

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 Dresden

**Optimierung des Applikationsprotokolls des rekombinanten humanen
Keratinozyten-Wachstumsfaktor Palifermin zur Reduktion der radiogenen oralen
Mukositis nach einzeitiger Strahlenexposition: Untersuchungen an der
Mundschleimhaut der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Ellen Siegemund
aus Dresden

Leipzig, 2011

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Oechtering
Prof. Dr. Wolfgang Dörr

Gutachter: 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 Universität
Dresden

Prof. Dr. Guido Hildebrandt, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der
Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Tag der Verteidigung: 25.01.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	5
2.1	Bedeutung von Tumorerkrankungen	5
2.2	Strahlentherapie in der Humanmedizin	5
2.3	Einzeitbestrahlung/kurzfristige Bestrahlung in der Humanmedizin	6
2.3.1	Ganzkörperbestrahlung	6
2.3.2	Stereotaktische Strahlentherapie (Radiochirurgie)	7
2.3.3	Intraoperative Strahlentherapie	8
2.3.4	Brachytherapie	8
2.4	Strahlentherapie bei Hunden und Katzen	8
2.5	Akutes Strahlensyndrom nach Strahlenunfällen (Akzidentielle Strahlenexposition)	15
2.6	Nebenwirkungen einer Strahlentherapie bzw. -exposition	17
2.6.1	Frühe Strahlenfolgen	18
2.6.2	Späte Strahlenfolgen	18
2.6.3	Konsekutive Strahlenfolgen	18
2.7	Aufbau und proliferative Organisation der Mundschleimhaut	19
2.7.1	Anatomischer Aufbau der Mäusezunge	19
2.7.2	Histologischer Aufbau des Epithels der Zungenunterseite der Maus	19
2.7.3	Proliferationskinetik des Epithels der Zungenunterseite der Maus	20
2.7.4	Besonderheiten der Mundschleimhaut des Menschen	21
2.8	Strahlenreaktion des Epithels der Mundschleimhaut	22
2.8.1	Pathogenese der radiogenen oralen Mukositis	22
2.8.2	Bedeutung der radiogenen oralen Mukositis	22
2.8.3	Klassifizierung der radiogenen oralen Mukositis	23
2.8.4	Prophylaxe und Therapie der oralen Mukositis	25
2.8.4.1	Allgemeine Maßnahmen	26
2.8.4.2	Zahnsanierung	26
2.8.4.3	Mundspülungen	27
2.8.4.4	Kälteapplikation	27
2.8.4.5	Stimulation von Proliferationsvorgängen	28
2.8.4.6	Reduktion freier Sauerstoffradikale	28
2.9	Tiermodelle zur Untersuchung der radiogenen oralen Mukositis	29
2.9.1	Maus	29

INHALTSVERZEICHNIS

2.9.2	Ratte	30
2.9.3	Hamster	30
2.10	Einflussfaktoren der Strahlenempfindlichkeit	30
2.10.1	Intrinsische Radiosensibilität	31
2.10.2	Recovery (Erholung)	32
2.10.3	Repopulierung	33
2.10.4	Redistribution	33
2.10.5	Reoxygenierung	34
2.10.6	Volumeneffekt	34
2.11	Palifermin	35
2.11.1	Einfluss von Palifermin auf unbehandeltes Epithel	35
2.11.2	Einfluss von Palifermin auf das Zungenepithel bei Einzeitbestrahlung	36
2.11.2.1	In vitro Untersuchungen	36
2.11.2.2	In vivo Untersuchungen	37
2.11.3	Einfluss von Palifermin auf das Zungenepithel bei fraktionierter Bestrahlung	38
2.11.4	Einfluss von Palifermin auf das Zungenepithel bei Radiochemotherapie	38
2.11.5	Klinische Studien zur Wirkung von Palifermin	39
2.11.5.1	Gesunde Probanden	39
2.11.5.2	Palifermin in der Therapie hämatologischer Tumoren	39
2.11.5.3	Palifermin in der Therapie kolorektaler Karzinome	41
2.11.5.4	Palifermin in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren	41
2.11.6	Nebenwirkungen einer Palifermin-Behandlung	42
3	Material und Methoden	43
3.1	Versuchstiere	43
3.2	Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite	43
3.2.1	Bestrahlungsanlage	43
3.2.2	Dosimetrie	44
3.2.3	Versuchsdurchführung	44
3.3	Palifermin	45
3.4	Beschreibung der durchgeführten Versuche	46
3.4.1	Alleinige Einzeitbestrahlung (Versuch K)	47
3.4.2	Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation (Versuchsreihe P)	47
3.4.2.1	Palifermin-Applikation an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Einzeitbestrahlung (Standardanwendung, Versuch P1)	47
3.4.2.2	Modifikation der Palifermin-Applikation vor der Einzeitbestrahlung (Versuche P 2.x, P 3.x)	47
3.4.2.3	Modifikation der Palifermin-Applikation nach der Einzeitbestrahlung (Versuche P 4.x, P 5.x)	47

3.4.2.4	Palifermin-Applikation an einem Tag vor und nach der Einzeitbestrahlung (Versuch P 6)	48
3.5	Klinische Beurteilung der Strahlenreaktion	48
3.6	Statistische Auswertung	48
3.6.1	Dosis-Effekt-Beziehungen	49
3.6.2	Zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion	49
3.7	Histologische Untersuchungen	49
3.7.1	Versuchsprotokoll	49
3.7.2	Präparation der Zunge und Herstellung histologischer Schnitte	50
3.8	Histologische Auswertung	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Strahlenreaktion des Epithels der Zungenunterseite	53
4.1.1	Klinische Veränderungen und zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion	53
4.1.2	Dosisabhängigkeit der Strahlenreaktion	55
4.1.3	Sonstige Effekte der Einzeitbestrahlung	55
4.2	Einfluss von Palifermin auf die Strahlenreaktion des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung	56
4.2.1	Palifermin-Applikation an drei Tagen unmittelbar vor und nach der Einzeitbestrahlung (Standardanwendung, Versuch P1)	57
4.2.1.1	Dosis-Effekt-Beziehung	57
4.2.1.2	Zeitlicher Verlauf	58
4.2.2	Reduktion der Palifermin-Gabe vor der Einzeitbestrahlung auf zwei Applikationen (Versuch 2.1, P 2.2)	58
4.2.2.1	Dosis-Effekt-Beziehung	58
4.2.2.2	Zeitlicher Verlauf	59
4.2.3	Reduktion der Palifermin-Gabe vor der Einzeitbestrahlung auf eine einmalige Applikation (P 3.1, P 3.2, P 3.3)	60
4.2.3.1	Dosis-Effekt-Beziehung	60
4.2.3.2	Zeitlicher Verlauf	61
4.2.4	Reduktion der Palifermin-Gabe nach der Einzeitbestrahlung auf zwei Applikationen (Versuch P 4.1, P 4.2)	61
4.2.4.1	Dosis-Effekt-Beziehung	61
4.2.4.2	Zeitlicher Verlauf	61
4.2.5	Reduktion der Palifermin-Gabe nach der Einzeitbestrahlung auf eine einmalige Applikation (Versuch P 5.1, P 5.2, P 5.3)	62
4.2.5.1	Dosis-Effekt-Beziehung	62
4.2.5.2	Zeitlicher Verlauf	63
4.2.6	Einmalige Palifermin-Applikation vor und nach der Einzeitbestrahlung (Versuch P 6)	64

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.6.1	Dosis-Effekt-Beziehung	64
4.2.6.2	Zeitlicher Verlauf	65
4.2.7	Zusammenfassung der Untersuchungen zur Ulkusinduktion	65
4.3	Histologische Untersuchungen	65
4.3.1	Histologie des unbehandelten Epithels	65
4.3.2	Qualitative histologische Veränderungen im Epithel durch die Behandlung	66
4.3.2.1	Alleinige Einzeitbestrahlung	66
4.3.2.2	Palifermin-Applikation	67
4.3.3	Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach alleiniger Einzeitbestrahlung	68
4.3.3.1	Zellzahl	68
4.3.3.2	Epitheldicke	69
4.3.3.3	Zellvolumen	70
4.3.4	Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und nach der Einzeitbestrahlung (Standardanwendung)	71
4.3.4.1	Zellzahl	71
4.3.4.2	Epitheldicke	72
4.3.4.3	Zellvolumen	74
4.3.5	Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor der Einzeitbestrahlung	75
4.3.5.1	Zellzahl	75
4.3.5.2	Epitheldicke	76
4.3.5.3	Zellvolumen	77
4.3.6	Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung	78
4.3.6.1	Zellzahl	78
4.3.6.2	Epitheldicke	80
4.3.6.3	Zellvolumen	82
4.3.7	Zusammenfassung der Untersuchungen zu histologischen Veränderungen des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation	83
5	Diskussion	85
5.1	Radiogene orale Mukositis und Keratinozyten-Wachstumsfaktor	85
5.2	Zungenepithel der Maus als Tiermodell	86
5.3	Strahlenreaktion des Epithels der Zungenunterseite nach Einzeitbestrahlung	87
5.4	Einfluss von Palifermin auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut	87

INHALTSVERZEICHNIS

5.5	Histologische Untersuchungen	88
5.5.1	Zellzahl	89
5.5.2	Epitheldicke	91
5.6	Wirkmechanismen von Palifermin	91
5.7	Einfluss von Palifermin auf das Tumorwachstum	92
5.8	Ausblick	94
6	Zusammenfassung	95
7	Summary	97
8	Literaturverzeichnis	99
9	Anhang	125
9.1	SPF-Bedingungen im Tierstall des Experimentellen Zentrums	125
9.2	Reagenzien zur HE-Färbung	125
9.3	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	126
	Danksagung	132

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
α/β -Wert	Verhältnis der Parameter α (zytotoxaler Schaden) und β (subletaler Schaden) im linear-quadratischen Modell der Strahlenwirkung; Einheit Gy
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso-Urea (Carmustin)
CT	Computertomographie
CTC	Common Toxicity/Terminology Criteria
DEGRO	Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie
DMF	Dosis-Modifikations-Faktor
DNA	Desoxyribonukleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
D_0	Strahlendosis, die das Zellüberleben auf e^{-1} (d.h. 37 %) im exponentiellen Anteil einer Zellüberlebenskurve reduziert
ED ₅₀	Strahlendosis, bei welcher bei 50 % der Exponierten ein Effekt (Ulzeration) zu erwarten ist
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EMA	European Medicine Agency
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration (USA)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FSU	Functional Subunit (Funktionelle Untereinheit)
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
KGF	Keratinocyte Growth Factor (Keratinocyten-Wachstumsfaktor)
KGF-R	Keratinocyte Growth Factor-Receptor (KGF-Rezeptor)
LQ-Modell	linear-quadratisches Modell der Strahlenwirkung
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NCI	National Cancer Institute
OMAS	Oral Mucositis Assessment Scale
PEG	Perkutanes Endoskopisches Gastrostoma
rHuKGF	rekombinant human Keratinocyte Growth Factor (Palifermin)
RKI	Robert Koch Institut
RTOG	Radiation Therapy and Oncology Group
SAS	Statistical Analysis System
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SF	surviving fraction (Überlebensfraktion)
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SSK	Strahlenschutzkommission
σ	Standardabweichung der ED ₅₀ (Probitanalyse)
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

In Industrieländern sind Tumorerkrankungen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache des Menschen (STATISTISCHES BUNDESAMT 2008). Auch bei Hunden und Katzen zählen Tumorerkrankungen zu den Haupttodesursachen. Aufgrund guter medizinischer Versorgung steigt die Lebenserwartung der Tiere, wodurch zunehmend mehr Tumoren diagnostiziert werden.

Die Tumorthherapie richtet sich nach Tumorart, dem Vorhandensein von Metastasen sowie dem Alter und Gesundheitszustand des Patienten. In der Veterinärmedizin kommen die Behandlungskosten als weiterer Einflussfaktor hinzu.

Die Strahlentherapie ist neben der Chirurgie und Chemotherapie eine effektive Behandlungsmethode für Tumoren. In kurativer Intention kann sie postoperativ bei nicht vollständig resezierten Tumoren bzw. bei Verdacht auf mikroskopische Tumorreste oder präoperativ zur Tumorverkleinerung eingesetzt werden. Als alleinige Therapie kommt sie bei kleinen, vor allem auch bei nicht resezierbaren Tumoren in Betracht. Die Kombination mit Chemotherapie muss vor allem bei Vorliegen oder Verdacht auf Fernmetastasen in die Therapieabwägung einbezogen werden. Als palliative Maßnahme dient die Strahlentherapie der Verminderung von Beschwerden durch die Tumormasse und der Linderung von tumor- bzw. metastasenbedingten Schmerzen. Außerdem können benigne Erkrankungen (z.B. akute und chronische Entzündungen, degenerative, hypertrophierende und verschiedene dermatologische Erkrankungen) mit Bestrahlung erfolgreich behandelt werden.

Aus strahlenbiologischen Gründen wird die Strahlentherapie üblicherweise als fraktionierte Behandlung über mehrere Wochen durchgeführt. Die Einzeitbestrahlung, d.h. die einmalige Applikation einer hohen Strahlendosis bzw. die Applikation in einem kurzen Zeitintervall, ist als Ganzkörperbestrahlung Bestandteil der Konditionierungstherapie vor Knochenmark- oder Stammzelltransplantation zur Behandlung hämatologischer Tumoren. Andere Anwendungen sind die stereotaktische Bestrahlung primärer Neoplasien oder Metastasen im Gehirn, die intraoperative Bestrahlung nach chirurgischer Tumorsektion zur Eliminierung von makroskopischen oder mikroskopischen Tumorresten und die Brachytherapie, bei der umschlossene radioaktive Strahler in die Nähe von Tumoren gebracht werden und mit hohen Dosisleistungen appliziert werden.

In der Veterinärmedizin stellt die Strahlentherapie in der Tumorbehandlung von Hunden und Katzen eine wichtige Behandlungsoption dar. In den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden in Wien erstmals Tiere mit gutartigen chronischen Erkrankungen sowie mit Sarkomen und Karzinomen bestrahlt (HIRSCHFELD et al. 2001). Die erste spezialisierte Therapieeinrichtung wurde 1938 an der Universität von Pennsylvania, USA, gegründet (KASER-HOTZ 2005). Während sich in den USA die Strahlentherapie rasch als eine gängige Behandlungsmethode von Tumoren auch bei Tieren durchgesetzt hat, verlief die Entwicklung in Europa langsamer. Ursache sind verschiedene Bedenken, wie z.B. die fehlende Akzeptanz der Patientenbesitzer, die hohen Kosten der Behandlung, die

Notwendigkeit häufiger Anästhesien, die strahlenbedingte Toxizität sowie ethische Fragen (HIRSCHFELD et al. 2001).

Trotz beträchtlicher technischer Fortschritte bei der Applikation der Strahlentherapie ist eine Strahlenexposition von gesundem Gewebe nicht zu vermeiden. Dies umfasst bei soliden Tumoren die unmittelbare Umgebung des Tumors und den Ein- und Austrittskanal der Strahlung, aber auch normale Strukturen innerhalb des Tumors (z.B. Gefäße). Die Strahlenfolgen an Normalgeweben werden in frühe (akute) Reaktionen und späte (chronische) Reaktionen unterteilt.

Die orale Mukositis ist eine der häufigsten und schmerzhaftesten frühen Nebenwirkungen einer Ganzkörperbestrahlung (WARDLEY et al. 2000, STOKMAN et al. 2006, BARASCH et al. 2009) bzw. einer Radio(chemo)therapie von Kopf-Hals-Tumoren (DÖRR et al. 2008). Sie ist während und kurz nach der onkologischen Therapie der wichtigste Faktor für die Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten. Vor allem bei neutropenischen Patienten kann die orale Mukositis eine lebensbedrohliche Sepsis hervorrufen, da Keime über die geschädigte Mundschleimhaut in die Blutbahn gelangen können (DÖRR et al. 2008). Die orale Mukositis erzwingt nicht selten die Unterbrechung der onkologischen Behandlung. In den Behandlungspausen kann die Zellneubildung im Tumor ungestört ablaufen, was die Chance auf Tumorheilung erheblich reduziert (DÖRR et al. 2008). Außerdem hat die frühe Strahlenreaktion Einfluss auf das Risiko von späten Strahleneffekten in der Mundhöhle, wie Fibrosen, chronische Ulzera oder Nekrosen (konsekutive Spätfolgen, DÖRR und HENDRY 2001, DÖRR et al. 2007). Nicht zu unterschätzen sind die beträchtlichen Kosten, die im Rahmen der Strahlenfolgen an der Mundschleimhaut auftreten. Schätzungen aus den USA gehen von mehreren Tausend Euro zusätzlicher Kosten pro Patient infolge der Schleimhautreaktion aus (ELTING et al. 2007). In dieser Größenordnung können die Kosten auch auf das deutsche Gesundheitssystem übertragen werden (DÖRR et al. 2008).

Die Prophylaxe und Therapie der radiogenen oralen Mukositis gilt als problematisch. Viele Behandlungsansätze sind vorhanden, jedoch kann derzeit kein allgemein anwendbares Schema abgeleitet werden (DÖRR et al. 2007, 2008). Ein neuer Ansatz basiert auf tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen mit dem Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF). KGF fördert die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen und reduziert die Häufigkeit und den Schweregrad der Schleimhautreaktion. Für die klinische Anwendung wurde eine trunkierte rekombinante Form des humanen KGF ($\Delta 23$ -rHuKGF, Palifermin) entwickelt. Palifermin ist seit 2004 in den USA (FDA 2004) und seit 2005 in der Europäischen Union (EMEA 2005) für die Behandlung der oralen Mukositis, ausgelöst durch die myeloablative Therapie vor der Transplantation von Knochenmark bzw. peripherer Stammzellen bei malignen hämatologischen Erkrankungen, zugelassen. Palifermin wird dabei an drei aufeinanderfolgenden Tagen vor und nach der myeloablativen Therapie appliziert (SPIELBERGER et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob durch eine Verringerung der zugelassenen Anzahl der Palifermin-Applikationen vor und/oder nach der Konditionierung die mukoprotektive Wirkung von Palifermin erhöht und das Ausmaß der oralen Mukositis

weiter reduziert werden kann. Die Untersuchungen erfolgen tierexperimentell am etablierten Tiermodell der Mäusezunge mit der Analyse der Inzidenz von Schleimhautulzerationen als primären, klinisch relevanten Endpunkt. Eine Einzeitbestrahlung simuliert die klinische Konditionierungstherapie.

2 Literaturübersicht

2.1 Bedeutung von Tumorerkrankungen

Die Tumorerkrankung ist eine häufige Todesursache. Etwa 25 % der Sterbefälle werden durch einen Tumor verursacht. Übertroffen wird dies nur von den Herz-Kreislauf-Erkrankungen (43,1 % der Sterbefälle). Erkrankungen des Atmungssystems machen 7,1 % der Sterbefälle und Erkrankungen des Verdauungssystems 5,1 % der Sterbefälle aus (STATISTISCHES BUNDESAMT 2008). Krebsneuerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich stehen in Deutschland mit einem Anteil von 3,5 % bei Männern an 7. Stelle, bei Frauen mit einem Anteil von 1,5 % an 16. Stelle aller Krebsneuerkrankungen (GEKID und RKI 2010). In den meisten Fällen der bösartigen Kopf-Hals-Tumoren handelt es sich um Plattenepithelkarzinome. Sie sind am häufigsten an den vorderen zwei Dritteln der Zunge einschließlich der Zungenunterseite lokalisiert. Diese Tumoren zeigen ein invasives Wachstum in Weichteilgewebe und Knochen und neigen zur lymphogenen, seltener zur hämatogenen Metastasierung.

