie an Hund und Katze  
Verlag Enke, Stuttgart, 49

14. DÖRR, W. (1992)  
Cystometry in mice - influence of bladder filling rate and circadian variations in bladder compliance  
J. Urol. 148, 183-187
15. DÖRR, W.(1992)  
Endogenous factors modulating urinary bladder compliance in mice  
J. Urol. 150, 1939–1944
16. DÖRR, W. (1995)  
Impact of time between fractions on acute changes in mouse urinary bladder function  
Radiat. Res. 141, 219-222
17. DÖRR, W., und H.P. BECK-BORNHOLDT (1999)  
Radiation-induced impairment of urinary bladder function in mice: fine structure of the acute response and consequences on late effects  
Radiat. Res. 151, 461–467
18. DÖRR, W., und S.M. BENTZEN (1999)  
Late functional response of mouse urinary bladder to fractionated X-irradiation  
Int. J. Radiat. Biol. 75, 10, 1307-1315
19. DÖRR, W., M. ECKHARDT, A. EHME und S. KOI (1998)  
Pathogenesis of acute radiation effects in the urinary bladder: experimental results  
Strahlenther. Onkol. 174, Suppl. III, 93-95
20. DÖRR, W., A. EHME und S. KOI (1997)  
Die Beeinflussung der radiogenen Harnblasenschädigung durch Acetylsalicylsäure (ASS)  
Strahlenther. Onkol. 173, 536- 631
21. DÖRR, W., A. EHME und S. KOI (1998)  
Effects of ASA on acute radiation damage in mouse urinary bladder. Radiother Oncol. 48 Suppl. 108

22. DÖRR, W., R. FEUDEL und S. SCHULTZ-HECTOR (1992)  
Early response of mouse urinary bladder to dose fractionation  
Radiother. Oncol. 24 Suppl. 19
23. DÖRR, W., und T. HERRMANN (2000)  
Documentation of acute radiation effects in the urinary bladder during treatment  
of prostate cancer  
Radiother. Oncol. 57, Suppl. 1, 13-14
24. DÖRR, W., und M. KRAFT (1997)  
Effects of ageing and X-irradiation on the diurnal rhythm of mouse urinary  
bladder capacity  
Urol. Int. 58, 153-159
25. DÖRR, W., und S. SCHULTZ-HECTOR (1992)  
Early changes in mouse urinary bladder function following fractionated X  
irradiation  
Radiat. Res. 131, 35-42
26. DÖRR, W., und K.R. TROTT (2000)  
Strahlenbiologie der Normalgewebe  
In: DÖRR, W., J.S. ZIMMERMANN und M.H. SEEGENSCHMIDT Neben-  
wirkungen in der Radioonkologie  
Verlag Urban und Vogel, München, 9-23
27. DOW, S.W., R.A. LECOATER, R.A.W. ROSYCHUK, et al. (1990)  
Response of dogs with functional pituitary macroadenomas and macrocarcinomas  
to radiation  
J. Small Anim. Pract. 31, 287-294
28. DOYLE, P.T., und C.E. BRISCOE (1976)  
The effect of drug and anaesthetic agents on the urinary bladder and sphincters  
Br. J. Urol. 48, 329-335
29. ECKHARDT, M., M. KASPER, und W. DÖRR (1997)  
Morphologische Veränderungen im Rahmen akuter radiogener Funktions-

störungen der Harnblase

Strahlenther. Onkol. 173, 536-631

30. ECKHARDT, M., M. KASPER und W. DÖRR (1998)  
Die Bedeutung der urothelialen Barrierefunktion für die Entwicklung der Strahlenschäden an der Harnblase  
Exp. Strahlenther. Klin. Strahlenbiol. 7, 48-92
31. EHME, A. (1998)  
Beeinflussung des Strahlenschadens an der Harnblase (Maus) durch lokale Behandlung mit Prostaglandin-Synthesehemmern.  
Leipzig , Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.
32. ELDOR, A., I. VLODAVCKY, E. HYAM, R. ATZMON und Z. FUKS (1983)  
The effect of radiation on prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) production by cultured endothelial cells.  
Prostaglandins 25, 263-279
33. EVANS, S.M., und F. SHOFER (1988)  
Canine oral nontonsillar squamous cell carcinoma: prog-nostic factors for recurrence and survival following orthovoltage radiation therapy  
Vet. Radiol. 29, 128-132
34. FREUDIGER, U., E.G. GRÜNBAUM und E. SCHIMKE (1997)  
Antrologie  
Klinik der Hundekrankheiten  
2. Aufl. Verlag Enke, Stuttgart
35. FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE (1993)  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie  
6. Auflage Wissenschaftsverlag, Berlin, 439 – 441
36. FRITJOFSSON, A., M. FALL, R. JUHLIN, B.E. PERSON und M. RUUTU (1987)  
Treatment of ulcer and nonulcer interstitial cystitis with PPS: a multicenter trial.  
J.Urol. Sept. 138, 3, 508-512