Auch bei Hunden und Katzen zählen Tumorerkrankungen zu den Haupttodesursachen. Etwa 50 % der Hunde, die älter als 10 Jahre werden, sterben infolge eines Tumorleidens (KASER-HOTZ et al. 1994). Aufgrund der engeren Mensch-Tier-Beziehung gewinnt der Wunsch der Tierbesitzer nach einer Therapie ihres krebserkrankten Tieres zunehmend an Bedeutung (DORSCH 2002, KESSLER 2005, ROHRER BLEY 2007). Tumoren beim Tier werden grundsätzlich wie beim Menschen behandelt, jedoch werden beim Tier deutlich weniger Nebenwirkungen toleriert, da die Erhaltung der Lebensqualität hier Vorrang hat. Die Wahl der Therapie hängt dabei vom Ursprungsgewebe, der Bösartigkeit und Ausdehnung des Tumors, dem allgemeinen Gesundheitszustand, der familiären Situation, den persönlichen Überzeugungen sowie den finanziellen Überlegungen ab (ROHRER BLEY 2007).

Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie sind die wichtigsten Behandlungsmodalitäten bei Tumorerkrankungen (HOWALDT und KAINZ 1997). Während die Chirurgie und Strahlentherapie lokal wirksame Methoden darstellen, ist die Chemotherapie ein vorwiegend systemisch wirksames Verfahren, das hauptsächlich gegen Metastasen gerichtet ist.

2.2 Strahlentherapie in der Humanmedizin

Die Strahlentherapie ist bei über der Hälfte der Tumorerkrankten integraler Bestandteil der onkologischen Therapie - allein oder in Kombination mit chirurgischer Tumorentfernung und/oder Chemotherapie (DÖRR et al. 2008). Dieser Anteil wird in den nächsten Jahrzehnten aufgrund der Zunahme von funktionell erhaltenden Therapieformen weiter ansteigen (DÖRR et al. 2005).

Die Strahlentherapie wird im Allgemeinen als fraktionierte Bestrahlung durchgeführt, d.h. die Gesamtstrahlendosis wird in einzelne Fraktionen aufgeteilt. Das Standardprotokoll umfasst die Anwendung von 2 Gy pro Fraktion an fünf aufeinander folgenden Tagen einer

Woche bis zu einer Gesamtdosis von 60 bis 70 Gy. Die einmalige Applikation einer hohen Strahlendosis (Einzeitbestrahlung) oder die Bestrahlung innerhalb eines kurzen Zeitintervalls ist nur selten indiziert. Anwendungsgebiete sind die stereotaktische und intraoperative Strahlentherapie sowie die Brachytherapie. Die Einzeitbestrahlung wird zudem bei der Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der Konditionierung vor der Knochenmark- und Stammzelltransplantation zur Therapie hämatologischer Tumoren durchgeführt. Effekte einer einmaligen Strahlenexposition treten auch nach Unfällen oder bei bewusster Freisetzung (Anschläge) radioaktiver Strahlung auf.

2.3 Einzeitbestrahlung/kurzfristige Bestrahlung in der Humanmedizin

2.3.1 Ganzkörperbestrahlung

Die Ganzkörperbestrahlung ist Bestandteil der Therapie hämatologischer Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter, wie akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), chronische myeloische Leukämie (CML) oder myelodysplastisches Syndrom. Zu den fakultativen Indikationen zählen das Neuroblastom, das Ewing-Sarkom und das Plasmozytom. Bei hochmalignen und niedrigmalignen Lymphomen sowie beim multiplen Myelom wird die Ganzkörperbestrahlung experimentell angewendet (QUAST 2006, LOHR und WENZ 2007).

Jährlich erkranken ca. 9100 Menschen an Leukämie. Dabei ist die Inzidenz bei Kindern (34,1 % aller Krebserkrankungen) deutlich höher als bei Erwachsenen (2 %). Die Überlebensaussichten sind für Kinder mit einer Fünf-Jahres-Überlebensrate für ALL von 88 % und für AML von 62 % günstiger. Dagegen beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate für Leukämien bei erwachsenen Frauen 38 % und bei erwachsenen Männern 43 % (GEKID und RKI 2008).

Die Ganzkörperbestrahlung wird gemeinsam mit einer Hochdosischemotherapie zur Konditionierung vor einer Transplantation von Knochenmarkstammzellen oder peripheren Vorläuferzellen angewendet. Ziel der Ganzkörperbestrahlung ist dabei (1) die Immunsuppression, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern und (2) die Elimination aller manifesten und zirkulierenden Tumorzellen im Körper.

Früher wurde die Ganzkörperbestrahlung als Einzeitbestrahlung verabreicht. Heute werden kurzzeitig fraktionierte Bestrahlungsprotokolle bevorzugt, bei denen innerhalb von drei bis vier Tagen Fraktionen in kurzen Intervallen von vier bis acht Stunden verabreicht werden. Ein optimales Fraktionierungsschema ist bisher nicht identifiziert, da die Strahlentherapie nur einen Teil einer komplexen Behandlung der hämatologischen Erkrankungen ausmacht. Die angewendeten Schemata für die Einzeit- und fraktionierte Bestrahlung basieren überwiegend auf empirischen Daten (Tab. 1).

Tab. 1: *Bestrahlungsprotokolle zur Konditionierungsbehandlung in der Humanmedizin (GIRINISKY et al. 2000, QUAST und SACK 2003)*

Gesamtdosis (Gy)	Dosis pro Fraktion (Gy)	Anzahl der Fraktionen	Zeitraum (Tage)
Einzeitbestrahlung			
10,0 Gy	10,0	1	1
Fraktionierte Bestrahlung			
10,0 Gy	2,5	4	4
12,0 Gy	2,0	6	3
14,4 Gy	1,2	12	4

Im Unterschied zu lokalen Bestrahlungsprotokollen, bei denen Nebenwirkungen auf das Bestrahlungsfeld beschränkt bleiben, können die Strahlenfolgen bei Ganzkörperbestrahlung alle Organe im Körper betreffen. Sie sind bei fraktionierter Bestrahlung meist weniger stark ausgeprägt als bei der Einzeitbestrahlung (GIRINSKY et al. 2000, NIETHAMMER und HENSLEY 2006). Zu den häufigsten frühen Nebenwirkungen einer Ganzkörperbestrahlung zählen Übelkeit und Erbrechen, Mukositiden des gesamten Verdauungstraktes, Zystitis, Infektionen und Blutungen. Funktionsstörungen der Nieren, der Leber, der Lunge, des Herzens, der Schilddrüse und der Gonaden sowie strahleninduzierte Katarakte sind typische späte Strahlenfolgen (QUAST 2006, LOHR und WENZ 2007).

Etwa 90 % bis 100 % der Patienten entwickeln nach einer Ganzkörperbestrahlung eine orale Mukositis, eine der schwersten Komplikationen nach einer Konditionierungstherapie (WARDLEY et al. 2000, STOKMAN et al. 2006). Die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist assoziiert mit erheblichen Schmerzen, Dysphagie und dem Risiko lebensbedrohlicher Septikämien. Die orale Mukositis wird detailliert im Kapitel 2.8 beschrieben.

2.3.2 Stereotaktische Strahlentherapie (Radiochirurgie)

Die stereotaktische Strahlentherapie – auch Radiochirurgie genannt - umfasst Bestrahlungstechniken, bei der die Strahlung auf ein räumlich stark reduziertes Zielvolumen mit einem steilen Dosisabfall zum gesunden Gewebe hin appliziert wird. Die stereotaktische Bestrahlung eignet sich für gut- und bösartige Strukturen im Schädel, wie primäre Hirnneoplasien, Hirnmetastasen, Neurinome, Meningiome und inoperable arteriovenöse Missbildungen. Zunehmend werden auch extrakranielle Erkrankungen, wie Tumoren der Leber und der Lunge, mit einer stereotaktischen Bestrahlung behandelt (Körper-Stereotaxie).

2.3.3 Intraoperative Strahlentherapie

Die intraoperative Strahlentherapie kann grundsätzlich bei allen Tumoren angewendet werden. Haupteinsatzgebiete sind derzeit intraabdominale Tumoren und Mammakarzinome. Eine einmalige hohe Strahlendosis (15-20 Gy) wird direkt in das ehemalige Tumorgebiet appliziert. Ziel ist die Eliminierung mikroskopischer oder makroskopischer Tumorreste, die trotz sorgfältigster Tumorresektion zurückbleiben können. Die lokale Tumorkontrolle wird dabei deutlich verbessert. Umliegende normale Strukturen werden während der Bestrahlung verlagert oder abgeschirmt. Die intraoperative Bestrahlung ist ein Verfahren, das einen hohen technischen und personellen Einsatz erfordert und daher nur wenigen spezialisierten Zentren vorbehalten ist (EBLE und DÖRR 2009).

2.3.4 Brachytherapie

Die Brachytherapie ist eine Bestrahlungstechnik, bei der umschlossene radioaktive Strahler direkt in oder an einen Tumor gebracht werden. Ziel ist eine hohe lokale Strahlendosis, wobei durch den Dosisabfall zur Umgebung gleichzeitig Nebenwirkungen für das gesunde Gewebe gering gehalten werden. Die Brachytherapie hat sich z.B. bei bösartigen Tumoren der Prostata, des Uterus, der Vagina und der Brust sowie bei der Behandlung von Hauttumoren, kleinen Kopf-Hals-Tumoren und Aderhautmelanomen als wirksam erwiesen.

2.4 Strahlentherapie bei Hunden und Katzen

Die Strahlentherapie ist in der Veterinärmedizin die zweitwichtigste Therapiemodalität bei der Behandlung bösartiger Tumoren. Für einige Tumorarten (z.B. die meisten Gehirntumoren und Nasenhöhlektumoren) stellt sie die beste Therapieoption dar (ROHRER BLEY 2007). Die Ergebnisse sind oft bereits während oder kurz nach Beendigung der Strahlentherapie ersichtlich und führen sofort zu einer Verbesserung der Lebensumstände des Tieres (ROHRER BLEY 2007). Grundsätzlich gelten bei der Strahlentherapie von Hunden und Katzen die Prinzipien der Humanmedizin. Die derzeit eingesetzten Bestrahlungsprotokolle sind jedoch nicht einheitlich und sehr variabel (KASER-HOTZ 2005). Ein Risikofaktor ist die Notwendigkeit einer Narkose zur Immobilisierung des Patienten für jede Bestrahlung. Aus diesem Grund werden bei der Bestrahlung von Tieren im Vergleich zur Humanmedizin bevorzugt höhere Strahlendosen pro Fraktion bei gleichzeitiger Reduktion der Anzahl an Fraktionen angewendet. Häufig erfolgt die Strahlentherapie in der Veterinärmedizin dreimal wöchentlich (Montag/Mittwoch/Freitag-Schema) über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen mit etwa 4 Gy pro Fraktion. Dabei werden insgesamt 40-50 Gy appliziert (KASER-HOTZ 2005). Die kurative oder palliative Strahlentherapie wird in der Veterinärmedizin dort angewendet, wo eine vollständige chirurgische Resektion des Tumors aus kosmetischen,

anatomischen oder funktionellen Gründen nur eingeschränkt möglich ist, wie beispielsweise bei Tumoren der Mund- und Nasenhöhle, Gehirntumoren oder Tumoren der Gliedmaßen. Mediastinale Tumoren können ebenfalls gut mit Bestrahlung behandelt werden. Abdominale Tumoren dagegen werden in der Veterinärmedizin noch selten bestrahlt, da die Tiere oft einen verschlechterten Allgemeinzustand zeigen und eine aufwendige Therapieplanung erforderlich ist (KASER-HOTZ 2005).

Die Einzeitbestrahlung ist in der Veterinärmedizin sehr selten indiziert. Die Brachytherapie wird aufgrund der strikten Regulationen und den hohen erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen im Umgang mit radioaktiven Materialien in der Veterinärmedizin nur limitiert angewendet (ROHRER BLEY 2007a). Sie wird z.B. bei limbalen Melanomen des Auges (GRÄNITZ 2005) und bei Nasenhöhlektumoren (THOMPSON et al. 1992) eingesetzt. Die Anwendung von intraoperativer Strahlentherapie ist bei der Behandlung von Prostatakarzinomen beschrieben. In Untersuchungen von TURREL (1987) erreichen zehn Hunde nach intraoperativer Bestrahlung eine mediane Überlebenszeit von 114 Tagen. Nach alleiniger chirurgischer Entfernung der Prostata werden Überlebenszeiten von ca. 30 Tagen (HARGIS und MILLER 1983) bis zu neun Monaten beschrieben (HARDIE et al. 1984).

Die Ganzkörperbestrahlung besitzt in der Veterinärmedizin derzeit noch keine praktische Relevanz. Erste Untersuchungen an Hunden mit generalisiertem Lymphom zeigen, dass eine Ganzkörperbestrahlung in Kombination mit Chemotherapie und anschließender Knochenmarktransplantation die Remissionszeit im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie verbessert (WILLIAMS et al. 2004, GUSTAFSON et al. 2004, MAYER und LARUE 2005, LAING et al. 2008). Die Ganzkörperbestrahlung wird dabei als zwei Halbkörperbestrahlungen im Abstand von vier Wochen durchgeführt. Die Hunde tolerieren die Bestrahlungsprotokolle sehr gut. Es werden keine ernstesten oder lebensbedrohlichen Nebenwirkungen registriert (GUSTAFSON et al. 2004, WILLIAMS et al. 2004, LAING et al. 2008, 2008a). Die mediane Remissionszeit beträgt 15,2 Monate (GUSTAFSON et al. 2004) und 16,2 Monate (WILLIAMS et al. 2004), während nach alleiniger Chemotherapie die Hunde 11 Monate remissionsfrei sind (WILLIAMS et al. 2004). Die zusätzliche Ganzkörperbestrahlung verlängert die Remissionszeit im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie nur minimal, was den hohen personellen, technischen und finanziellen Aufwand der Ganzkörperbestrahlung vorerst noch nicht rechtfertigt.

Im Folgenden sollen beispielhaft Indikationen für eine Strahlentherapie bei Hunden und Katzen vorgestellt werden, ohne dass ein Anspruch auf Vollständigkeit besteht.

Die Mundschleimhaut stellt bei Hunden und Katzen wie auch beim Menschen eine häufige Primärlokalisation für Tumoren dar (KESSLER 2005). Die Inzidenz von **Maulhöhlentumoren** wird bei Hunden und Katzen mit 70,4 bzw. 45,4 pro 100 000 Tiere angegeben (DORN und PRIESTER 1976). Die wichtigsten oralen Tumoren bei Hunden sind Epuliden, Plattenepithelkarzinome, Fibrosarkome und maligne Melanome (LIPTAG und WITHROW 2007, ARGYLE und SABA 2008). Der Therapieerfolg wird signifikant von der Größe des Primärtumors sowie dem Vorhandensein von Fernmetastasen beeinflusst (DEWHIRST et al. 1985, THÉON et al. 1997). Ossifizierende und fibromatöse Epuliden

können meist chirurgisch behandelt werden, während die knocheninvasiv wachsenden akanthomathösen Epuliden ohne eine Kieferresektion nicht komplett zu exzidieren sind. Sie sind aber ausgesprochen strahlensensitiv. Meist genügt schon eine Gesamtdosis von 40 Gy, um diese Tumoren zu kontrollieren, so dass die Strahlentherapie gegenüber aggressiven chirurgischen Maßnahmen zu bevorzugen ist (KASER-HOTZ 2005).

Plattenepithelkarzinome der Maulhöhle weisen ein sehr schnelles und invasives Wachstum auf. Tonsilläre Plattenepithelkarzinome gehören zu den bösartigsten Tumoren des Hundes. Die Metastasierungstendenz ist selbst bei noch sehr kleinen Primärtumoren sehr ausgeprägt (KESSLER 2005, COYLE und GARRETT 2009). Auch bei aufwendiger Therapie ist die Prognose schlecht. In der Literatur werden nach Tonsillektomie mediane Überlebenszeiten von zwei Monaten angegeben (TODOROFF und BRODEY 1979). Die Überlebenszeit kann bei Tonsillektomie, gefolgt von regionaler Bestrahlung (MACMILLAN et al. 1982) bzw. regionaler Bestrahlung und Chemotherapie (BROOKS et al. 1988) verbessert werden. So zeigen sechs von acht Hunde nach Tonsillektomie in Kombination mit Strahlentherapie eine komplette Remission und ein Hund eine partielle Remission. Die Überlebenszeiten liegen zwischen 44 Tagen und 631 Tagen (median 109 Tage). Metastasen sind häufig (MACMILLAN et al. 1982). Wird zusätzlich zur Tonsillektomie und Strahlentherapie eine Chemotherapie durchgeführt, wird bei fünf von sechs Tieren eine komplette Remission erreicht und von einer medianen Überlebenszeit von 240 Tagen berichtet. (BROOKS et al. 1988). Bei großen invasiven Tumoren oder bei nachweisbarer Makrometastasierung sollte von einer Therapie abgesehen werden.

Nicht-tonsilläre Plattenepithelkarzinome metastasieren selten bzw. erst spät im Verlauf der Erkrankung (KESSLER 2005, GRIER und MAYER 2007). Radikale chirurgische Resektionen (Mandibulektomie, Maxillektomie) haben eine günstige Prognose. In der Literatur werden mediane Überlebenszeiten zwischen 9 und 19 Monaten angegeben (KESSLER 2005). Tiere in frühen Erkrankungsstadien können sogar durch den Eingriff geheilt werden (SALISBURY und LANTZ 1988). Plattenepithelkarzinome der Maulhöhle sind strahlensensitiv. Bei 16 Hunden kann mit Bestrahlung eine mediane Überlebenszeit von 9 Monaten erreicht werden, allerdings müssen 14 Tiere aufgrund von Lokalrezidiven euthanasiert werden (TODOROFF und BRODEY 1979). LADUE-MILLER et al. (1996) berichten nach Strahlentherapie nicht-tonsillärer Plattenepithelkarzinome bei 14 Hunden von einer mittleren erkrankungsfreien Zeit von 12 Monaten sowie von einer mittleren Überlebenszeit von 14 Monaten.

Orale Fibrosarkome zeichnen sich durch ein extrem invasives Wachstum mit geringer Metastasierungsneigung aus. Eine radikale chirurgische Entfernung des Tumors (Mandibulektomie, Maxillektomie) ist die Behandlung der Wahl. Auf eine weite radikale Resektion im Gesunden ist zu achten (KESSLER 2005). Die Rezidivrate ist auch bei radikaler Operation im Vergleich zu anderen oralen Tumoren sehr hoch (SCHWARZ et al. 1991, 1991a). Bei 104 in der Literatur beschriebenen Fällen beträgt die mediane Überlebenszeit ca. 11 Monate. Etwa 45 % dieser Patienten erleiden ein Rezidiv (KESSLER 2005). Fibrosarkome sind im Vergleich zu den anderen Maulhöhlentumoren strahlenresistent und erfordern hohe Strahlendosen, damit sie kontrolliert werden können (KASER-HOTZ 2005, MAULDIN et al. 1992, BURK 1996).

Orale Melanome gehören zu den bösartigsten Tumoren und zeichnen sich durch ein lokal infiltratives und destruktives Wachstum sowie eine hohe Metastasierungsrate v. a. in Lymphknoten und Lunge aus. Die mediane Überlebenszeit von Hunden, die keine Therapie erhalten, beträgt ca. zwei Monate (HARVEY et al. 1981). Die chirurgische Entfernung des Tumors gilt als Therapie der Wahl (KESSLER 2005, COYLE und GARRETT 2009). Da aber grundsätzlich von einer Infiltration des Kieferknochens oder Periosts auszugehen ist, kann eine lokale Tumorkontrolle nur bei radikaler Resektion des betroffenen Knochensegments (Mandibulektomie, Maxillektomie) erreicht werden. In mehreren Studien liegt die mediane Überlebenszeit nach operativer Therapie zwischen 7,5 und 9,9 Monaten, wobei jedoch die Schwankungsbreite sehr hoch ist (KESSLER 2005). Melanome galten lange Zeit als strahlenresistent, jedoch zeigt die Anwendung hoher Einzeldosen (Hypofraktionierung) klinische Erfolge (KESSLER 2005, COYLE und GARRETT 2009). Bei 25 von 36 Hunden kann nach Strahlentherapie (36 Gy in vier wöchentlichen Fraktionen à 9 Gy) eine komplette und bei neun Tieren eine partielle Remission erreicht werden. Nur bei vier Tieren entsteht ein Lokalrezidiv, während es bei 21 Tieren zur Metastasenbildung kommt (BLACKWOOD und DOBSON 1996). In einer anderen Untersuchung von BATEMAN et al. (2008) werden orale Melanome bei 18 Hunden mit 24 Gy in 3 Wochen (8 Gy pro Fraktion am Tag 0, Tag 7 und Tag 21) bestrahlt. Neun Hunde zeigen eine komplette, fünf Hunde eine partielle Remission. Fünf Hunde überleben krankheitsfrei 9 bis 19 Monate nach Beginn der Behandlung.

In der Maulhöhle von Katzen sind Plattenepithelkarzinome mit über zwei Dritteln die häufigsten Neoplasien (COTTER 1981, STEBBINS et al. 1989, ARGYLE und SABA 2008). Die Prognose für diese schnell und invasiv wachsenden Tumoren ist generell ungünstig (MARRETTA et al. 2007). Katzen tolerieren eine aggressive chirurgische Resektion (Mandibulektomie, Maxillektomie) des Tumors sehr schlecht, so dass in den meisten Fällen eine kurative Therapie nicht möglich ist (KESSLER 2005, NORTHROP 2008a). Außerdem treten schon nach kurzer Zeit Rezidive auf. Mediane Überlebenszeiten von 1,5 bis 8 Monaten werden in der Literatur beschrieben (KESSLER 2005). Eine Strahlentherapie verbessert die lokale Tumorkontrolle nach unvollständiger chirurgischer Resektion (NORTHROP 2008a). Plattenepithelkarzinome sind strahlensensitiv, trotzdem betragen die Überlebenszeiten nach alleiniger Strahlentherapie nur zwei bis drei Monate (NORTHROP 2008a). FIDEL et al. (2007) registrieren nach akzelerierter Strahlentherapie (3,5 Gy/Fraktion, 14 Fraktionen in 9 Tagen) bei fünf von neun Katzen eine komplette Remission. Allerdings liegt die mediane Überlebenszeit nur bei 86 Tagen. POSTORINO REEVES et al. (1993) vergleichen in einer Untersuchung mit 52 Katzen verschiedene Behandlungsmodalitäten. Bei sieben Katzen wird der Tumor chirurgisch entfernt, bei 24 Katzen wird eine kurative Strahlentherapie (4 Gy/Fraktion, 10-12 Fraktionen nach Montag-Mittwoch-Freitag-Schema), bei 11 Katzen eine Strahlen- und Chemotherapie (Cisplatin als Radiosensitizer) und bei 10 Katzen eine Strahlentherapie und Hyperthermie durchgeführt. Die Überlebenszeiten liegen bei 1 Monat bis 15 Monaten, wobei die mediane Überlebenszeit 2 Monate beträgt. Die längste mediane Überlebenszeit von 3 Monaten wird nach alleiniger Strahlentherapie registriert. Nach chirurgischer Resektion des Tumors beträgt die mediane Überlebenszeit nur 1,5 Monate. HUTSON et al. (1992)

erreichen nach Mandibulektomie und anschließender Strahlentherapie die längste mediane Überlebenszeit von 14 Monaten, wobei aber sechs der sieben Katzen ein Rezidiv nach einer medianen erkrankungsfreien Phase von 11 Monaten entwickeln.

Nasenhöhliertumoren treten bei Hunden mit 1 bis 2 % aller Neoplasien verhältnismäßig selten auf. Maligne epitheliale Tumoren (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, niedrig differenzierte Karzinome) werden am häufigsten angetroffen (RUSLANDER 2005). Ohne Therapie überleben die Hunde üblicherweise nur ca. zwei bis fünf Monate nach Diagnose des Tumors. Sie müssen meist aufgrund massiver Epistaxis bzw. Nasenausfluss oder neurologischen Erscheinungen euthanasiert werden (RUSLANDER 2005, WITHROW und VAIL 2007, ELLIOT und MAYER 2009). Chirurgische Techniken haben keine praktische Bedeutung. Oft ist eine Resektion des Tumors im gesunden Gewebe nicht möglich und radikale Rhinotomien sind mit einem erhöhten Risiko perioperativer Morbidität und Mortalität verbunden (MACEWEN et al. 1977). Die mediane Überlebenszeit wird nicht verlängert und beträgt drei bis fünf Monate (MACEWEN et al. 1977, ELLIOT und MAYER 2009). Die chirurgische Tumorentfernung wird nur noch in Kombination mit Strahlentherapie als sinnvoll angesehen (ADAMS et al. 1987, 2005, EVANS et al. 1989). Die Strahlentherapie gilt zurzeit als beste Behandlungsoption (RUSLANDER 2005, ELLIOT und MAYER 2009). Früher wurden kurative Bestrahlungen mit einer Gesamtdosis von 48-64 Gy, verteilt auf 12-19 Fraktionen nach einem Montag/Mittwoch/Freitag-Schema durchgeführt (ADAMS et al. 1987, EVANS et al. 1989, THEON et al. 1993). Neuere Protokolle sehen tägliche Bestrahlungen mit geringerer Einzeldosis auf der Grundlage von Schnittbildverfahren (CT, MRT) vor (McENTEE et al. 1991). In der Literatur werden nach kurativer Strahlentherapie mediane Überlebenszeiten von 7 bis 13 Monaten erreicht. Etwa 35-60 % der Hunde leben länger als 1 Jahr, etwa 17-40 % der Hunde leben länger als 2 Jahre (ADAMS et al. 1987, THEON et al. 1993, HENRY et al. 1998, LADUE et al. 1999, NORTHRUP et al. 2001, RUSLANDER 2005, WITHROW und VAIL 2007, YOON et al. 2007). In Kombination mit dem Zytostatikum Cisplatin, einem Radiosensitizer, kann die mediane Überlebenszeit verlängert werden (LANA et al. 2004). Die Brachytherapie ist eine andere Form der Strahlentherapie von Nasenhöhliertumoren. Jedoch sind die Überlebenszeiten mit durchschnittlich 7,1 Monaten geringer als bei der Teletherapie (THOMPSON et al. 1992).

Bei der Katze sind intranasale Tumoren deutlich seltener als beim Hund, wobei das maligne Lymphom am häufigsten diagnostiziert wird (RUSLANDER 2005). Die Behandlung des malignen Lymphoms wird kontrovers diskutiert. Die Strahlentherapie eignet sich gut zur lokalen Kontrolle des Tumors, aber viele Katzen entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine systemische Leukose. Daher ist bei vielen Patienten (v.a. bei Feline-Leukose-positiven Tieren) eine systemische Chemotherapie nötig (ELMSLIE et al. 1991, STRAW et al. 1986). Über die strahlentherapeutische Behandlung intranasaler Tumoren bei Katzen liegen weniger Berichte vor als beim Hund (RUSLANDER 2005). Bei einem großen Teil der Patienten scheint aber eine Langzeitremission möglich zu sein (ELMSLIE et al. 1991, STRAW et al. 1986). Zwei Studien mit insgesamt 42 Katzen zeigen durchschnittliche Überlebenszeiten von 11 Monaten bzw. 19 Monaten (STRAW et al.

1986, THÉON et al. 1994). Zwei Tiere überleben länger als 40 Monate (STRAW et al. 1986). Weisen Tiere zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine systemische Ausbreitung des Lymphoms auf, so ist mitunter schon eine alleinige Chemotherapie indiziert. Bei großer intranasaler Tumormasse und sekundären Atemschwierigkeiten verbessert eine zusätzliche Strahlentherapie die Symptomatik deutlich (RUSLANDER 2005).

Die UV-Licht-assoziierten **Plattenepithelkarzinome im Bereich des Nasenspiegels** gehören zu den häufigsten Tumoren der Katze (KESSLER 2005a). Sie verhalten sich primär lokal invasiv und metastasieren selten (LANA et al. 1997, MILLER et al. 1991). Die Behandlung erfolgt chirurgisch oder strahlentherapeutisch mit guter Prognose. Die Resektion des Nasenspiegels wird von Katzen gut toleriert (KESSLER 2005a). Auch die Strahlentherapie hat sich als sehr wirkungsvoll erwiesen (CARLISLE und GOULD 1982, THÉON et al. 1995), wobei das Tumorstadium für die Prognose als sehr relevant erscheint (KESSLER 2005a).

Gehirntumoren werden in der Veterinärmedizin aufgrund verbesserter Möglichkeiten der bildgebenden Diagnostik (CT, MRT) mittlerweile häufiger diagnostiziert. Ihre Inzidenz wird bei Hunden mit 14,5 pro 100 000 Tiere angegeben (VANDEVELDE 1984, BREARLY und ARGYLE 2008). Meningiome und die verschiedenen Typen der Gliome (Astrozytom, Oligodendrogliom, Glioblastom) treten am häufigsten auf (BREARLEY 2005, BREARLY und ARGYLE 2008). Neurochirurgische Maßnahmen werden mit zunehmender Häufigkeit durchgeführt, sind aber technisch sehr aufwendig (NIEBAUER et al. 1991, SARFATY et al. 1988, LECOUTEUR 2009). Mediane Überlebenszeiten betragen etwa fünf Monate (BREARLY und ARGYLE 2008). Schwerwiegende ZNS-Schäden können vorkommen (HEIDNER et al. 1991, JEFFERY und BREARLEY 1993, NIEBAUER et al. 1991). Aufgrund des invasiven Verhaltens der meisten Gehirntumoren ist eine alleinige chirurgische Entfernung des Tumors in der Regel nicht kurativ (BREARLEY 2005, BREARLY und ARGYLE 2008). Die Strahlentherapie allein oder in Kombination mit Chirurgie erreicht die längsten Überlebensraten (THÉON et al. 2000, AXLUND et al. 2002a). Die mediane Überlebenszeit beträgt für Meningiome etwa 12 bis 15 Monate, für Gliome 9 bis 10 Monate (BREARLY und ARGYLE 2008). Es existieren verschiedene Bestrahlungsprotokolle, wobei sich hier noch keines als überlegen erwiesen hat. Die Toxizität der Bestrahlung in Form von Nekrose und chronischem Ödem ist ein limitierender Faktor (BREARLEY 2005). Bei der Behandlung von Gehirntumoren von Hunden und Katzen gewinnt die stereotaktische Strahlentherapie an Bedeutung (SESSUMS und MARIANI 2009). Die Therapie findet nur einmalig statt, was die Narkose auf eine einzige Sitzung reduziert (SESSUMS und MARIANI 2009). LESTER et al. (2001) registrieren nach Behandlung von 2 Hunden Überlebenszeiten von 4 Jahren bzw. 13 Monaten. SESSUMS und MARIANI (2009) empfehlen die Anwendung der stereotaktischen Strahlentherapie bei kleinen intrakraniellen Meningiomen (< 2,5 cm), wobei die Patienten keine schweren klinischen Symptome (d.h. neurologischer Untersuchungsgang unauffällig, Anfälle als einziges klinisches Symptom) zeigen dürfen. Die stereotaktische Strahlentherapie reduziert die Tumormasse signifikant, aber sehr langsam (HENZEL et al. 2006), weshalb bei schwerer klinischer Symptomatik

konservative Behandlungsmethoden zu bevorzugen sind, um eine schnelle Heilung zu erreichen (SESSUMS und MARIANI 2009).

Die Inzidenz primärer Gehirntumoren bei Katzen wird mit 3,5 pro 100 000 Tiere angegeben, wobei das Meningiom am häufigsten auftritt (VANDEVELDE 1984, ZAKI und HURVITZ 1976, BREARLY und ARGYLE 2008). Meningiome wachsen bei der Katze langsam und nicht invasiv, weshalb bei entsprechender Lokalisation eine komplette, nicht selten kurative chirurgische Resektion möglich ist (GORDON et al. 1994, OAKLEY und PATTERSON 2003). Die mediane Überlebenszeit beträgt etwa 2 Jahre (BREARLY und ARGYLE 2008). Allerdings ist die perioperative Mortalität recht hoch (GALLAGHER et al. 1993, GORDON et al. 1994). Über die Anwendung anderer Therapiemodalitäten liegen kaum Angaben vor (BREARLEY 2005).

Mastzelltumoren gehören zu den häufigsten Hauttumoren des Hundes und machen 7 bis 27 % aller kutanen Neoplasien aus (KESSLER 2005a, MURPHY und BREARLY 2008, NORTHRUP 2008). Sie treten bevorzugt im Bereich der Gliedmaßen, des Rumpfes, des Kopfes, des Perineums, des Skrotums und der Vulva auf. Ihr biologisches Verhalten zeichnet sich durch ein invasives Wachstum mit vornehmlich lymphogener Metastasierung und nur selten Fernmetastasierung aus. Die chirurgische Entfernung des Tumors stellt die Therapie der Wahl dar (KESSLER 2005a, NORTHRUP 2008). Da Mastzelltumoren invasiv in das umliegende Gewebe einwachsen, ist eine weite Resektion über die palpierbaren Tumorgrenzen hinaus notwendig. Mastzelltumoren sind ausgesprochen strahlensensitiv. Die Strahlentherapie wird postoperativ bei unvollständiger chirurgischer Entfernung des Tumors empfohlen (FRIMBERGER et al. 1997, CHAFFIN und THRALL 2002, NORTHRUP 2008). Sie kann auch als primäre Behandlung bei inoperablen Tumoren angewendet werden (KESSLER 2005a, NORTHRUP 2008). Etwa 94-97 % der Hunde, die nach unvollständig chirurgisch entfernten Grad-2-Mastzelltumoren (ohne Nachweis einer Metastasierung) bestrahlt werden, sind nach einem Jahr rezidivfrei. Nach zwei bis fünf Jahren beträgt die lokale Tumorkontrollrate 85-93 % (NORTHRUP 2008). Je weniger differenziert der Mastzelltumor im histologischen Bild ist, desto kürzer ist die Überlebensrate. Die Überlebensrate für Grad-3-Mastzelltumoren (keine Metastasierung in regionale Lymphknoten) beträgt ein Jahr nach postoperative Bestrahlung etwa 71 % (HAHN et al. 2004). Eine tägliche Bestrahlung scheint effektiver als eine Behandlung mit drei Fraktionen pro Woche zu sein (LADUE et al. 1998).

Bei Katzen machen Mastzelltumoren 2 bis 21 % aller Neoplasien der Haut aus. In der Regel verhalten sie sich im Vergleich zum Hund weniger aggressiv und weisen eine geringere Invasivität auf (KESSLER 2005a). Die chirurgische Resektion ist Therapie der Wahl, wobei konservative Resektionstechniken nicht mit einer höheren Rezidivrate verbunden sind als großzügigere Exzisionen (MOLANDER-McCRARY et al. 1998). Im Gegensatz zum Hund gibt es bei der Katze nur wenige Erfahrungen mit Strahlentherapie. Sie scheint aber sinnvoll zu sein (KESSLER 2005a).

Eine gute Alternative stellt die Strahlentherapie bei der Behandlung des **Osteosarkoms** der Gliedmaßen dar, dem häufigsten primären Knochentumor beim Hund. Diese Tumoren führen zur Destruktion der Knochenstruktur, was mit starken Schmerzen einhergeht. Osteosarkome neigen sehr früh zur hämatogenen Metastasierung, hauptsächlich in die Lunge (NAGEL 2005). Die Amputation der betroffenen Gliedmaße mit anschließender Chemotherapie ist Standardbehandlung des Osteosarkoms (NAGEL 2005, COOMER et al. 2009). Seit etwa 20 Jahren wird in den USA ein gliedmaßenerhaltenes Verfahren („limb-sparing“) mit einem Spenderknochen durchgeführt (NAGEL 2005). Osteosarkome sind weitgehend strahlenresistent. Die Strahlentherapie wird meist als palliative Behandlung zur Schmerzlinderung angewendet, wenn eine Amputation aus ethischen Gründen abgelehnt wird (MCENTEE et al. 1993). Geeignet sind Patienten, deren Tumor noch nicht zu starker Auflösung des Knochens geführt hat. Die Strahlentherapie erfolgt in drei Fraktionen (8-10 Gy/Fraktion, Tag 0, 7, 21) oder in fünf Fraktionen (4,5 Gy/Fraktion an 5 aufeinander folgenden Tagen). Ein Großteil der Patienten ist danach weitgehend schmerz- und lahmheitsfrei, was in einigen Fällen für mehr als sechs Monate anhält (NAGEL 2005). Seit einigen Jahren werden trotz der geringen Strahlensensitivität des Osteosarkoms auch kurative Bestrahlungsprotokolle (fraktionierte Bestrahlung, intraoperative Strahlentherapie, stereotaktische Strahlentherapie) beschrieben (COOMER et al. 2009). Dabei hat sich die fraktionierte Bestrahlung nicht erfolgreich gezeigt. Die intraoperative Strahlentherapie, wobei das Knochensegment mit dem Tumor außerhalb des Körpers mit einer einmaligen Strahlendosis von 70 Gy behandelt und danach wieder im Körper fixiert wird, und die stereotaktische Strahlenbehandlung führen zu einer besseren lokalen Tumorkontrolle. Sie erfordern aber einen hohen technischen und personellen Standard (COOMER et al. 2009). Osteosarkome sind bei Katzen deutlich seltener als beim Hund. Es existieren nur wenige Berichte über mit Strahlentherapie behandelten Katzen. Sie scheint wie beim Hund als palliative Behandlung zur Schmerztherapie durchaus erfolgversprechend zu sein (KESSLER 2005b).