37. FÜLLER, J., V. FRITZSCHE, D. KOB, J. ARNDT und A. KRIESTER (1986)  
Histologische Veränderungen der normalen Harnblasenwand nach verschieden  
fraktionierter Bestrahlung - eine tierexperimentelle Studie  
Strahlenther. Onkol. 162, 519-524
38. FÜLLGRAF, G., und D. PALM (1992)  
Pharmakotherapie/Klinische Pharmakologie  
8. Auflage, Verlag Gustav Fischer, Jena, 153-154
39. GILETTE, S.M., und E.L. GILETTE (1995)  
Radiation therapy for head and neck cancers  
In: Murtaugh (Hrsg): Seminars in Veterinary Medicine and Surgery  
Verlag WB Saunders, Philadelphia, 168-173
40. GILMORE, N.J., und J.R. VANE (1971)  
Hormones released into circulation when the urinary bladder of anesthetized dogs  
is distended  
Clin. Sci. 41, 69-83
41. GOGOLOK, J., R. SCHUEMER und G. STRÖHLEIN (1990)  
SAS-Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS  
Band I , Verlag Gustav Fischer, Stuttgart-Jena-NewYork
42. HANFMANN, B., M. ENGELS und W. DÖRR (1998)  
Radiation induced impairment of urinary bladder function. Assessment of  
micturition volumes  
Strahlenther. Oncol. 174, 3, 96-98
43. HERRMANN, T.H., und M. BAUMANN (1997)  
Klinische Strahlenbiologie  
3. Auflage, Verlag Gustav-Fischer, Stuttgart-Jena, 36–58
44. HOHLBRUGGER, G. (1996)  
Leaky urothelium and/or vesical ischemia enable urinary potassium to cause  
idiopathic urgency/frequency syndrome and urge incontinence  
Int.Urogenecol J. Pelvic Floor Dysfunction 7, 5, 242-255

45. HOHLBRUGGER, G., und P. LENTSCH (1985)  
Intravesical ions, osmolality and pH influence the volume pressure response in the normal rat bladder, and this is more pronounced after DMSO exposure  
Eur.Urol. 11, 127-130
46. HOLM-BENTZEN, M., F. JACOBSEN, B. NERSTROM, G. LOSE G,  
J.K. KRISTENSEN, R.H. PEDERSEN, T. KRARUP, J. FEGETTER, P. BATES,  
R. BARNARD, S. LARSEN und T. HALD (1997)  
A prospective double blind clinically controlled multicenter trial of Sodium  
Pentosanpoly-sulfate in the treatment of interstitial cystitis and related painful  
bladder disease  
J. Urol. 503-507
47. HOLM-BENTZEN, M., und G. LOSE (1987)  
Pathology and pathogenesis of interstitial cystitis  
Urol. 29, 8-13
48. HORZINEK, M. Ch. (1997)  
Krankheiten der Katze  
2. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, 314–397
49. HURST, R.E. (1994)  
Structure, function and pathology of proteoglycans and glucosaminoglycans in  
the urinary tract  
World J. Urol 12, 3-10
50. HURST, R.E., S.W. RHODES, P.B. ADAMSON, C.L. PARSONS und J.B. ROY  
(1987)  
Functional and structural characteristics of the glucosaminoglycans of the bladder  
luminal surface  
J. Urol. 138, 433-437