2.5 Akutes Strahlensyndrom nach Strahlenunfällen (Akzidentielle Strahlenexposition)

Teil- oder Ganzkörperbestrahlungen sowie die oberflächliche Kontamination mit Radionukliden oder die Inkorporation durch Inhalation oder Ingestion sind mögliche Folgen von Unfällen. Frühe Strahlenfolgen werden zum akuten Strahlensyndrom zusammengefasst, wobei es sich um ein Multiorgan-Geschehen handelt, auch wenn im Folgenden die einzelnen Formen der Erkrankung beschrieben werden (FLIEDNER et al. 2001).

Vier verschiedene Erscheinungsformen können in Abhängigkeit von der Strahlendosis und dem Organsystem beobachtet werden (SSK 2007). Der zeitliche Ablauf lässt sich in 4 Phasen einteilen (Tab. 2).

Tab. 2: Zeitlicher Verlauf des akuten Strahlensyndroms (WASELENKO et al. 2004, SSK 2007)

Phase	Zeitpunkt des Auftretens	Symptome
1. Prodromalstadium	48 Stunden bis 6 Tage nach Bestrahlung (<24 Stunden: schlechte Prognose)	unspezifische Symptome: Übelkeit, Erschöpfung, Kopfschmerzen, Erbrechen
2. Latenzphase	mehrere Tage bis Monate (Zeitdauer dosisabhängig)	Symptome verbessert, scheinbar Heilung
3. Hauptstadium (manifeste Erkrankung)	einige Wochen	allgemeine Symptome, Infektionen, zerebrovaskuläres, gastrointestinales, mukokutanes, hämatopoetisches Syndrom
4. Genesung oder Tod		chronischer Verlauf möglich

Grundlage der Symptomatik (Hauptstadium: gastrointestinales, mukokutanes, hämatopoetisches Syndrom) ist die Zellerneuerungskinetik von Haut und Schleimhäuten sowie der Blutbildung im Knochenmark und lymphatischen Organen – typischen Umsatzgeweben, die aus einem proliferierenden und einem differenzierenden bzw. funktionalen Zellkompartiment bestehen. Durch mechanische und chemische Beanspruchung der Geweboberfläche (Haut, Schleimhaut) bzw. durch Apoptose (Zellen des Blutes und lymphatische Organe) gehen Zellen regelmäßig verloren. Sie werden permanent aus dem proliferierenden Zellkompartiment ersetzt. Die proliferativen Zellpopulationen sind strahlenempfindlich, während die differenzierten Zellen eine niedrige Strahlensensibilität aufweisen. Der Zellnachschub versiegt nach Strahleneinwirkung, während der physiologische Zellverlust unverändert bleibt. Die klinische Symptomatik tritt auf, wenn die Anzahl der differenzierten Funktionszellen eine bestimmte Schwelle unterschreitet. Die Latenzzeit ist damit gewebesabhängig. Erst bei hohen Strahlendosen sind auch differenzierte Zellen beeinträchtigt und die Latenzzeit verkürzt (SSK 2007). Die zerebrovaskuläre Symptomatik tritt erst bei hohen Strahlendosen klinisch in Erscheinung. Sie beruht auf Störungen der Gefäß- und Endothelfunktion. Die genaue Pathophysiologie früher und chronischer Strahlenfolgen wird in Kapitel 2.6 beschrieben.

Strahlendosen von über 20 Gy am ZNS führen zur Ausbildung der **zerebrovaskulären Symptomatik** mit unspezifischen Symptomen (Fieber, Übelkeit, Appetitlosigkeit, Erbrechen, Durchfall) sowie neurologischen und kognitiven Ausfällen. Die Symptome ergeben sich aus dem Versagen der vaskulären Regulationsmechanismen. Eine Heilung ist nicht möglich (SSK 2007).

Gastrointestinale und mukokutane Symptome entwickeln sich bereits nach geringeren Strahlendosen von 5 Gy bis 20 Gy. Das **gastrointestinale Syndrom** ist geprägt von schweren, meist blutigen Durchfällen. Die Folge sind erhebliche Störungen des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes. Der Verlust der epithelialen Barriere durch die Strahlenschädigung bildet eine Eintrittspforte für Infektionen. Eine kausale Therapie ist bisher nicht bekannt. Die Prognose ist schlecht (SSK 2007).

Haut und Mundschleimhaut sind in ihrer pathophysiologischen Strahlenreaktion vergleichbar, deshalb wird ihre Strahlenreaktion zum **mukokutanen Syndrom** zusammengefasst. Die Pathogenese umfasst eine Epithelreaktion mit zunehmender Abnahme der funktionellen Zellen (Hypoplasie) bis hin zum vollständigen Zellverlust (Ulzeration) sowie Gefäßreaktionen, die sich in Entzündungsprozessen manifestieren. Nach einer Latenzzeit von ein bis zwei Wochen entwickelt sich eine ulzerative Dermatitis und schmerzhafte orale Mukositis (SSK 2007). Der Keratinozyten-Wachstumsfaktor ist ein aussichtsreicher Ansatz zur Prävention des mukokutanen, aber auch des gastrointestinalen Syndroms und Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Bereits bei einer Ganzkörper-Dosis von 1 Gy bis 1,5 Gy kommt es zur Schädigung des Knochenmarks (**hämatopoetisches Syndrom**). Blutungen sowie eine verminderte Immunabwehr mit einem sehr hohen Infektionsrisiko sind die Folge der Leukopenie und Thrombozytopenie.

Die Hauptreaktionsphase führt entweder zum Tod oder es schließt sich die Genesung an. Im letzteren Fall entwickelt sich eine chronische Strahlenkrankheit mit späten Strahlenfolgen an verschiedenen Organen sowie der Entstehung strahleninduzierter Tumoren (HERRMANN et al. 2006).

Diagnostische und therapeutische Leitlinien zur Behandlung von Opfern eines Strahlenunfalls wurden 2001 im Rahmen eines europäischen METROPOL-Projektes (Medical Treatment Protocols of Radiation Accident Victims) in einem „Manual“ veröffentlicht (FLIEDNER et al. 2001, FRIESECKE et al. 2001, BERGER et al. 2006). Von der Strahlenschutzkommission des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit wurden entsprechende Empfehlungen erstellt (SSK 2007).

2.6 Nebenwirkungen einer Strahlentherapie bzw. -exposition

Trotz moderner Bestrahlungsplanung und technisch exakter Strahlenapplikation lässt es sich nicht vermeiden, dass das Zielvolumen einen beträchtlichen Anteil gesunden Normalgewebes einschließt, welches sich innerhalb des Tumors, in dessen Umgebung („Sicherheitsraum“ der Bestrahlungsplanung) sowie im Ein- und Austrittskanal der Strahlung befindet. Als Folge der Strahlenbelastung treten frühe (akute) und späte (chronische) Nebenwirkungen im Normalgewebe auf, was die Tumordosis und damit die Heilungsaussichten limitiert. Akute und chronische Strahlenfolgen werden im Rahmen einer kurativen Strahlentherapie in Kauf genommen, solange sie einen gewissen allgemein akzeptierten Schweregrad nicht überschreiten (TROTT et al. 2002, DÖRR 2009).

2.6.1 Frühe Strahlenfolgen

Akute Strahlenreaktionen des Normalgewebes manifestieren sich per definitionem bis zum 90. Tag nach Beginn der Strahlentherapie (TROTTE et al. 2002, HERRMANN et al. 2006, DÖRR 2009). Sie sind typisch für rasch proliferierende Gewebe bzw. Gewebeanteile, zu denen z.B. Epithelien der Schleimhäute, die Epidermis und das Knochenmark gehören. Diese Umsatzgewebe weisen eine hierarchische Proliferationsstruktur mit einem proliferierenden, germinativen und einem funktionellen, postmitotischen Zellkompartiment auf. Eine ständige Zellproduktion dient der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und gleicht den permanenten Zellverlust durch mechanische oder chemische Beanspruchung der Geweboberfläche (Haut, Schleimhaut) bzw. durch Apoptose (Zellen des Blutes, lymphatische Organe) aus (TROTTE et al. 2002, HERRMANN et al. 2006, DÖRR et al. 2007, DÖRR 2009). Die Strahlenexposition beeinträchtigt die Zellneubildung. Da der physiologische Zellverlust weiter bestehen bleibt, tritt ein progressiver Verlust funktioneller Zellen (Hypoplasie) ein (DÖRR 2009, DÖRR et al. 2008, DÖRR und HERRMANN 2009). Die Regeneration des Gewebes geht von überlebenden Zellen im Bestrahlungsfeld oder einwandernden, proliferationsfähigen Zellen von den Rändern des bestrahlten Areals aus.

Frühe Strahlenreaktionen sind in der Regel vollständig reversibel (DÖRR 2009). Durch Bestrahlungspausen oder durch eine verlängerte Gesamtbehandlungszeit wird den Geweben die Möglichkeit zur Repopulierung gegeben, was frühe Strahlenreaktionen vermindert (HERRMANN et al. 2006, DÖRR 2009a). Typische Beispiele sind die orale Mukositis (siehe Kap. 2.8), die radiogene Dermatitis oder die strahleninduzierte Leukopenie.

2.6.2 Späte Strahlenfolgen

Chronische Nebenwirkungen werden erst Monate bis Jahre nach der Strahlenanwendung beobachtet und sind in der Regel irreversibel. Die Pathogenese ist wesentlich komplexer als diejenige früher Strahlenfolgen und basiert auf Strahleneffekten an den Parenchymzellen des Gewebes, an Fibroblasten sowie an Gefäßendothelzellen, die zum Funktionsverlust des betroffenen Gewebes führen (DÖRR et al. 2005, DÖRR 2009, HERRMANN et al. 2006). Die Höhe der Einzeldosis beeinflusst dabei ganz wesentlich das Ausmaß der Spätfolgen. Je höher die Strahlendosis, desto kürzer ist die Latenzzeit bis zur klinischen Manifestation (DÖRR 2009, HERRMANN et al. 2006). Typische Beispiele sind Fibrose der Lunge, der Haut oder der Leber, aber auch Nekrosen des ZNS.

2.6.3 Konsekutive Strahlenfolgen

Konsekutive Spätfolgen stellen aufgrund ihrer speziellen Pathogenese eine Sonderform der späten Strahlenreaktionen dar und beruhen auf einer Interaktion zwischen frühen und

späten Strahlenfolgen im gleichen Organ. Wird die Schutz- und Barrierefunktion von Oberflächenepithelien durch die Frühreaktion beeinträchtigt, erfahren die Zielstrukturen für chronische Effekte im gleichen Organ (Bindegewebe, Gefäßendothelzellen) zusätzlich weitere chemische und/oder mechanische Noxen. Mundschleimhaut, Darm, Lunge, Harnblase - und mit Einschränkung die Haut - sind betroffene Gewebe (DÖRR und HENDRY 2001, DÖRR 2009, HERRMANN et al. 2006).

2.7 Aufbau und proliferative Organisation der Mundschleimhaut

In der vorliegenden Arbeit wird für die strahlenbiologischen Untersuchungen der oralen Mukositis das Modell der Zungenunterseite der Maus verwendet. Im folgenden Abschnitt werden daher der anatomische Aufbau der Mäusezunge sowie der histologische Aufbau der murinen Zungenunterseite beschrieben.

2.7.1 Anatomischer Aufbau der Mäusezunge

Die Zunge der Maus ist etwa 10 mm lang, 5 mm breit und 1 bis 2 mm dick. Sie lässt sich anatomisch in Zungenspitze (*Apix linguae*), Zungenkörper (*Corpus linguae*) und Zungenwurzel (*Radix linguae*) unterteilen. Es findet sich eine mediane Längsfurche (*Sulcus medianae*). Über das Zungenbändchen (*Frenulum linguae*) ist die Zunge am Mundhöhlenboden befestigt. Die Zunge besteht aus quergestreifter Muskulatur, umgeben von Binde-, Drüsen- und Fettgewebe. Submukosa und Mukosa liegen diesen Gewebsschichten auf. Das Epithel des Zungenrückens, der Zungenspitze und der seitlichen Zungenränder beinhaltet eine Vielzahl von Geschmacks- und mechanisch wirksamen Papillen.

2.7.2 Histologischer Aufbau des Epithels der Zungenunterseite der Maus

Die Mundschleimhaut der Zungenunterseite der Maus besteht aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel (Abb. 1). Die iso- bis hochprismatischen Zellen der *Basalzellschicht (Stratum basale)* liegen einer Basalmembran auf. An die Basalzellschicht schließt die *Stachelzellschicht (Stratum spinosum)* an. Die Zellen sehen im Lichtmikroskop stachelig aus, da eine Schrumpfung bei Fixierung der histologischen Schnitte an den Stellen der stabilen Zell-Zell-Kontakte (Desmosomen) nicht erfolgt. Die Basalzellschicht und die tieferen Zellschichten der Stachelzellschicht werden zur **Germinativschicht** zusammengefasst. In dieser Schicht findet die gesamte Zellproduktion statt.

Über der Stachelzellschicht liegen die stark abgeflachten Epithelzellen der *Körnerzellschicht (Stratum granulosum)*. Sie enthalten basophile Keratohyalin granula (Vorstufe des Keratins) im Zytoplasma. Der Zellkern und die anderen Zellorganellen

beginnen zu degenerieren. Die oberen Zelllagen der Stachelzellschicht und die Zellen der Körnerzellschicht sind nicht teilungsfähig. Sie bilden zusammen die **funktionelle Schicht**, ein Begriff der 1997 von DÖRR eingeführt wurde. Das Epithel wird durch die *Superfizialschicht (Stratum superficiale)* abgeschlossen, d.h. der kernlosen **Keratinschicht (Stratum corneum)**, die aus in Hornsubstanz (Keratin) umgewandelten Zellen besteht.

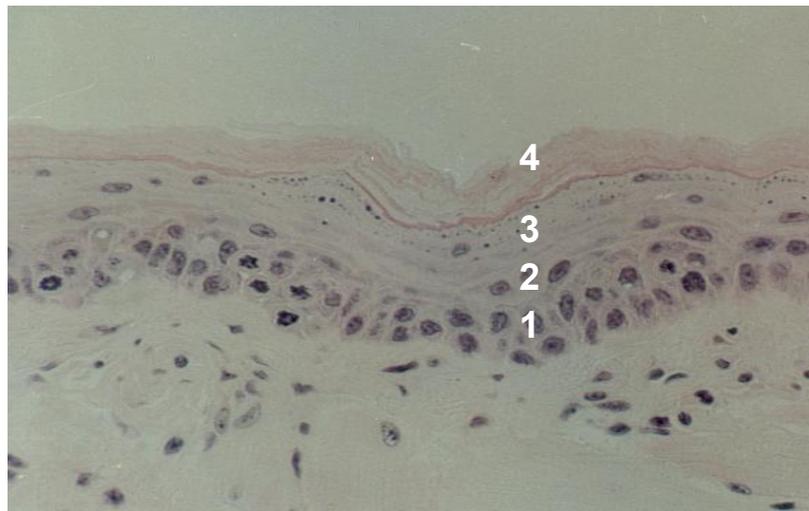


Abb. 1: *Histologischer Aufbau der Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus.*
1: Basalzellschicht, 2: Stachelzellschicht, 3: Körnerzellschicht,
4: Keratinschicht (Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung)

2.7.3 Proliferationskinetik des Epithels der Zungenunterseite der Maus

Das Epithel der Mundschleimhaut gehört zu den Umsatzgeweben. Die Zellen der Germinativschicht sorgen für einen kontinuierlichen Zellnachschub, während an der Epitheloberfläche ständig Zellen durch mechanische und chemische Beanspruchung (z.B. Nahrungsaufnahme) abgeschilfert werden. Die germinativen Stammzellen teilen sich fortwährend in zwei verschiedene Tochterzellen (asymmetrische Teilung): eine neue Stammzelle und eine in den Differenzierungsprozess eintretende Tochterzelle. Letztere führt noch eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen durch (Transitteilungen), bevor sie in die terminale Differenzierung übergeht und dann als nicht mehr teilungsfähige Zelle ihre spezifischen Aufgaben im Gewebe erfüllt. Nach einer biologisch festgelegten Lebensdauer stirbt sie ab. Zwischen fortwährender Zellproduktion und permanentem Zellverlust herrscht ein Gleichgewichtszustand (TROTT et al. 2002, HERRMANN et al. 2006, DÖRR et al. 2007, DÖRR 2009).

Die Zellproduktion in der Zungenschleimhaut unterliegt bei Nagetieren einem ausgeprägtem diurnalem Rhythmus (DÖRR und KUMMERMEHR 1991, POTTEN et al. 2002b). Als Stimulus für die Zellneubildung gilt der oberflächliche Substanzverlust durch mechanische Beanspruchung infolge von Nahrungsaufnahme, gesteuert vom natürlichen Lichtrhythmus (BURHOLT 1986, DÖRR et al. 1993, DÖRR 1997). In Proliferations- und

Metaphasenarrestuntersuchungen wird für die Schleimhaut der Zungenunterseite bei C3H/Neu-Mäusen, welche auch in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, die höchste DNA-Syntheserate zwischen 2.00 Uhr und 4.00 Uhr sowie ein Maximum der Mitoseaktivität um 10.00 Uhr angegeben (DÖRR et al. 1994a, DÖRR und KUMMERMEHR 1991).

Die tägliche Zellproduktion beträgt bei C3H/Neu-Mäusen ca. 85 Zellen/mm Epithellänge bei einer Gesamtzellzahl von 430 Zellen/mm Epithellänge. Das sind 19,4 % der Zellen im Gesamtepithel. Die durchschnittliche Umsatzzeit beträgt für die Germinativschicht 3,6

Tage, für das gesamte Epithel 5,2 Tage (DÖRR und KUMMERMEHR 1991). Man geht davon aus, dass verschiedene Zellkohorten die Zellteilung an unterschiedlichen Tagen durchlaufen. Dabei befinden sich täglich 27 % der Germinativzellen bzw. 20 % der Gesamtzellen in aktiver Proliferation. Die G1-Phase dauert durchschnittlich 2 bis 3 Tage (DÖRR und KUMMERMEHR 1991).

2.7.4 Besonderheiten der Mundschleimhaut des Menschen

Grundsätzlich entspricht der Aufbau der Mundschleimhaut des Menschen demjenigen der Maus. Während bei der Maus die gesamte Mundschleimhaut aus einem verhornenden Plattenepithel besteht, weist die Mundschleimhaut des Menschen nur an mechanisch stark beanspruchten Stellen (Gaumen, Gingiva) eine Keratinisierung auf (MÜLLER 2001). Dieser Unterschied ist aus strahlenbiologischer Sicht jedoch von untergeordneter Bedeutung, da die Strahlenreaktion von Proliferations- und initialen Differenzierungsprozessen dominiert wird und vom terminalen Verhornungsgrad des Epithels weitgehend unabhängig ist. Zudem zeigt auch das humane Epithel bereits früh unter einer fraktionierten Strahlentherapie Verhornungsprozesse (DÖRR, persönliche Mitteilung). Zellkinetische Parameter, Proliferationsverhalten sowie die Strahlenreaktion des Epithelgewebes sind bei Mensch und Maus vergleichbar, so dass die qualitative Übertragung der Ergebnisse von der Maus auf den Menschen gerechtfertigt ist (DÖRR et al. 1994).

Im Epithel der Mundschleimhaut des Menschen variiert die Zellzahl je nach Lokalisation in der Mundhöhle (DÖRR et al. 1995). In Bereichen mit hoher Zelldichte findet auch eine hohe Zellproduktion statt. Die Umsatzzeit des Epithels ist in der gesamten Mundhöhle einheitlich und beträgt ca. 5,7 Tage, vergleichbar mit dem Epithel der Zungenunterseite der Maus (DÖRR et al. 1995, MEYER et al. 1984, SCHROEDER 1981). Zum zirkadianen Rhythmus der Proliferation in der Mundschleimhaut des Menschen liegen relativ wenige Daten vor. WARNAKULASURIYA und MACDONALD (1993) finden ein Maximum der DNA-Synthese gegen 22.00 Uhr. BJARNASON et al. (1999) weisen die höchste S-Phasenaktivität zwischen 11.00 Uhr und 16.00 Uhr nach. Beide Studien stimmen somit nicht überein, möglicherweise durch verschiedene Techniken zur Bestimmung der Zellzyklusphasen oder auch durch individuelle Unterschiede infolge eines unterschiedlichen Schlafverhaltens der Probanden (BJARNASON et al. 1999).

2.8 Strahlenreaktion des Epithels der Mundschleimhaut

2.8.1 Pathogenese der radiogenen oralen Mukositis

Die Strahlenreaktion des Epithels der Mundhöhle ist ein interaktiver Prozess unter Beteiligung aller vorhandenen Zellpopulationen: Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen der Kapillaren und Makrophagen. Die Bestrahlung führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den Zellen, die direkt oder indirekt die DNA schädigen. Verschiedene Transkriptionsfaktoren werden aktiviert, die zur Aktivierung bzw. Modulation einer Vielzahl von Signalkaskaden sowohl im Epithel als auch in den Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen führen (DÖRR et al. 2007). Die Pathogenese der eigentlichen Epithelreaktion ist typisch für ein Umsatzgewebe (siehe Kap. 2.6.1). Die Bestrahlung schränkt die Zellneubildung ein. Da der Zellverlust unbeeinflusst bleibt, tritt eine progressive Zelldepletion (Hypoplasie) des Epithels bis hin zu einem vollständigen Zellverlust (Ulzeration) ein. Die epithelialen Veränderungen sind von einer Gefäßreaktion begleitet, die sich in Entzündungsprozessen manifestiert. Die Reepithelialisierung beginnt bereits vor maximaler Ausprägung der klinischen Symptome und geht von überlebenden Stammzellen im Bestrahlungsfeld oder von einwandernden Stammzellen aus der Umgebung aus. Die Regeneration des Epithels erfolgt außer bei sehr ausgeprägten Reaktionen meist vollständig (DÖRR et al. 2007).

2.8.2 Bedeutung der radiogenen oralen Mukositis

Die orale Mukositis ist eine der schwerwiegendsten frühen Strahlenreaktionen im Kopf-Hals-Bereich (DÖRR 2009). Sie ist vor allem nach der Radio(chemo)therapie von Kopf-Hals-Tumoren, nach einer Ganzkörperbestrahlung zur Konditionierung vor einer Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation bei hämatologischen Erkrankungen sowie nach akzidentieller Strahlenexposition relevant. Die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist mit erheblichen Schmerzen verbunden und kann die Nahrungsaufnahme sowie das Allgemeinbefinden des Patienten deutlich beeinträchtigen (DÖRR et al. 2005). Um Gewichtsverluste des Patienten zu vermeiden, muss die Ernährung über ein PEG (PEG: Perkutanes Endoskopisches Gastrostoma) oder über eine temporäre nasogastrale Sonde erfolgen (DÖRR et al. 2007, 2008, GRÖTZ und DÖRR 2003). Durch das Eindringen von Bakterien über die geschädigte Mundschleimhaut in die Blutbahn sind lokale und systemische Infektionen sowie lebensbedrohlichen Septikämien möglich (DÖRR et al. 2008). Konsekutive Spätfolgen können zusätzlich zur Entstehung von Ödemen, Nekrosen, chronischen Ulzerationen oder Fibrosen führen (DÖRR und HENDRY 2001). Die schmerzhaft Symptomatik der oralen Mukositis führt häufig zur Unterbrechung der onkologischen Therapie für zwei bis vier Wochen. In bis zu 86 % der Fälle ist die orale Mukositis Grund für eine Behandlungspause (HERRMANN et al. 1994). Die Unterbrechung der Tumorthherapie führt zu einer signifikanten Verschlechterung der Heilungsaussichten, da in der Pause die Proliferation der Tumorzellen ungestört ablaufen kann (FOWLER und LINDSTRÖM 1992, FU et al. 2000, OVERGAARD et al. 2003). Die

orale Mukositis ist mit erheblichen Kosten für Krankenhausaufenthalte und Supportivtherapie verbunden. In den USA werden die Behandlungskosten pro Fall auf 1700-6000 \$ geschätzt (DÖRR et al. 2008, ELTING et al. 2007). Für Deutschland müssen vergleichbare Größenordnungen angenommen werden.

2.8.3 Klassifizierung der radiogenen oralen Mukositis

Verschiedene Klassifizierungssysteme sind zur Dokumentation der klinischen Strahlennebenwirkungen beim Menschen etabliert. Sie ermöglichen die Beurteilung der Toxizität einer Strahlentherapie für das Normalgewebe, aber auch der Effektivität prophylaktischer und therapeutischer Maßnahmen. Graduierungssysteme für die radiogene orale Mukositis berücksichtigen in der Regel den Schweregrad, die klinischen Symptome, die Fähigkeit der Aufnahme fester und flüssiger Nahrung sowie subjektive Empfindungen der Patienten. Die Klassifizierungen der WHO (World Health Organisation), der RTOG/EORTC (Radiation Therapy and Oncology Group/European Organisation for Research and Treatment of Cancer) und die CTC (Common Toxicity Terminology Criteria) des National Cancer Institute der USA, in der neusten Version CTC AEv3, sind die gebräuchlichsten Einteilungen (Tab. 3).

MACIEJEWSKI et al. (1991) entwickeln auf Basis des RTOG/EORTC-Klassifizierungssystems eine Graduierung, bei der zusätzlich die flächige Ausdehnung der Schleimhautreaktion berücksichtigt wird (Tab. 4). Die gleichzeitig veränderte Sensitivität der Schweregradeinteilung muss beachtet werden.

Das Klassifizierungssystem von DISCHE (1988) ist detaillierter (Tab. 5). Dabei stellen Schluckbeschwerden, Erythem, Mukositisverteilung und Ulzeration obligate Einteilungskriterien dar, die durch fakultative Kriterien ergänzt werden können. Aufgrund der Detailgenauigkeit und dem damit verbundenen Aufwand für die Beurteilung ist dieses Klassifizierungssystem nur für spezielle klinische Studien zur radiogenen oralen Mukositis geeignet.

Die Verwendung photographischer Darstellungen ist eine Ergänzung für die genannten Klassifizierungssysteme (RIESENBECK et al. 1998).

Die von SONIS et al. (1999) eingeführte OMAS (Oral Mucositis Assessment Scale) zeichnet sich durch eine hohe Korrelation bei unterschiedlichen Untersuchern sowie durch eine hohe Übereinstimmung objektiver Mukositiskriterien und subjektiver Empfindungen des Patienten aus. Allerdings ist dieses Klassifizierungssystem für die Strahlentherapie nicht geeignet, da festgelegte Positionen in der Mundhöhle beurteilt werden, unabhängig davon, ob sie sich im Bestrahlungsvolumen befinden oder nicht.

Tab. 3: Klassifizierungssysteme der WHO, CTC und RTOG/EORTC für die radiogene orale Mukositis beim Menschen (WHO 1979, NCI 2006, SEEGENSCHMIEDT 1998)

	Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
WHO	keine Veränderungen	Entzündung, Rötung	Erythem, Ulzeration, feste Nahrungsaufnahme möglich	Ulzeration, nur flüssige Nahrungsaufnahme möglich	Ulzeration, orale Nahrungsaufnahme nicht möglich
CTC	keine Veränderungen	Entzündung, Erythem, schmerzlose Erosion	stellenweise Erosionen/Pseudomembran, moderate Schmerzen, feste Nahrungsaufnahme möglich	konfluente Ulzeration, starke Schmerzen, nur flüssige Nahrungsaufnahme möglich	Nekrosen, Spontanblutungen, orale Nahrungsaufnahme nicht möglich
RTOG/EORTC	keine Veränderungen	geringes Erythem oder Beläge, geringe Schmerzen	fleckförmige Mukositis mit entzündlichen serosanguinösen Belägen, mäßiger Schmerz, milde Analgetika	konfluierende fibrinöse Mukositis, starke Schmerzen, zentral wirksame Analgetika	Ulzeration, Blutung, Nekrose, starke Schmerzen, zentral wirksame Analgetika

Tab. 4: Modifizierte RTOG/EORTC-Klassifizierung für die frühe radiogene orale Mukositis des Menschen (MACIEJEWSKI et al. 1991)

Schweregrad	Reaktion der Mundschleimhaut	Flächenausdehnung der oralen Mukositis
0	keine Reaktion	keine Reaktion
1,0	mildes Erythem	< 50%
1,5	mildes Erythem	> 50%
2,0	starkes Erythem	< 50%
2,5	starkes Erythem	> 50%
3,0	fleckförmige Mukositis	< 50%
3,5	fleckförmige Mukositis	> 50%
4,0	konfluente Mukositis	< 50%
4,5	konfluente Mukositis	> 50%

Tab. 5: Klassifizierungssystem nach DISCHE (1988) für die radiogene orale Mukositis des Menschen (modifiziert nach RIESENBECK und DÖRR 1998)

Obligate Bewertungskriterien	Bewertung
Schluckschmerzen	0 – keine; 1 – leicht; 2 – mäßig; 3 – schwer
Schluckstörungen	0 – keine 1 – leichte Schluckbeschwerden 2 – erschwertes Schlucken, weiche Nahrung wird benötigt 3 – stark erschwertes Schlucken, nur flüssige Nahrung 4 – sehr starke Beschwerden beim Schlucken flüssiger Nahrung
Erythem	0 – kein Erythem; 1 – leicht; 2 – mäßig; 3 – stark
Mukositis-Verteilung	0 – keine Mukositis; 1 – fleckig; 2 – konfluierend
Ulzeration	0 – keine 1 – oberflächlich 2 – tiefe Gewebeanteile betroffen 3 – knöcherne Anteile betroffen 4 – Fistel
Fakultative Bewertungskriterien	Bewertung
Mukositisfläche	0 – 100 % der bestrahlten Schleimhaut
Membrantyp der Mukositis	0 – ohne Membran 1 – dünn, opaleszierend 2 – mittel 3 – dick
Ödem	0 – kein Ödem; 1 – leicht; 2 – mäßig; 3 – stark
Grad der Dehydrierung	0 – keine; 1 – leicht; 2 – mäßig; 3 – stark
Grad der Intervention	0 – keine 1 – Nasen-Magen-Sonde 2 – intravenöse Flüssigkeitszufuhr 3 – intravenöse Ernährung 4 – andere
Atrophie der Mukosa	0 – keine Atrophie; 1 – leicht; 2 – mäßig; 3 – stark
Blässe der Mukosa	0 – keine; 1 – leicht; 2 – mäßig; 3 – stark
Teleangieektasien	0 – keine, 1 < 1 cm ² ; 2 – 1-4 cm ² , 3 – > 4 cm ²
Schleimhautulzeration	0 – 100 % der bestrahlten Fläche
Tiefe der Ulzeration	0 – 100 % der bestrahlten Schleimhaut
zusätzliche Nekrose	0 – 100 % der bestrahlten Schleimhaut
Geschmacksbeeinträchtigung	0 – keine; 1 – teilweise; 2 – vollständig
Verlorene Behandlungstage	xxx Tage
Mundtrockenheit	0 – keine; 1 – leicht; 2 – mäßig; 3 – stark

2.8.4 Prophylaxe und Therapie der oralen Mukositis

Es existiert eine Fülle von Behandlungsansätzen zur Prophylaxe der oralen Mukositis, aus denen bisher jedoch kein allgemein anwendbares Schema abzuleiten ist (DÖRR et al. 2007). Leitlinien der Fachgesellschaften (FEYER et al. 2006, HARTMANN et al. 2007) sowie umfassende aktuelle Übersichtsarbeiten (EPSTEIN und KLASSER 2006, KEEFE et al. 2007, NAPENAS et al. 2007, SCIUBBA und GOLDENBERG 2006, STOKMAN et al. 2006) dienen als Orientierung.

Im folgenden Abschnitt werden nur erfolgversprechende klinische Ansätze zur Prophylaxe und Therapie der oralen Mukositis dargestellt.

2.8.4.1 Allgemeine Maßnahmen

Die Therapieplanung ist ein wichtiger Teil der Mukositis-Prophylaxe. Es ist darauf zu achten, dass nur eine möglichst kleine Schleimhautfläche bestrahlt wird. Großvolumige Bestrahlungen mit moderaten (> 30 Gy) und hohen Dosen sowie mukotoxische Chemotherapieprotokolle verstärken die orale Mukositis (DÖRR et al. 2007, 2008). Metallhaltige Zahnfüllungen und Zahnersatz bewirken eine zusätzliche Strahlenexposition durch Streustrahlung mit Dosis Spitzen an der Schleimhaut von bis zu 190 % der Normaldosis. An den betroffenen Stellen wird eine schwere Mukositis mit schmerzhaften Ulzerationen provoziert (REITEMEIER et al. 2002, 2004). Zur Vermeidung dieser lokalen Dosis Spitzen sollten Schleimhautretraktoren (Abstandshalter) mit einer Dicke von wenigstens 3 mm angewendet werden (DÖRR et al. 2008).

Nikotin, Alkohol, scharfe, saure, heiße und kalte Speisen und Getränke sowie scharfkantige Nahrung irritieren die Mundschleimhaut zusätzlich, so dass deren Genuss während einer Strahlentherapie unterlassen werden sollte (DÖRR et al. 2007, 2008, RICHTER und FEYERABEND 2002).

Gewichtsverluste des Patienten infolge mangelnder Nahrungsaufnahme sind unbedingt zu vermeiden. Je nach Zustand des Patienten kann das Anlegen eines endoskopischen Gastrostoma oder eine temporäre nasogastrale Sondenernährung in Betracht gezogen werden (DÖRR et al. 2007, 2008, GRÖTZ und DÖRR 2003). Bei bestehenden Schleimhautläsionen ist eine adäquate Schmerzbehandlung, die bei Bedarf auch systemisch durchgeführt werden muss, für das Allgemeinbefinden des Patienten unumgänglich (DÖRR et al. 2007, 2008).

Neben den genannten Maßnahmen ist eine umfassende persönliche Betreuung des Patienten durch Ärzte, Pflegepersonal und Familienangehörige von großer Bedeutung. Ziel ist die langfristige Einbindung des Patienten in ein periradio(chemo)therapeutisches Betreuungskonzept (GRÖTZ 2003). Die intensive Fürsorge wirkt sich positiv auf das Allgemeinbefinden des Patienten aus und führt zu einer signifikanten Reduktion des Bedarfs an Schmerzmitteln und Therapieunterbrechungen (DÖRR et al. 2007, 2008).

2.8.4.2 Zahnsanierung

Die Sanierung der Zähne sowie anderer pathologischer Mundhöhlenbefunde ist vor einer Strahlentherapie unbedingt erforderlich. Bei Patienten mit einem konservierend nicht versorgbaren Zahnstatus ist eine Entfernung aller Zähne notwendig. Eine Röntgenuntersuchung bei bereits zahnlosen Patienten dient der Erkennung von enossalen Befunden (verlagerte Zähne, Osteolysen, Zysten, Wurzelreste usw.), die dann entfernt werden müssen.

Ziel bei Patienten mit akzeptabler Mundhygiene, Zahnfleischtaschen und konservierend therapierbarer Karies ist die Vermeidung einer Entfernung aller Zähne. Zur Zahnsanierung gehört dann die Entfernung aller weichen und harten Beläge an den Zähnen, die Extraktion von avitalen, kariös zerstörten oder teilretinierten Zähnen, die konservierende

Therapie am Restzahnbestand (auch Glättung scharfer Kanten an Zähnen oder Zahnersatz), das Abtragen scharfer Knochenkanten, welche die Integrität der Schleimhaut unter und nach der Bestrahlung gefährden können sowie die chirurgische Sanierung persistierender Epitheldefekte (DÖRR et al. 2008). Zahnärztliche und chirurgische Behandlungen, die mit einer Traumatisierung der Mundschleimhaut einhergehen, sollten während der Strahlentherapie und bis etwa 6 Monate danach vermieden werden. Auf Prothesen muss während der Bestrahlung unbedingt verzichtet werden, da die Druckstellen als Epitheldefekte eine orale Mukositis begünstigen. Die Prothesenkarenz ist trotz intakter Schleimhaut bis zu 6 Monate nach der Strahlentherapie beizubehalten. Die Fluoridierung mittels Fluoridierungsschienen oder Fluorid-Spüllösungen dient dem Schutz vor Karies. Sie ist bereits vor der Strahlentherapie zu beginnen und auch nach der Bestrahlung konsequent weiterzuführen (DÖRR et al. 2007, 2008, HARTMANN et al. 2007).

2.8.4.3 Mundspülungen

Professionelle Mundpflege und Mundspülungen reduzieren die Inzidenz schwerer oraler Mukositiden deutlich. Im Vordergrund steht ein häufiger Spülvorgang - mindestens immer nach jeder Mahlzeit - und die damit verbundene Reinigung der Mundhöhle. Der Inhaltsstoff der Mundspüllösungen ist von untergeordneter Bedeutung (DÖRR et al. 2007, 2008). Spülungen mit klarem Wasser, Salbei-Sud und Polyvidon-Jod werden als wirksam beschrieben (DÖRR et al. 2007, 2008, ADAMIETZ et al. 1998). Benzydamin, ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, zeigt in mehreren klinischen Studien mit Strahlentherapie einen antiinflammatorischen und analgetischen Effekt an der Mundschleimhaut. Allerdings beeinträchtigt der unangenehme Geschmack die Compliance der Patienten (EPSTEIN et al. 1989, KIM et al. 1986, PRADA und CHIESA 1987, SCIUBBA und GOLDENBERG 2006). Die Spülung mit antibiotischen bzw. antimykotischen Lösungen ist für den therapeutischen Einsatz bei Infektionen zu empfehlen. Erstrebenswert ist dabei die regelmäßige Untersuchung von Rachenabstrichen während der Behandlung (DÖRR et al. 2007, 2008, AL-NAWAS und GRÖTZ 2006). Die Pilzinfektion mit *Candida albicans* (Soorstomatitis) tritt relativ häufig auf und ist mit Amphotericin B als Lutschtablette oder alternativ mit Fluconazol zu behandeln (DÖRR et al. 2007, 2008, DÖRR und RIESENBECK 2000, GRÖTZ et al. 2003, RICHTER und FEYERABEND 2002).