51. HWANG, P., B. AUCLAIR, D. BEECHINOR, M. DIMENT und T.R. EINARSON (1997)  
Efficacy of PPS in the treatment of interstitial cystitis: a meta-analysis  
Urol. 50, 39-43
52. JEPSEN, J.V., M. SALL, P.R. RHODES, D. SCHMIDT, E. MESSING und R.C. BRUSKEWITZ (1998)  
Long term experience with PPS in interstitial cystitis  
Urol. 51, 381-387
53. KASER-HOTZ, B., G. FODOR, I. CORDT RIEHLE, H. BLATTMANN, G. MUNKEL, E. EGGER, S.M. LA RUE und P.F. SUTER (1994)  
Radiotherapie in der Kleintiermedizin: Grundlagen, Indikationen und Bedeutung  
Schweizer Arch Tierheilk. 136, 319-328
54. KELLY, D.F. (1973)  
Rhabdomyosarkoma of the urinary bladder in dogs  
Vet. Pathol. 103, 375-384
55. KESSLER, M. (1999)  
Kleintieronkologie - Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen  
Verlag Parey, Berlin
56. KESSLER, M., A.S. HAMMER, M.Q. BAILY, K.H. TEMPEL und U. MATIS (1996)  
Humaninterferon und 60-Kobaltbestrahlung bei Tumorzellen des Hundes und der Katze – Präklinische Studien  
J. Vet. Med. 43, 599-609

57. KESSLER, M., M. TASSANI-PRELL, Y. MAURUS, et al. (1997)  
Tumoren der Bauch- und Beckenhöhle beim Hund  
Tierärztl. Prax. 25, 472-479
58. KINSELLA, T.J., W.F. SINDELAR, A.M. DELUCA, M. BARNES, Z.  
TOCHNER, A. MIXON und E. GLATSTEIN (1988)  
Tolerance of the canine bladder to intraoperative radiation therapy: an  
experimental study  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 14, 939–946
59. KJELLEN, L., und U. LINDAHL (1991)  
Proteoglycans, structures and interactions  
Annu.Rev. Biochem. 60, 443–475
60. KOLB, E., und M. SCHENK (1990)  
Biochemie: Grundriß der physiologischen Chemie  
Verlag, Gustav-Fischer, Jena, 410-413
61. KOHLER, M., H.M. EPPENBERGER, I. CORDT RIEHLE und C. MICHEL  
(1992)  
Urination frequency and cystic pressure resistance after fractionated whole or  
partial irradiation of the rabbit urinary bladder  
Acta Oncol. 31, 6, 673-677
62. KRAFT, M. (1996)  
Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Pathogenese des  
chronischen Strahlenschadens an der Harnblase anhand eines Tiermodells.  
München, LMU, Veterinärmed. Fak., Diss.
63. KRAFT, M., Y. OUSSOREN, F.A. STEWART, W. DÖRR und S. SCHULTZ-  
HECTOR (1996)  
Radiation-induced changes in TGF- $\beta$  and collagen expression in the murine  
bladder wall and its correlation with bladder function  
Radiat. Res. 146, 619-627

64. KÜMPER, H.J., und W. PENNIG (1970)  
Die radiogene Zystitis  
Urol. B. 10, 277-280
65. LANGHAM, R.F., U.V. MOSTOSKY, und R.G. SCHIRMER (1977)  
X-ray therapy of selected odonto-genetic neoplasms in the dog  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 170, 820-822
66. LERSCH, C., D. GERICKE und M. CLASSEN (1996)  
Efficacy of low-molecular-weight heparin and unfractionated heparin to prevent adhesion of human prostate and bladder carcinoma and melanoma cells to bovine endothelial monolayer. An in vitro study and review of literature.  
Urol. Int. 56, 4, 230-233
67. LEVIN, R.M., A.J. WEIN, K. WHITMORE, F.C. MONSON, B.A. MCKENNA, und M.R. RUGGIERI (1990)  
Trypan Blue as an indicator of urothelial integrity  
Neurourol. Urodynam. 9, 269-279
68. LIEBICH, H. G. (1993)  
Funktionelle Histologie  
2. Auflage, Verlag Schattauer, Stuttgart, 231-232
69. LILLY, J.D., und C.L. PARSONS (1990)  
Bladder surface glycosaminoglycans is a human epithelial permeability barrier  
Surg. Gynecol. Obstet. 171, 493-496
70. LINDAHL, U., K. LIDHOLD, D. SPILLMANN und L. KJELLEN (1994)  
More to Heparin than Anticoagulation  
Thrombosis Res. 1-32
71. LOSE, G. , J. JESPERSON, B. FRANDBSEN, J.C. HOJENSGARD und T. ASTRUP (1985)  
Subcutaneous heparin in the treatment of interstitial cystitis  
Scand. J. Urol. Nephrol. 19, 27-29

72. LUNDBECK, F., I.C. DJURHUS und M. VAETH (1989)  
Bladder filling in mice - an experimental in vivo model to evaluate the reservoir function of urinary bladder in an long term study  
J. Urol. 141, 1245-1249
73. LUNDBECK, F., N. ULSOE und J. OVERGAARD (1989)  
Cystometric evaluation of early and late irradiation damage to the mouse urinary bladder  
Radiother. Oncol. 15, 383-392
74. MAGGI, C.A., P. SANTICIOLI und A. MELI (1986)  
The nonstop transvesical cystometrogram in urethane-anesthetized rats: a simple procedure for quantitative studies on the various phases of urinary bladder voiding cycle  
Pharmacol. Meth. 15, 157-167
75. MONSON, F.C., A.J. WEIN, B.A. MCKENNA, K. WHITMORE und R.M. LEVIN (1991)  
Indigocarmine as quantitative indicator of urothelial integrity  
J. Urol. 145, 842-845
76. MORIKAWA, K., M. KAKIUCHI und T. YAMAUCHI (1989)  
Pharmacological studies on the micturition reflex (2): Effects of various drugs on bladder and urethral functions in rats and dogs  
Pharmacometrics 37, 27-37
77. MULHOLLAND; S.G., P. HANNO, C.L. PARSONS, G.R. SANT und D.R. STASKIN (1990)  
Pentosan polysulfate sodium for therapy of interstitial cystitis. A double-blind placebo-controlled clinical study  
Urol. 35, 552-558

78. NICKEL, R. (1999)  
Tumoren der Harnblase.  
In: M, Kessler: Kleintieronkologie - Diagnose und Therapie von Tumor-  
erkrankungen bei Hunden und Katzen  
Verlag Parey, Berlin , 381-386
79. NOACK, K., und W. DÖRR (1999)  
Veränderungen der CD44-Expression im Rahmen der chronischen Strahlen-  
reaktion der Harnblase (Maus)  
Exp. Strahlenther. Klin. Strahlenbiol. 191-195
80. OSBORNE, C.A., K.H. JOHNSON, V. PERMANN und W.D. SCHALL (1968)  
Renal amyloidosis in the dog  
JAVMA 153, 669
81. PARSONS, C.L. (1982)  
Prevention of urinary tract infection by the exogenous glycos-aminoglycan  
sodium pentosanpolysulfate  
J. Urol. 127, 167-169
82. PARSONS, C.L. (1986)  
Successful management of radiation cystitis with sodium pentosanpolysulfate  
J. Urol. 136, 813-814
83. PARSONS, C.L. (1986)  
Bladder surface glycosaminoglycan: efficient mechanism of environmental  
adaptation  
Urol. 27, 9-14
84. PARSONS, C.L. (1994)  
The therapeutic role of sulfated polysaccharides in the urinary bladder  
Urol. Clin. North Am. 21, 93-100

85. PARSONS, C.L. (1994)  
A model for the function of glycosaminoglycans in the urinary tract. World J. Urol. 12, 38-42
86. PARSONS, C.L. (1996)  
Potassium sensitivity test  
Tech.Urol. 2, 171-173
87. PARSONS, C.L., G. BENSON, S.J. CHILDS, P.HANNO, G.R. SANT und G. WEBSTER (1993)  
A Quanti-tatively controlled method to study prospectively interstitial cystitis and demonstrate the efficacy of pentosanpolysulfate  
J. Urol. 150, 845-848
88. PARSONS, C.L., D. BOYCHUK, S. JONES, R. HURST und H. CALLAHAN (1990)  
Bladder surface glucosaminoglycans: an epithelial permeability barrier  
J. Urol. 143, 139-142
89. PARSONS, C.L., M. GREENBERGER, L. GABAL, M. BIDAIR und G. BARME (1998)  
The role of potassium in the pathogenesis and diagnosis of interstitial cystitis  
J. Urol 159, 6, 1866-1867
90. PARSONS, C.L., T. HOUSLEY, J.D. SCHMIDT und D. LEBOW (1994)  
Treatment of interstitial cystitis with intravesical heparin  
Br. J. Urol. 73, 504-507
91. PARSONS, C.L., und R.E. HURST (1990)  
Decreased urinary uronic acid levels in individuals with interstitial cystitis  
J. Urol. 143, 690-693
92. PARSONS, C.L., J.D. LILLY und P. STEIN (1991)  
Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis)  
J. Urol. 145, 732-735