2.8.4.4 Kälteapplikation

Die Kälteapplikation, die im radioonkologischen Sprachgebrauch auch als Kryotherapie bezeichnet wird, umfasst das Lutschen von Eistabletten, wobei Wasser, aber auch Salbeisud und andere Lösungen verwendet werden können (DÖRR et al. 2008). Die

Eiswürfel dürfen nicht zu kalt und scharfkantig sein, damit sie nicht an der Schleimhaut kleben oder diese traumatisieren. Die mukoprotektive Wirkung unter Strahlentherapie beruht auf der Erzeugung einer temporären lokalen Sauerstoffunterversorgung. Dadurch ist eine reduzierte Strahlenempfindlichkeit der Schleimhautzellen zu erwarten. Außerdem bewirkt die lokale Kühlung die Reduktion von Schmerzzuständen (DÖRR et al. 2008).

2.8.4.5 Stimulation von Proliferationsvorgängen

Mit chemischer oder mechanischer Ablation oberflächlicher Gewebsschichten ist die Stimulation der Proliferation möglich. Für die lokale Anwendung von Silbernitratlösung (mildes Adstringens) liegen widersprüchliche klinische Daten vor, so dass die Anwendung nicht empfohlen wird (DÖRR et al. 1995, MACIEJEWSKI et al. 1991). Alternativ hat sich das Abtragen oberflächlicher Schleimhautschichten mit einer Laserbehandlung als wirksam erwiesen. Allerdings ist diese Methode sehr aufwendig, was eine allgemeine Empfehlung ebenfalls nicht zulässt (BENSADOUN et al. 1999, COWEN et al. 1997, MIGLIORATI et al. 2006).

Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF), ein Mitglied der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, bewirkt im Epithel u. a. die Zunahme der Zellteilungsaktivität sowie die Modulation von Differenzierungsvorgängen. Für die Prophylaxe der oralen Mukositis steht die trunkierte rekombinante humane Form des KGF ($\Delta 23$ -rHuKGF, Palifermin, Kepivance®) zur Verfügung. Auf der Basis großangelegter klinischer Studien wird die systemische Gabe von KGF im Rahmen der konditionierenden Behandlung vor Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation empfohlen (VON BÜLTZINGLÖWEN et al. 2006, HARTMANN et al. 2007, DÖRR et al. 2007). Dieser Wachstumsfaktor ist Thema der vorliegenden Arbeit und wird deshalb im Kapitel 2.11 ausführlich beschrieben.

2.8.4.6 Reduktion freier Sauerstoffradikale

Die Datenlage zur Wirkung des Radikalfängers Amifostin auf die orale Mukositis ist widersprüchlich. Neuere Metaanalysen zeigen einen positiven Effekt auf die Mundschleimhaut (SASSE et al. 2006, STOKMAN et al. 2006). Einige größere Studien weisen allerdings auch negative Wirkungen des Amifostins auf die orale Mukositis nach (BUENTZEL et al. 2006).

Selen aktiviert oder stimuliert die Glutathion-Peroxidase, die für die Reduktion der Sauerstoffradikale im bestrahlten Gewebe verantwortlich ist. Im Mausmodell wird nach systemischer und topischer Selen-Applikation eine signifikante Reduktion der durch die fraktionierte Bestrahlung induzierten oralen Mukositis beschrieben. Die Wirksamkeit ist vom Applikationszeitpunkt abhängig, so dass neben der Modulation der reaktiven Sauerstoffradikale noch andere Wirkmechanismen vermutet werden (GEHRISCH und DÖRR 2007).

Ein weiterer, noch experimenteller Ansatz zur Prophylaxe der oralen Mukositis ist die Therapie mit Superoxid-Dismutase, einem Enzym, das die Zellen vor reaktiven Sauerstoffradikalen schützt. Durch die organspezifische Transfektion mit dem Gen für Mangan-Superoxid-Dismutase kann im Tiermodell nach Einzeitbestrahlung eine Reduktion der oralen Schleimhautreaktion erzielt werden (GREENBERGER et al. 2003).

2.9 Tiermodelle zur Untersuchung der radiogenen oralen Mukositis

Für strahlenbiologische Untersuchungen der oralen Mukositis sind tierexperimentelle Modelle etabliert. Erste Untersuchungen erfolgten an der Epidermis von Schweinen und Nagern. Allerdings unterscheiden sich Haut und Schleimhaut in Aufbau, Biologie und Proliferationsverhalten, so dass die Ergebnisse nur eingeschränkt auf die Mundschleimhaut übertragen werden können. Heute haben sich die Schleimhaut der Zungenunterseite von Mäusen und Ratten sowie die Schleimhaut der Backentasche von Hamstern als Tiermodell etabliert.

Der histologische Aufbau der oralen Schleimhaut sowie ihre Reaktion auf Strahleninsulte sind bei Mensch und Tiermodell vergleichbar, so dass eine qualitative Übertragung der tierexperimentellen Ergebnisse auf die Situation beim Menschen möglich ist (DÖRR et al. 1994).

2.9.1 Maus

GOEPP und FITCH weisen 1962 erstmals auf die Bedeutung der Mundschleimhaut im Rahmen der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich hin. Sie verwenden die Maus als Tiermodell. Durch Bestrahlung des Kopfes und die daraus resultierenden Veränderungen der Mundschleimhaut ist die Futteraufnahme stark beeinträchtigt. Der Tod der Tiere wird als Endpunkt analysiert.

PARKINS et al. (1983) verwenden die Mäuselippe als Modell für die Untersuchung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut. Endpunkte in diesen Untersuchungen sind lokale Epithelveränderungen, wie Erythem und denudative Läsionen. Die gesamte Schnauze wird bestrahlt, was zu Strahlenreaktionen der gesamten Lippe und großer Teile der Mundhöhle mit einer massiven Beeinträchtigung der Futteraufnahme und signifikanten Gewichtsverlusten führt. Außerdem stellt die Lippe histologisch eine Mischung aus Haut und Schleimhaut dar, wodurch Erkenntnisse nur eingeschränkt auf die reine Mundschleimhaut übertragbar sind.

Die Schleimhaut der Zungenunterseite von Mäusen wird 1986 als Modell für strahlenbiologische Untersuchungen eingeführt (MOSES und KUMMERMEHR 1986). Endpunkt der Strahlenreaktion ist die Bildung ulzerativer Läsionen im Epithel. Durch die ausgeprägten Schleimhautläsionen an Zungenspitze und -rändern wird jedoch die Futteraufnahme der Tiere beeinträchtigt, was zu einem deutlichen Gewichtsverlust der Tiere führt. Bei fraktionierter Bestrahlung führt die wiederholte Manipulation an der Zunge

zu Schädigungen des Gewebes, was potentiell die Strahlenreaktion des Epithels beeinträchtigen kann. Um die Belastungen der Mäuse zu minimieren, modifiziert DÖRR (1987) dieses Modell und schränkt das Bestrahlungsfeld der Zungenunterseite auf ein Testfeld von 3 mm x 3 mm ein. Dadurch wird die Futteraufnahme der Tiere nicht beeinflusst und Gewichtsverluste werden vermieden. Um bei fraktionierter Bestrahlung eine wiederholte Irritation der Zunge zu vermeiden, etabliert DÖRR (1987) die externe Schnauzenbestrahlung. Die Strahlendosis wird dabei so gewählt, dass im Zungenepithel nur subklinische Schäden entstehen. Durch eine lokale Aufsättigungsbestrahlung (Top-up-Bestrahlung), die nur auf das oben beschriebene Testfeld der Zungenunterseite beschränkt bleibt, wird anschließend ein klinisch sichtbarer Schaden (Ulzeration) induziert.

2.9.2 Ratte

DÖRR (1987) etabliert analog zur Zungenschleimhaut der Maus das Modell der Zungenschleimhaut der Ratte. Die Größe der Rattenzunge ist bezüglich der Ausweitung des Testfeldes und der besseren Beurteilung der Strahlenreaktion von Vorteil. REZVANI und ROSS (2004) verwenden dieses Modell für Untersuchungen zur oralen Mukositis nach Einzeitbestrahlung. Zwei Studien zur fraktionierten Bestrahlung liegen vor (CASSATT et al. 2003, 2005).

2.9.3 Hamster

SONIS et al. (1990) etablieren die Hamster-Backentasche zur Untersuchung der oralen Mukositis. Die Backentasche ist leicht zugänglich und bietet eine ausreichend große Fläche zur Beobachtung der Schleimhautreaktion. Allerdings ist zusätzlich ein mechanisches und schwer zu standardisierendes Trauma notwendig, um eine klinische Mukositis auszulösen. Es existieren mehrere Studien zur Untersuchung der strahleninduzierten oralen Mukositis nach Einzeitbestrahlung (SONIS et al. 2000, 2002, 2004) und fraktionierter Bestrahlung (ARA et al. 2008, MURPHY et al. 2008). Das Modell wird v. a. zur Untersuchung Chemotherapie-assoziiertes epithelialer Strahlenfolgen eingesetzt (SONIS et al. 1990, 1992, 1994, 1995, 1997, 1997a).

2.10 Einflussfaktoren der Strahlenempfindlichkeit

Vier strahlenbiologische Faktoren bestimmen die Strahlentoleranz von Geweben. Sie werden von WITHERS (1975) als die „4 R der Radiotherapie“ (Recovery, Repopulierung, Redistribution, Reoxygenierung) bezeichnet. Die intrinsische Radiosensibilität der Gewebe wird von STEEL (2002) als fünftes „R“ eingeführt. DÖRR (2009b) fügt dem das bestrahlte Volumen als ein sechstes „R“ hinzu.

2.10.1 Intrinsische Radiosensibilität

Die intrinsische Radiosensibilität beschreibt die genetisch determinierte Empfindlichkeit von Zellen bzw. Geweben gegenüber ionisierender Bestrahlung (DÖRR 1997, HERRMANN et al. 2006). Das Epithel der Mundschleimhaut zeigt einen hierarchischen Aufbau mit unbegrenzt teilungsfähigen Stammzellen, begrenzt teilungsfähigen Transitzellen sowie ausdifferenzierten teilungsunfähigen Funktionszellen (siehe Kap. 2.7.3). Im strahlenbiologischen Sinn sind Stammzellen diejenigen Zellen, die nach einer Strahlenexposition alle Zellpopulationen und damit die Gewebsstruktur wiederherstellen können (DÖRR 2009). Die Anzahl und intrinsische Strahlenempfindlichkeit der Stammzellen bestimmen damit die Strahlentoleranz eines Gewebes (DÖRR 1997, 2009, HERRMANN et al. 2006, TROTT et al. 2002). Das Stammzellkonzept ist ein funktionelles Konzept, da bisher für die große Masse der Gewebe keine morphologischen Merkmale oder andere Kriterien zur Erkennung von Stammzellen identifiziert werden konnten (CLAUSEN und POTTEN 1990, DÖRR 1997, 2009, DÖRR und TROTT 2000, TROTT et al. 2002). In der Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus sind wahrscheinlich alle proliferierenden Zellen Stammzellen (DÖRR 1997). Transitzellen und differenzierende Zellen haben keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit des Gewebes.

Die Produktion einer unbegrenzten Nachkommenschaft ist Kriterium für das Überleben einer Stammzelle (Klonogenität, Koloniebildungsfähigkeit). Als klonogene Zellen werden bei in vitro Untersuchungen (Koloniebildungstest) diejenigen Zellen definiert, die befähigt sind, Kolonien mit mehr als 50 Tochterzellen zu bilden. Die Überlebensrate klonogener Zellen nach einer Bestrahlung wird in Abhängigkeit von der Strahlendosis als Zellüberlebenskurven dargestellt und durch eine linear-quadratische Funktion beschrieben:

$$SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

Hierbei ist SF die Überlebensrate (surviving fraction) und D die applizierte Dosis. Die Parameter α und β sind zellspezifische Konstanten. Die halblogarithmische Darstellung resultiert in einer typischen Schulterkurve (Abb. 2, HERRMANN et al. 2006).

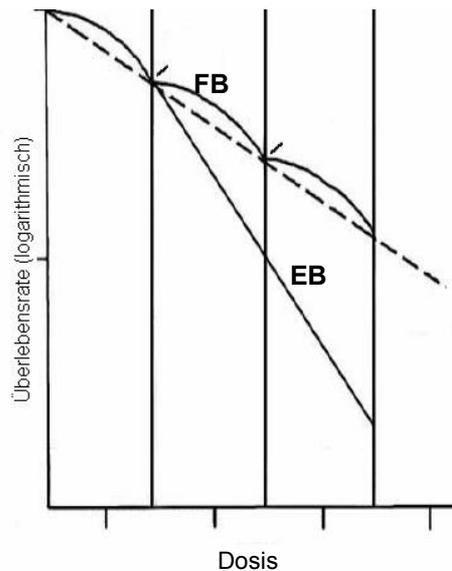


Abb. 2 Zellüberlebenskurven nach Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung (modifiziert nach HERRMANN et al. 2006)

Der Verlauf zeigt bei geringen Strahlendosen eine „Schulter“. Bei hohen Dosen geht die Kurve bei einer Einzeitbestrahlung (EB) in einen exponentiellen Verlauf über, der in der halblogarithmischen Darstellung eine gerade Linie zeigt. Die Aufteilung in Einzeldosen bei fraktionierter Bestrahlung (FB) führt bei einem ausreichenden zeitlichen Abstand der Fraktionen zu einer Restitution der „Schulter“.

Als Maß für die intrinsische Radiosensibilität gilt beispielsweise die Überlebensrate der Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy (SF2). Außerdem dient zur Charakterisierung der zellulären Strahlenempfindlichkeit die mittlere Überlebensdosis D_0 (Dosis, die im exponentiellen Teil einer Zellüberlebenskurve eine Überlebensrate von 37 % bewirkt). Zur Beschreibung der Strahlenempfindlichkeit von Keratinozyten können nach DÖRR (1997) durchschnittliche Werte von $\alpha = 0,2 \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = 0,02 \text{ Gy}^{-2}$ angenommen werden. Somit beträgt die durchschnittliche Überlebensrate für 2 Gy 62 % und für 3 Gy 46 %.

2.10.2 Recovery (Erholung)

Als Recovery wird die Fähigkeit von Zellen und Geweben bezeichnet, einen Teil einer applizierten Dosis zu kompensieren (Fraktionierungseffekt). Grundlage ist die Induktion von zwei Arten von Schäden durch eine Bestrahlung: (1) primär zytoletale Schäden, (2) subletale Schäden, die erst bei räumlicher und zeitlicher Interaktion miteinander zum Zelltod führen. Subletale Strahlenschäden können durch Erholungsprozesse zwischen den Fraktionen beseitigt werden und stehen somit bei der nächsten Fraktion nicht mehr für Interaktionen zur Verfügung. Dadurch erhöht sich die Gesamtdosis, die zum Erreichen eines bestimmten Effekts (einer bestimmten Zellabtötungsrate) notwendig ist (DÖRR und TROTT 2000, HERRMANN et al. 2006, THAMES und HENDRY 1987). Die Erholung von subletalen Schäden kann quantitativ mit dem linear-quadratischen Modell der Strahlenwirkung von THAMES und HENDRY (1987) beschrieben werden. Die

gewebsspezifische Erholungskapazität wird durch den so genannten α/β -Wert charakterisiert. Je geringer dieser Wert, desto größer ist der Fraktionierungseffekt eines bestimmten Gewebes. Der durchschnittliche α/β -Wert für die Mundschleimhaut ist mit ca. 10 Gy relativ hoch (DÖRR 1997). Der Fraktionierungseffekt ist somit gering, aber signifikant nachweisbar (DÖRR et al. 1993, PABST et al. 2004). Somit beeinflussen Erholungsvorgänge die Strahlenempfindlichkeit der Mundschleimhaut, sind aber von untergeordneter Bedeutung. Der zeitliche Ablauf der Erholungsvorgänge folgt einer exponentiellen Kinetik und lässt sich mit der Halbwertszeit quantitativ beschreiben. Im Nagermodell für Normalgewebe werden Halbwertszeiten von 1 Stunde bis 3 Stunden bestimmt. In klinischen Analysen liegen die Halbwertszeiten für einige Spätfolgen (ZNS) bei 4 bis 5 Stunden oder länger. In der Klinik gilt deshalb, dass ein Intervall zwischen den Fraktionen von mindestens 6 bis 8 Stunden eingehalten werden soll (HERRMANN et al. 2006, RICHTER und FEYERABEND 2002).

2.10.3 Repopulierung

Repopulierung beschreibt die regenerative Antwort von früh reagierenden Geweben (und Tumoren) auf eine fraktionierte, zeitlich ausgedehnte Bestrahlung. Sie ist durch eine Zunahme der Strahlentoleranz bei zunehmender Gesamtbehandlungszeit gekennzeichnet (DÖRR 2009). Der Prozess der Repopulierung ist sehr komplex und basiert auf einer tiefgreifenden Umgestaltung der proliferierenden Organisation des Gewebes. Er umfasst die Bildung von zwei neuen Stammzellen pro Teilung, anstatt der Bildung einer Stamm- und einer letztendlich differenzierenden Zelle (symmetrische Stammzellteilung, Asymmetrieverlust), die Beschleunigung der Stammzellteilung (Akzeleration) und die begrenzte Teilungsfähigkeit (abortive Teilungen) letal bestrahlter Zellen (DÖRR 1997a, DÖRR 2003, DÖRR 2009). Repopulierungsvorgänge beginnen mit einer initialen Verzögerung nach Beginn der Strahlentherapie. Im Zungenepithel der Maus und auch in der humanen Mundschleimhaut setzt die Repopulierung am Ende der ersten Bestrahlungswoche einer konventionell fraktionierten Strahlentherapie ein (DÖRR 1997). Die Regulation des Repopulierungsprozesses ist nicht vollständig geklärt. Die strahlenbedingte Verminderung der Gesamtzellzahl sowie autoregulative Prozesse im Stammzellkompartiment scheinen dabei von Bedeutung zu sein (DÖRR 1997a, 2003, 2009).

2.10.4 Redistribution

Die Strahlenempfindlichkeit der Zellen variiert zwischen den Zellzyklusphasen (HERRMANN et al. 2006). Sie ist üblicherweise in der G2- und der Mitosephase am höchsten, in der späten G1- und der S-Phase am geringsten (HERRMANN et al. 2006). Bei einer Bestrahlung werden hauptsächlich Zellen in den strahlensensiblen Phasen

abgetötet und es bleibt eine erhöhte Fraktion von strahlenresistenten Zellen übrig. Zudem erfolgt eine reversible Blockade der überlebenden Zellen am Übergang der G₂- zur Mitosephase („G₂- oder Mitoseblock“), wodurch die Zellen die weiteren Zyklusphasen synchron durchlaufen. Nach einer gewissen Zeit kommt es zu einer Desynchronisation, d.h. die Zellen verteilen sich wieder auf die verschiedenen Zellzyklusphasen (Redistribution). Ursache sind die (geringen) Unterschiede in der Zellzyklusdauer (WITHERS 1972). Bei fraktionierter Strahlentherapie ist für die Mundschleimhaut der Einfluss von Zellzykluseffekten nicht auszuschließen (DÖRR et al. 1993). Sie sind aber experimentell nur schwer zu erfassen.

2.10.5 Reoxygenierung

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist während der Bestrahlung von der Sauerstoffkonzentration im Gewebe abhängig. Zellen, die gut mit Sauerstoff versorgt sind, sind bis zu dreimal strahlenempfindlicher als anoxische Zellen (HERRMANN et al. 2006). Bei einer Bestrahlung werden zunächst die mit Sauerstoff gut versorgten Zellen abgetötet. Eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung hypoxischer Areale folgt. Begründet ist dies durch eine Verringerung der Entfernung hypoxischer Zellen von den Kapillaren durch die Tumorschrumpfung, durch die verbesserte Mikrozirkulation bei sinkendem Tumorgewebsdruck, sowie die Öffnung temporär verschlossener Gefäße (HERRMANN et al. 2006, JOINER und WOUTERS 2009). Reoxygenierungsprozesse sind für die Strahlenreaktion von Normalgeweben von untergeordneter Bedeutung, da dort normalerweise keine oder nur ein kleiner konstanter Teil der Zellen hypoxisch ist. Dies wurde experimentell für die Mundschleimhaut bestätigt (DÖRR 1987).

2.10.6 Volumeneffekt

Aufgrund der verbesserten Qualität der Strahlenapplikation, die mit einer zunehmenden Konformation des Hochdosisvolumens im Tumervolumen einhergeht, werden zunehmend Inhomogenitäten in der Dosisverteilung innerhalb der Organe beobachtet (DÖRR und VAN DER KOGEL 2009). WITHERS et al. (1988) entwickeln ein Modell, in dem ein Organ in „funktionelle Untereinheiten“ (FSU) geteilt wird. Die Bestrahlung kann zur Sterilisation der FSU führen. Die FSU können im exponierten Gewebe parallel oder in Serie angeordnet sein. In Organen mit paralleler Anordnung der FSU, z.B. in Lunge, Niere oder Leber, muss erst eine kritische Anzahl an FSUs durch die Bestrahlung geschädigt werden, bevor radiogen induzierte Nebenwirkungen manifest werden. Das Risiko für Strahlenfolgen ist von der Verteilung der Gesamtdosis innerhalb des Organs und weniger von den einzelnen Dosis Spitzen (sog. „hot spots“) abhängig. Sind die FSUs seriell angeordnet (z.B. Rückenmark, Schleimhaut des Darmes und Ösophagus), wird die Funktion des Organs von jedem einzelnen FSU bestimmt, wodurch das Risiko für Nebenwirkungen von den einzelnen Dosis Spitzen bestimmt wird. Die Schädigung eines

einzelnen FSU kann zur Inaktivierung des gesamten Organs führen. Die Dosisverteilung im Gewebe ist nicht relevant. In der Realität ist kein Organ strikt parallel bzw. seriell aufgebaut, sondern es existieren Mischungen aus beiden Arrangements der FSUs (DÖRR und VAN DER KOGEL 2009).

Für die orale Mukosa zeigt sich für Volumeneffekte ein Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung der Mukositis und der exponierten Fläche bzw. der Lokalisation des bestrahlten Areals. Zum Beispiel führt ein Ausschluss der Lippen aus dem Hochdosisvolumen zur signifikanten Verminderung akuter Nebenwirkungen der oralen Mukosa (DÖRR und VAN DER KOGEL 2009).

2.11 Palifermin

Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) ist Mitglied der heparinbindenden Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und wird alternativ auch als FGF-7 bezeichnet (FINCH et al. 1989). KGF wird erstmals 1989 aus Fibroblasten der humanen embryonalen Lunge isoliert. Er stellt eine hitze- und säurelabile Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa dar (RUBIN et al. 1989). Der Wachstumsfaktor wird von mesenchymalen Zellen, im Wesentlichen von Fibroblasten, synthetisiert. Er bindet an spezifische Oberflächenrezeptoren (KGF-R) von Epithelzellen (RUBIN et al. 1995), wo er die Proliferation und Differenzierung der Zellen verschiedener Epithelgewebe (z.B. Epidermis und Haarfollikel, orales und gastrointestinales Schleimhautepithel, Lungenepithel, Urothel, Prostataepithel, Drüsenepithel, Corneaepithel) reguliert. KGF gilt daher als parakriner Mediator zwischen mesenchymalen und epithelialen Geweben (RUBIN et al. 1995).

Zur Verbesserung der Proteinestabilität entwickelte das Pharmaunternehmen AMGEN Inc. durch Entfernung der ersten 23N-terminalen Aminosäuren die trunkierte rekombinante humane Form des KGF (Δ 23-rHuKGF, Palifermin). Palifermin ist als Kepivance[®] seit 2004 in den USA (FDA 2004) und seit 2005 in der EU (EMA 2005) für die Anwendung am Menschen zur Prophylaxe der oralen Mukositis im Rahmen der Konditionierungsbehandlung vor Knochenmark- und Stammzelltransplantation zugelassen.

Etwa 90 % sowohl der DNA als auch der Proteinstruktur des Ratten- und des menschlichen KGF stimmen überein. Das KGF der Ratte ist nahezu identisch mit dem der Maus. Dies erklärt die Effektivität des humanen KGF im Mausmodell (DÖRR et al. 2002). Im Folgenden werden präklinische und klinische Ergebnisse zur Wirkung von Palifermin in Bezug auf die orale Mukositis zusammengefasst.

2.11.1 Einfluss von Palifermin auf unbehandeltes Epithel

Eine Vielzahl von in vitro Untersuchungen zeigen die proliferations- und migrationsstimulierende Wirkung von Palifermin auf humane epitheliale und fetale Alveolarepithelzellen (PANOS et al. 1993, RUBIN et al. 1995, DÖRR 2003a), auf Alveolarepithelzellen

der Ratten (PANOS et al. 1993), auf Epithelzellen der oralen Mukosa der Maus (LACMANN et al. 1999, DÖRR und LACMANN 2001), auf Keratinozyten der Mäuseepidermis und der humanen Epidermis (DÖRR 2003a, NING et al. 1998, GIBBS et al. 2000) sowie auf humanes Riechepithel (HILLE et al. 2003). Die Applikation von Palifermin führt bei in vitro rekonstruierter Mundschleimhaut der Maus zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl und Epitheldicke (LACMANN et al. 1999, DÖRR und LACMANN 2001).

Viele tierexperimentelle Studien am Epithel der murinen Mundschleimhaut (FARRELL et al. 1999, POTTEN et al. 2002, BORGES et al. 2006), der Zungen- und Ösophagus-schleimhaut (FARRELL et al. 1999), der Darm-Schleimhaut (FARRELL et al. 1998), der Lunge (ULICH et al. 1994), der Milchdrüse (ULICH et al. 1994a), der Pankreasgänge (YI et al. 1994) sowie der Harnblase (YI et al. 1995) bestätigen den stimulierenden Effekt von Palifermin auf Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen. Eine deutliche Dickenzunahme des Epithels der Zunge, der Wange, des Ösophagus und des Darmes bei Mäusen in Folge einer Palifermin-Applikation wird beschrieben (FARRELL et al. 1998, 1999, BORGES et al. 2006).

FARRELL et al. (1999) finden in elektronenmikroskopischen Untersuchungen am Zungenepithel von BDF1-Mäusen einen Anstieg der Desmosomendichte und -länge sowie der Anzahl von Keratohyalin granula nach Palifermin-Applikation. POTTEN et al. (2002) zeigen im Zungenepithel von BDF1-Mäusen eine Zunahme des Zellvolumens nach Palifermin-Applikation (5 mg/kg s.c.) und führen diese auf die Ödematisierung der Zellen und Induktion von Differenzierungsprodukten zurück.

Die im Überschuss produzierten Zellen in der Mundschleimhaut (Maus) werden nach Ende der Palifermin-Gabe durch Apoptose mit der maximalen Aktivität 2 Tage nach der letzten Palifermin-Injektion abgebaut (DÖRR und LACMANN 2001, DÖRR et al. 2000). Dieser programmierte Zelltod kommt in Plattenepithelien sonst sehr selten vor. Bei Mensch und Maus beträgt der normale Apoptoseindex in der Mundschleimhaut ca. 0,1 % (DÖRR 2003a, DÖRR et al. 2000).

2.11.2 Einfluss von Palifermin auf das Zungenepithel bei Einzeitbestrahlung

2.11.2.1 In vitro Untersuchungen

SLONINA et al. (2001) beschreiben nach Palifermin-Applikation und Einzeitbestrahlung (2 Gy) eine signifikante Zunahme der Koloniegröße (Zunahme der Zellzahl in den Kolonien) bei unveränderter Kolonienanzahl von humanen Keratinozyten in Zellkultur.

Nach Palifermin-Applikation vor und nach einer Einzeitbestrahlung kommt es zu einer Reduktion der Strahlenantwort der in vitro rekonstruierten Mukosa. Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ohne Palifermin-Gabe wird eine Zunahme der Zellzahl und Epitheldicke beobachtet (DÖRR und LACMANN 2001).

2.11.2.2 In vivo Untersuchungen

Tierexperimentelle Untersuchungen demonstrieren den positiven Effekt von Palifermin auf das bestrahlte Zungenepithel von Mäusen in Abhängigkeit vom Tag der Palifermin-Applikation. DÖRR et al. (2001) untersuchen die Häufigkeit und den zeitlichen Verlauf strahleninduzierter Ulzerationen im Epithel der Zungenunterseite von C3H/Neu-Mäusen nach Einzeitbestrahlung und zusätzlicher Palifermin-Applikation. Palifermin (5 mg/kg s.c.) wird an drei aufeinander folgenden Tagen vor der Einzeitbestrahlung (Tag -3 bis -1 und Tag -4 bis -2), an drei und fünf aufeinander folgenden Tagen nach der Einzeitbestrahlung (Tag 0 bis +2 und Tag 0 bis +5) sowie kontinuierlich von Tag -3 bis Tag +1 appliziert. Der stärkste mukoprotektive Effekt tritt bei dreitägiger Palifermin-Applikation nach der Bestrahlung bzw. bei kontinuierlicher Gabe auf. Zusätzlich beeinflusst die Palifermin-Applikation die Latenzzeit bis zum Auftreten einer ulzerativen Läsion. Wird Palifermin nur vor der Bestrahlung verabreicht, treten ulzerative Läsionen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung etwa ein bis zwei Tage später auf. Wird Palifermin dagegen nur nach der Bestrahlung injiziert, ist die Latenzzeit im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung signifikant um ca. drei Tage verkürzt. Die Ulkusdauer wird nicht beeinflusst.

In den Untersuchungen von KILIC et al. (2007) erhöht eine dreitägige Palifermin-Gabe (5 mg/kg s.c./Tag) nach der Einzeitbestrahlung signifikant die Strahlentoleranz des Zungenepithels von C3H/Neu-Mäusen ($ED_{50} = 19,4 \pm 1,7$ Gy vs. Kontrolle $11,6 \pm 1,2$ Gy, $p < 0,0001$). Wird Palifermin dagegen in einer Dosis von 15 mg/kg s.c. nur an einem Tag appliziert, ist die Strahlentoleranz im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung kaum verändert.

Das Potential von Palifermin zur Reduktion der radiogenen oralen Mukositis in Kombination mit Einzeitbestrahlung wird von RAJEWSKI (2009) im gleichen Tiermodell geprüft. Palifermin wird dabei einmalig (15 mg/kg s.c.) oder mehrmalig (5 mg/kg s.c.) vor oder nach der Bestrahlung appliziert. Vor der Einzeitbestrahlung ist die mukoprotektive Wirkung einer Palifermin-Applikation an drei aufeinander folgenden Tagen deutlich stärker als eine ein- bzw. zweitägige Gabe. Der Effekt ist umso ausgeprägter, je geringer der zeitliche Abstand der Palifermin-Injektion zum Bestrahlungstag ist. Die Latenzzeit bis zum Auftreten einer ulzerativen Läsion im Epithel und die Ulkusdauer werden nicht beeinflusst. Auch bei Palifermin-Gabe nach der Einzeitbestrahlung, erhöht eine dreitägige Injektion die Strahlentoleranz des Epithels stärker als eine zweitägige Applikation. Auch hier ist die Wirkung umso größer, je kürzer der zeitliche Abstand zwischen dem Bestrahlungstag und der ersten Palifermin-Applikation ist. Auffällig ist die verkürzte Latenzzeit im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung.

DÖRR et al. (2002a) untersuchen den Effekt von Palifermin auf ein strahleninduziertes klinisch manifestes Ulkus. Palifermin (5 mg/kg s.c.) wird ab dem Tag der ersten Ulkusdiagnose bis zur vollständigen Reepithelialisierung (maximal 5 Applikationen) verabreicht. Schweregrad und Dauer der ulzerativen Läsion werden nicht modifiziert. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass eine effektive Reduktion der Schleimhautreaktion die Palifermin-Gabe bereits vor dem Auftreten der ulzerativen Läsionen erfordert.

2.11.3 Einfluss von Palifermin auf das Zungenepithel bei fraktionierter Bestrahlung

In den Untersuchungen zur Wirkung von Palifermin bei fraktionierter Bestrahlung werden Fraktionen von 3 Gy an fünf aufeinander folgenden Tagen (Tag 0 bis +4) verabreicht (DÖRR et al. 2002). Es erfolgt eine dreitägige Palifermin-Applikation (5 mg/kg s.c./Tag) vor der Bestrahlung (Tag -4 bis -2, Tag -3 bis -1), während der Bestrahlung (Tag 0 bis +2, Tag 0 bis +4), nach der Bestrahlung (Tag +4 bis +6, Tag +4 bis +8) sowie vor und während der Bestrahlung (Tag -3 bis +1). Zusätzlich werden einmalige Palifermin-Injektionen (5 mg/kg oder 15 mg/kg s.c.) am Tag -1 oder Tag +4 verabreicht. Palifermin vermindert die Strahlenreaktion des Epithels in allen Behandlungsprotokollen. Der stärkste mukoprotektive Effekt wird bei Palifermin-Applikation nach der fraktionierten Bestrahlung (Tag +4 bis +6) beobachtet. Die Wirkung einer einmaligen Palifermin-Gabe (5 mg/kg) auf die Strahlentoleranz des Epithels ist mit der einer dreitägigen Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag) vergleichbar. Bei höherer Dosierung ist der mukoprotektive Effekt einer einmaligen Palifermin-Injektion (15 mg/kg) deutlich größer als eine Palifermin-Gabe an drei aufeinander folgenden Tagen (3 x 5 mg/kg/Tag). Außerdem resultiert eine einmalige Palifermin-Dosis von 15 mg/kg s.c. in einer höheren Strahlentoleranz im Vergleich zu einer einmaligen Palifermin-Dosis von 5 mg/kg. Dies weist auf einen Dosiseffekt von Palifermin hin.

In weiteren Untersuchungen variieren DÖRR et al. (2005b) die Anzahl der Palifermin-Applikationen vor der Bestrahlung oder in der Bestrahlungspause am Wochenende. Die fraktionierte Bestrahlung erfolgt über 2 Wochen (Tag 0 bis +4, Tag +7 bis +11). Eine einmal wöchentliche Palifermin-Applikation (5 mg/kg) am 1. und 2. Wochenende, sowie eine Woche später (Tag +4, + 11, +18) erhöht die Strahlentoleranz des Epithels am stärksten. Eine vierte Injektion vor Beginn der Bestrahlung (Tag -3) hat keinen zusätzlichen Effekt.

DÖRR et al. (2005a) untersuchen den Effekt verschiedener Palifermin-Dosierungen auf die Strahlentoleranz des Zungenepithels von Mäusen. Sie applizieren Palifermin in einer Dosis von 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 22,5 mg/kg und 30 mg/kg s.c. vor der Strahlentherapie (Tag -3), am 1. Wochenende (Tag +4), am 2. Wochenende (Tag +11) oder 1 Woche später (Tag +18). Bereits eine Palifermin-Dosis von 1 mg/kg induziert eine signifikante Erhöhung des ED₅₀-Wertes für die Induktion ulzerativer Läsionen im Zungenepithel. Die stärkste mukoprotektive Wirkung wird bei Palifermin-Dosen von 15 mg/kg s.c. und 22,5 mg/kg s.c. registriert.

2.11.4 Einfluss von Palifermin auf das Zungenepithel bei Radiochemotherapie

Dörr et al. (2005c) demonstrieren am Epithel der Zungenunterseite von C3H/Neu-Mäusen die Wirkung einer Palifermin-Applikation (5 mg/kg) in Kombination mit Bestrahlung und Chemotherapie (Cisplatin, 5-Fluorouracil). Erfolgt die Strahlentherapie als Einzeitbestrahlung werden die Zytostatika 30 min vor der Bestrahlung injiziert. Palifermin

wird an drei aufeinander folgenden Tagen vor der Bestrahlung (Tag -3,-2,-1), nach der Bestrahlung (Tag +1,+2,+3) sowie vor und nach der Bestrahlung (Tag -3,-2,-1,+1,+2,+3) appliziert. Die Toleranz des Epithels für eine Radiochemotherapie ist nach Palifermin-Gabe signifikant größer als ohne Palifermin-Applikation.

In weiteren Untersuchungen werden die Zytostatika in Kombination mit einer fraktionierten Bestrahlung verabreicht. Erfolgt die Chemotherapie in der ersten Bestrahlungswoche (Tag 0 bis +4) wird Palifermin vor der Strahlentherapie (Tag -2) und am Ende der ersten Bestrahlungswoche (Tag +4) bzw. in einer weiteren Untersuchung zusätzlich am Tag +11 appliziert. Die Palifermin-Gabe an den Tagen -2 und +4 verändert die Strahlentoleranz des Epithels nicht. Dagegen ist die Strahlentoleranz des Epithels signifikant erhöht, wenn Palifermin zusätzlich eine Woche später am Tag +11 appliziert wird.

Erfolgt die Chemotherapie erst in der zweiten Bestrahlungswoche, wird Palifermin am Ende der ersten und zweiten Bestrahlungswoche (Tag +4,+11) sowie in einer weiteren Untersuchung zusätzlich am Tag +18 appliziert. In einer letzten Untersuchung wird Palifermin außerdem vor der Strahlentherapie am Tag -3 verabreicht. Die Palifermin-Gabe erhöht in allen Versuchsarmen im Vergleich zur alleinigen Radiochemotherapie signifikant die Strahlentoleranz des Epithels. Dabei ist der Effekt etwas schwächer im Vergleich zur Anwendung von Palifermin in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung ohne zusätzliche Chemotherapie.

Die dargestellten Befunde zeigen, dass die Behandlung mit Palifermin eine effektive Methode zur Beeinflussung der oralen Mukositis nach einer Radiochemotherapie ist.

2.11.5 Klinische Studien zur Wirkung von Palifermin

2.11.5.1 Gesunde Probanden

SERDAR et al. (1997) untersuchen die pharmakokinetischen Eigenschaften von Palifermin in einer placebo-kontrollierten doppelt blinden Studie mit 61 gesunden Probanden. Palifermin wird einmalig bzw. an drei aufeinander folgenden Tagen in einer Dosis von 0.2, 1.0, 5.0, 10.0 oder 20.0 µg/kg intravenös appliziert. In Biopsien der bukkalen Schleimhaut wird anhand der Anzahl mitotischer Figuren und der Bestimmung von Ki67 die proliferative Aktivität der Epithelzellen nach Palifermin-Applikation charakterisiert. Eine signifikante Zunahme der proliferativen Aktivität der Epithelzellen wird erst ab einer Palifermin-Dosis von 5 µg/kg an drei aufeinander folgenden Tagen nachgewiesen. Die Probanden tolerieren Palifermin sehr gut. Es werden keine schweren klinischen Nebenwirkungen beobachtet. Palifermin wird nach Applikation schnell resorbiert. Die Halbwertszeit von Palifermin im Serum der Probanden beträgt 4 Stunden.