93. PARSONS, C.L., J.J. POLLEN, H. ANWAR, C. STAUFFER und J.D. SCHMIDT (1980)  
Antibacterial activity of bladder surface mucin duplicated in the rabbit bladder by exogenous glycosaminoglycan (sodium pentosanpolysulfate)  
Infect. Immun. 27, 876-881
94. PARSONS, C.L., J.D. SCHMIDT und J.J. POLLEN (1983)  
Successful treatment of interstitial cystitis with sodium pentosanpolysulfate  
J. Urol. 130, 51-53
95. PARSON, C.L., C.W. STAUFFER und J.D. SCHMIDT (1980)  
Bladder surface glycosaminoglycans - an efficient mechanism of environmental adaptation  
Science 208, 605
96. PARSONS, C.L., C.W. STAUFFER und J.D. SCHMIDT (1988)  
Reversible inactivation of bladder surface glycosaminoglycan antibacterial activity by protamine sulfate  
Infect. Immun. 56, 1341-1343
97. PARSONS, C.L., P.C. STEIN, M. BIDAIR und D. LEBOW (1994)  
Abnormal sensitivity to intravesical potassium in interstitial cystitis and radiation cystitis  
Neurourol. Urodyn. 13, 515-520
98. POGGESI, L, G. NICITA, S. CASTELLANI et al. (1980)  
The role of prostaglandins in the maintenance of the tone of the rabbit urinary bladder  
Invest. Urol. 17, 454-458
99. RIES, J., und H. LUDWIG (1968)  
Diagnostik und Behandlung von Strahlenfolgezuständen an der Harnblase  
Beiheft f. Fortschritt der Therapie 10, 453 - 456

100. RIETHROK, N., A. STAIT und D. LOEW (1994)  
Klinische Pharmakologie  
2. Auflage, Verlag Steinkopff, Darmstadt, 91-93
101. RÜBE, C. H., und K. KRIMMEL (1992)  
Grundlagen der klinischen physikalischen Bestrahlungsplanung  
In: LISSNER, J., und U. FINK: Radiologie 1. Lehrbuch für den 1. klinischen  
Studienabschnitt  
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 358–365
102. RUBIN, P., L.S. CONSTINE, L.F. FAJARDO, T.L. PHILIPPE und T.H.  
WASSERMANN (1995)  
Overview of late normal tissue (Lent) scoring system  
Radiother. Oncol. 35, 1-10
103. SAS, I.I. and Cary, N. SAS/STAT (1990)  
Users Guide Version 6. a, 1324-1350
104. SAS, I.I. and Cary, N. SAS/STAT (1990)  
Users Guide Version 6. b, 1633-1640
105. SAS, I.I. and Cary, N. SAS/STAT (1990)  
Users Guide Version 6. c, 892-906
106. SAUER, R. (1996)  
Strahlenbiologie/ Strahlentherapie  
In: KAUFMANN, G., E. MOSER und R. SAUER: Radiologie. Grundlagen der  
Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuclearmedizin  
Verlag Urban und Schwarzenberg, München, 31-36, 217-253
107. SCHNEIDKRAUT, M.J., P.P. KOT, P.W. RAMWELL und J.C. ROSE (1984)  
Thromboxane und Prostaglandin synthesis following whole body irradiation in  
rats  
J. Appl. Physiol. 57, 833-838

108. SCHUEMER, R., G. STRÖHLEIN und J. GOGOLOK (1990)  
SAS-Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS  
Band II, Verlag Gustav Fischer, Stuttgart-New York,
109. SEEGENSCHMIEDT, M. H. (1998)  
Nebenwirkungen in der Onkologie  
Verlag Springer, Berlin/Heidelberg, 64–67
110. SCHWARZ, P.D., R.W. GREENE und A.K. PATNAIK (1985)  
Urinary bladder tumors in the cat: A Review of 27 cases  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 21, 237-245
111. SINZINGER, H., M. CROMWELL und W. FIRBAS (1986)  
Prostacyclin-und Thromboxansynthese der Gefäßwand nach Gammatron-  
bestrahlung  
Strahlenther. Oncol. 162, 592-595
112. STEIN, B.S. (1981)  
Tumors of the feline genital tract  
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 17, 1022-1025
113. STENGEL, H., N. KIRCHHOF, A. MÖLLER-SEELING et al. (1997)  
Botryoide Rhabdomyosarkome in der Harnblase junger Hunde  
Prakt. Tierarzt 78, 186-194
114. STEWART, F.A. (1986)  
Mechanisms of bladder damage and repair after treatment with radiation and  
cytostatic drugs  
Br. J. Cancer 53, Suppl.: 280-291
115. STEWART, F.A., J. DENEKAMP und D.G. HIST (1980)  
Proliferation kinetics of the mouse bladder after radiation  
Cell Tiss. Kinet., 75-89

116. STEWART, F.A., B.D. MICHAEL und I. DENECAAMP (1978)  
Late radiation damage in the mouse bladder as measured by increased urination frequency  
Radiat. Res. 75, 645-659
117. STEWART, F.A., V.S. RANDHAWA und D.B. MICHAEL (1984)  
Multifraction irradiation of mouse bladder  
Radiother. Oncol., 2, 131-40
118. STRATFUSS, A.C., und J.M. DEAN (1975)  
Neoplasms of the canine urinary bladder  
JAVMA 166, 1161
119. STRYER, L. (1996)  
Biochemie  
4. Auflage, Akademischer Verlag Spektrum, Heidelberg, 498-500
120. TEUNISSEN (1976)  
Erkrankungen der harnableitenden Organe  
Kleintierpraxis 21, 253
121. THACHER, C., und R.L. BRADLEY (1983)  
Vulvar and vaginal tumors in the dog: A reproductive study  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 690-692
122. THAMES, H.D., und J.H. HENDRY (1987)  
Fractionation in Radiotherapy  
Verlag Taylor and Francis, London-New York-Philadelphia
123. THAMES, H.D., H.R. WITHERS und L.J. PETERS (1984)  
Tissue repair capacity and repair kinetics deduced from multifractionated or continuous irradiation regimes  
Br. J. Cancer 49, Suppl. 6, 263-269

124. THRALL, D.E., N.H. GOLDSCHMIDT und D.N. BIERY (1981)  
Malignant tumor formation at the site of previously irradiated acanthomatous epulides in 4 dogs  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 178, 127-182
125. TURREL, J.M. (1987)  
Intraoperative radiotherapy of carcinoma of prostate in ten dogs  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 190, 48-52
126. TURREL, J.M., und A.P. THEON (1986)  
Single high dose irradiation for selected canine rectal carcinomas  
Vet. Radiol. 27, 141-145
127. VALE, J.A., W.G. BOWSHER, K.LIU, A. TOMLINSON, H.N. WHITFIELD  
und K.R. TROTT (1993)  
Postirradiation bladder dysfunction: development of a rat model  
Urol. Res. 21, 383 –388
128. WELFHÖRNER, H. H. (1990)  
Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie  
5. Auflage, Verlag Springer, Berlin-Heidelberg, 110-112
129. WIEGEL, T., W. DÖRR und B. HANFMANN (2000)  
Niere und harnableitende Organe  
In: Nebenwirkungen der Radioonkologie  
Verlag Urban und Vogel, München, 194-196
130. WITHROW, S.J., und S.J. SUSANECK (1986)  
Tumors of canine and feline reproductive tract  
In: MORROW, D.A. (Hrsg.): Current Therapy in Theriogenology  
Verlag WB Saunders, Philadelphia, 521-527
131. WOLKE, R.E. (1963)  
Vaginal leiomyoma as a cause of chronic obstipation in the cat  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 143, 1103-1105

132. WYNDER, E.L., und G.B. GORI (1977)  
Contribution of the environment to cancer incidence: An epidemiologic exercise  
J. Natl. Cancer Inst. 40, 1177-1185

## 11 Danksagung

Für die Vermittlung des Themas an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und die Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. G. Oechtering sowie Herrn Dr. E. Ludewig.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Dörr für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuchsreihen sowie bei der Anfertigung der Arbeit.

Der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus an der TU Dresden danke ich für die Erlaubnis zur Nutzung ihrer Einrichtungen, den Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Labors für die fachliche Beratung und technische Unterstützung.

Für die kollegiale Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit gilt mein Dank den Mitarbeitern der AG-Normalgewebsbiologie, insbesondere Frau Pfitzmann.

Vielen Dank auch Herrn Dr. Nelz sowie der gesamten Belegschaft der Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden.

Für die Überlassung der Medikamente Heparin und PPS sowie für die fachliche Beratung bedanke ich mich bei der Firma Bayer.