2.11.5.2 Palifermin in der Therapie hämatologischer Tumoren

DURRANT et al. (1999) untersuchen die Wirkung von Palifermin in einer placebo-kontrollierten Studie mit 234 Lymphom-Patienten bei Hochdosis-Chemotherapie (BCNU,

Etoposid, Arabinosyl-Cytosin, Melphalan) und nachfolgender autologer Stammzelltransplantation. Palifermin wird in einer Dosierung von 5, 20, 40, 60 oder 80 µg/kg an drei aufeinander folgenden Tagen vor und/oder nach der Chemotherapie intravenös appliziert. Etwa die Hälfte der mit einem Placebo behandelten Patienten erkranken an einer oralen Mukositis Grad 2 bis 4 der WHO-Klassifikation. Die Schleimhautreaktion bleibt durchschnittlich 4,6 Tage bestehen. Dagegen tritt die orale Mukositis gleichen Grades nur bei etwa 13 % der mit Palifermin (60 µg/kg) behandelten Patienten auf und hält durchschnittlich nur 0,8 Tage an. Obwohl auch die höchste Palifermin-Dosis von 80 µg/kg noch sehr gut von den Patienten toleriert wird, wird eine Dosis von 60 µg/kg für weitere Untersuchungen empfohlen.

Bei 129 Patienten mit hämatologischen Tumoren erfolgt die Konditionierungstherapie mit einer Ganzkörperbestrahlung (12 Gy) und Chemotherapie (Etoposid oder Cyclophosphamid), gefolgt von einer autologen Transplantation peripherer Blutvorläuferzellen (SPIELBERGER et al. 2001). Zusätzlich werden zwei Gruppen der Patienten mit Palifermin behandelt. Gruppe 1 erhält Palifermin (60 µg/kg) intravenös an drei aufeinander folgenden Tagen unmittelbar vor und nach der konditionierenden Therapie, bei Gruppe 2 wird Palifermin (60 µg/kg i.v.) nur an den drei Tagen vor der Konditionierung appliziert. Die Dauer der oralen Mukositis reduziert sich unter Palifermin-Applikation deutlich. Während die Schleimhautreaktion ohne Palifermin 7 bis 8 Tage manifest ist, hält sie mit Palifermin-Gabe durchschnittlich 4 bis 5 Tage an. Der stärkste Effekt wird bei Patienten beobachtet, die vor und nach der zytotoxischen Therapie mit Palifermin behandelt werden.

Die klinische Prüfung Phase III erfolgt an 212 Patienten mit hämatologischen malignen Erkrankungen, die mit einer myelotoxischen Hochdosistherapie (fraktionierte Ganzkörperbestrahlung, Chemotherapie mit Etoposid und Cyclophosphamid), gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation behandelt werden (SPIELBERGER et al. 2004). Die Hälfte der Patienten erhält Palifermin (60 µg/kg) an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Radiochemotherapie intravenös appliziert, die andere Hälfte der Patienten bekommt Placebo. In der Placebo-Gruppe entwickeln 98 % eine orale Mukositis Grad 3 bis 4 (WHO-Skala), die durchschnittlich 9 Tage besteht. Nach Behandlung mit Palifermin zeigen nur 63 % der Patienten eine solche Reaktion mit einer Dauer von durchschnittlich 6 Tagen. In der Palifermingruppe sind die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Sprechvermögen weniger beeinträchtigt. Analgetika müssen zur Verringerung der Schmerzen nur durchschnittlich 7 Tage angewendet werden, während in der Placebo-Gruppe der Bedarf über 11 Tage besteht.

NASILOWSKA-ADAMSKA et al. (2007) prüfen die Wirkung von Palifermin auf die Häufigkeit und Dauer einer oralen Mukositis sowie auf den Bedarf an Analgetika und parenteraler Ernährung. Palifermin (60 µg/kg/Tag) wird bei 53 Patienten mit hämatologischen Tumoren an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach einer Konditionierung vor Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation verabreicht. Die Inzidenz der oralen Mukositis (WHO Grad 3 bis 4) wird durch die Palifermin-Behandlung signifikant reduziert (13 % vs 43 % in der Kontrollgruppe) und die Dauer der oralen Mukositis ist nach Palifermin-Applikation signifikant verkürzt (4 Tage vs 9 Tage in der Kontrollgruppe). Nur

32 % der Patienten in der Palifermin-Gruppe benötigen Analgetika, während es in der Kontrollgruppe 75,5 % sind. Eine parenterale Ernährung ist nach Palifermin-Behandlung bei 11 % der Patienten (45 % in der Kontrollgruppe) notwendig.

Zehn Patienten mit akuter B-Zell-lymphatischer Leukämie und aggressivem B-Zell-Lymphom werden mit einer Chemotherapie in Form von hochdosiertem Methotrexat behandelt (SCHMIDT et al. 2008). Palifermin wird in einer Dosierung von 30 µg/kg bis 60 µg/kg täglich intravenös verabreicht. Der Schweregrad der oralen Mukositis ist nach Palifermin-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert. Während ohne Palifermin die Schleimhautreaktion für durchschnittlich 12,9 Tage bestehen bleibt, ist sie nach Palifermin-Applikation mit durchschnittlich 11 Tagen kürzer. Außerdem kann der Bedarf an Schmerzmitteln auf 25 % reduziert werden.

2.11.5.3 Palifermin in der Therapie kolorektaler Karzinome

CLARKE et al. (2001) prüfen die Wirksamkeit von Palifermin in 64 Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom, welche eine Chemotherapie (5-Fluorouracil, Leucovorin) erhalten. Palifermin wird täglich in einer Dosierung von 40 µg/kg intravenös an drei aufeinander folgenden Tagen vor der Therapie appliziert. Die Häufigkeit (32 %) und Dauer (durchschnittlich 3,4 Tage) der oralen Mukositis Grad 2 bis 4 (WHO-Klassifikation) kann im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Häufigkeit 78 %, durchschnittliche Dauer 10,2 Tage) deutlich reduziert werden.

Untersuchungen von MEROPOL et al. (2003) mit 84 Patienten mit einem metastasiertem kolorektalen Karzinom zeigen ähnliche Ergebnisse. Palifermin wird wiederum an drei aufeinander folgenden Tagen vor der Chemotherapie (5-Fluorouracil, Leucovorin) in einer täglichen Dosierung von 1 µg/kg bis 80 µg/kg intravenös verabreicht. Es wird eine Reduktion der oralen Mukositis Grad 2 bis 4 (WHO-Klassifikation) von 63 % (Placebo-Gruppe) auf 43 % (Palifermin-Gruppe) beobachtet. Ein Effekt tritt bereits bei einer täglichen Palifermin-Dosis von 10 µg/kg intravenös auf.

ROSEN et al. (2006) registrieren ebenfalls eine deutlich verminderte Häufigkeit einer oralen Mukositis (WHO Grad 2 bis 4) bei 64 Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom, die Palifermin in einer Dosierung von 40 µg/kg intravenös an drei aufeinander folgenden Tagen vor einer Chemotherapie (5-Fluorouracil, Leucovorin) erhalten. Nach einem ersten Chemotherapie-Zyklus leiden 61 % der Patienten in der Placebogruppe an einer oralen Mukositis, während es in der Palifermin-Gruppe nur 47 % sind.

2.11.5.4 Palifermin in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren

Ein weiterer Wirkungsnachweis von Palifermin erfolgt bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, die kombiniert mit fraktionierter Bestrahlung (Gesamtdosis 72,5 Gy) und Chemotherapie (5-Fluorouracil, Cisplatin) behandelt werden (BRIZEL et al. 2001). Die Patienten erhalten 20, 40, 60 oder 80 µg/kg Palifermin täglich intravenös an drei aufeinander fol-

genden Tagen oder einmalig drei Tage vor der Radiochemotherapie und danach ein Mal wöchentlich (maximal 10 Applikationen). Die Dauer der oralen Mukositis Grad 3 bis 4 (RTOG/EORTC-Klassifikation) wird von durchschnittlich 11 Tagen in der Placebo-Gruppe auf 6,5 Tage in der Palifermin-Gruppe reduziert.

HENKE et al. (2008) untersuchen die Wirksamkeit von Palifermin bei 186 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, die postoperativ mit fraktionierter Bestrahlung (Gesamtdosis 60 Gy) und Chemotherapie (Cisplatin) behandelt werden. Palifermin (120 µg/kg i.v.) wird, beginnend drei Tage vor der Behandlung, ein Mal wöchentlich bis zum Ende der

Radiochemotherapie appliziert. Die Häufigkeit und Dauer schwerer oraler Mukositiden (WHO Grad 3 oder 4) wird durch die Palifermin-Gabe signifikant reduziert. Während etwa 67 % der Patienten in der Placebo-Gruppe (Beginn am Tag 32 der Strahlentherapie) an oraler Mukositis erkranken, sind es in der Palifermin-Gruppe nur 51 % (Beginn am Tag 45).

2.11.6 Nebenwirkungen einer Palifermin-Behandlung

In allen klinischen Studien werden übereinstimmend leichte bis moderate und reversible unerwünschte Wirkungen der Palifermin-Behandlung dokumentiert. Am häufigsten treten Ausschlag, Juckreiz und Erythem der Haut, Schwellung und Verfärbung der Mundschleimhaut sowie Geschmacksveränderungen auf. Auch Ödeme, Gelenkschmerzen und Fieber werden beobachtet. Zusätzlich wird in allen Untersuchungen von einem transienten, asymptomatischen Anstieg der Amylase und Lipase im Serum berichtet (SERDAR et al. 1997, DURRANT et al. 1999, CLARKE et al. 2001, BRIZEL et al. 2001, SPIELBERGER et al. 2001, 2004, MEROPOL et al. 2003). In den Untersuchungen von BRIZEL et al. (2001) und SPIELBERGER et al. (2004) gab es jeweils einen Patienten mit schwerem Hautausschlag nach Palifermingabe.

3 Material und Methoden

Das tierexperimentelle Versuchsvorhaben wurde vom Regierungspräsidium Dresden als zuständiger Behörde gemäß der aktuellen Tierschutzgesetzgebung genehmigt (Aktenzeichen 24-9168.11-1-2004-7).

3.1 Versuchstiere

Für die vorliegenden Untersuchungen werden männliche und weibliche Mäuse des Inzucht-Stammes C3H/Neu aus der Zucht des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden eingesetzt. Zu Versuchsbeginn sind die Tiere zwischen 8 und 17 Wochen alt. Jedes Tier erhält eine Kennzeichnung mittels Ohrmarkierung. Die Mäuse werden in den Räumen des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Die bei den Tieren getesteten Keime und Parasiten sind im Anhang (Kap. 9.1) aufgelistet. Ein Lichtprogramm steuert in den Halteräumen einen Hell-Dunkel-Rhythmus (Hellphase von 6 Uhr bis 18 Uhr). Die Raumtemperatur beträgt 21°C bis 25°C, die relative Luftfeuchtigkeit 55 % bis 60 %.

Die Haltung der Mäuse erfolgt in Kunststoffkäfigen der Größe 3 (Makrolon®, Fa. Tecniplast Pereg GmbH, Waldkraiburg) mit maximal 10 Tieren pro Käfig. Die Einstreu besteht aus Sägespänen (sniff-Bedding $\frac{3}{4}$ Faser, sniff Spezialitäten GmbH, Soest). Pelletiertes Mäuse-Standardfutter (Altromin 1326, Altromin GmbH, Lage) und chloriertes Wasser (Trinkwasserqualität) aus Standard-Kunststoff-Trinkflaschen stehen den Mäusen zur freien Verfügung.

3.2 Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite

3.2.1 Bestrahlungsanlage

Eine Weichstrahl-Röntgenröhre vom Typ DARPAC 150-MC (Fa. Forward Raytech Ltd., Swindon, UK) dient der lokalen Bestrahlung der Zungenunterseite der Mäuse (Abb. 3). Sie wird mit einer Röhrenspannung von 25 kV und einem Röhrenstrom von 20 mA betrieben. Der Filter besteht aus 0,3 mm Aluminium. Im Fokus-Objekt-Abstand von 15,5 cm beträgt die Dosisleistung 4,43 Gy/min. Der Strahlengang ist vertikal.

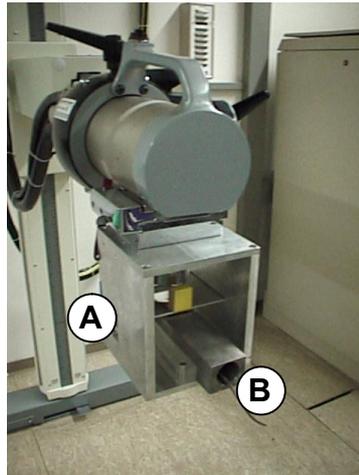


Abb. 3: Bestrahlungsanlage zur lokalen Einzeitbestrahlung der Zungenunterseite

Die Abbildung zeigt die Weichstrahlröntgenröhre vom Typ DARPAC 150-MC (Fa. Forward Raytech Ltd., Swindon, UK). Unter dem Strahlenaustrittsfenster der Röntgenröhre ist für die Bestrahlung der Zungenunterseite von Mäusen die entsprechende Halterung (A) angebracht. In der Halterung befindet sich der mit der Maus bestückte Aluminiumblock (B) zur Bestrahlung (siehe 3.2.3).

3.2.2 Dosimetrie

Das Röntgengerät DARPAC 150-MC wird auch zur Bestrahlung von Patienten verwendet. Es unterliegt daher den strahlenphysikalischen Qualitätskontrollmaßnahmen der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie. Medizinerphysiker der Klinik kontrollieren in regelmäßigen Abständen die Dosisleistung. Sie verwenden dafür eine Ionisationskammer für weiche Röntgenstrahlung vom Typ 23342 (Fa. PTW Freiburg) mit einem Volumen von $0,02 \text{ cm}^3$, die an ein Dosimeter UNIDOS 10001 (Fa. PTW, Freiburg) angeschlossen ist. In umfangreichen Dosimetrie-Testreihen wird die Konstanz der Dosisleistung nachgewiesen. So kann die gewünschte Dosis durch Vorwahl der Bestrahlungszeit definiert werden. Nach Ablauf der eingestellten Bestrahlungszeit schaltet sich die Anlage automatisch ab.

3.2.3 Versuchsdurchführung

Die Bestrahlung der Zungenunterseite erfordert die Ruhigstellung der Tiere mit Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®], Fa. Merial, Halbergmoos), verdünnt in physiologischer Kochsalzlösung (1+18). Die Injektion erfolgt intraperitoneal in einer Dosierung von 60 mg/kg. Die Narkosedauer beträgt durchschnittlich 60 min.

Zur Abschirmung des Tierkörpers wird ein quaderförmiger Aluminiumblock (13 cm x 4 cm x 3,2 cm) verwendet, der im Zentrum mit einer zylindrischen Bohrung (Durchmesser 2,5 cm) versehen ist (Abb. 4). Der Aluminiumblock wird vor der Bestrahlung mittels eines

Heizkissens auf etwa 35 °C erwärmt, um ein Auskühlen der anästhesierten Tiere zu verhindern.

Nach Vorverlagerung der Zunge aus der Mundhöhle mit einer feinen Pinzette werden die Tiere in Rückenlage in die zylindrische Bohrung des Aluminiumblockes gelegt. Die Zunge wird durch eine runde Öffnung (Durchmesser 3 mm) im Dach des Blockes mit einer Pinzette nach außen gezogen und dann mit der Zungenoberseite dem Block angelegt. Ihre Fixierung erfolgt auf Doppelklebeband. Zusätzlich wird die Zungenspitze mit einem Pflasterstreifen am Block befestigt (Abb. 4). Der Kopf des Tieres wird mit einem Styroporkeil unterstützt, um Zug am Zungengrund und damit eine Beeinträchtigung der Blutversorgung der Zunge zu vermeiden.

Das Bestrahlungsfeld von 3 mm x 3 mm wird durch ein Fenster in einem Aluminiumplättchen (4 cm x 2 cm x 0,01 cm) definiert. Dieses wird zentral auf der Zungenunterseite positioniert, so dass Zungenspitze und –ränder abgeschirmt sind (Abb. 4). Die Seitenränder des Aluminiumplättchens sind auf einer Breite von 1 cm um 1 mm erhöht, um eine Kompression der Zunge zu vermeiden. Der mit dem Tier beladene Aluminiumblock wird entlang von Führungsleisten in eine Halterung eingeführt. Die Halterung ist fest unter dem Röhrenfenster der Bestrahlungsanlage fixiert (Abb. 3). Damit wird eine standardisierte Position der Zungenunterseite im Zentralstrahl gewährleistet.

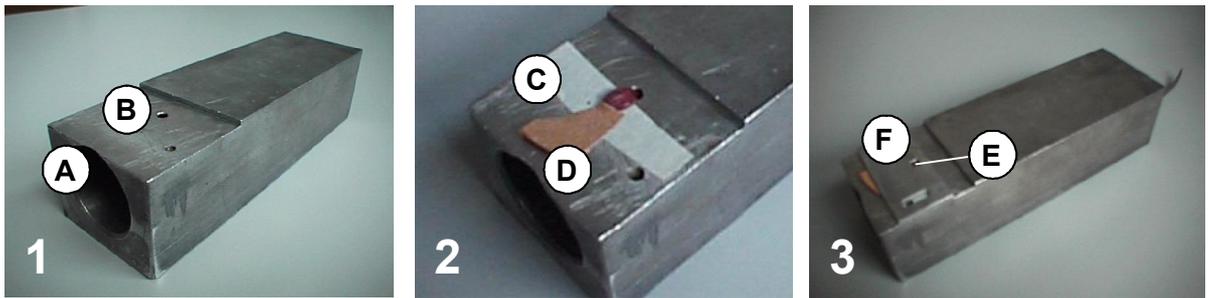


Abb. 4: Aluminiumblock zur Abschirmung des Tierkörpers (Bild 1), Positionierung der Mäusezunge (Bild 2) und Definition des Bestrahlungsfeldes (Bild 3)

- 1 Aluminiumblock mit zentraler Bohrung (A) und Öffnung (B) in der Oberseite
- 2 Die Maus wird in Rückenlage in die Bohrung (A) des Aluminiumblockes gelegt, die Zunge des Tieres mit einer Pinzette vorsichtig durch die Öffnung (B) gezogen und dann so geführt, dass die Zungenoberseite dem Block anliegt und die Zungenunterseite exponiert ist. Die Fixierung der Zunge erfolgt auf Doppelklebeband (C) und mit Pflaster (D).
- 3 Das Bestrahlungsfenster (E) von 3 mm x3 mm auf der Zungenunterseite wird durch ein Aluminiumplättchen (F) definiert.

3.3 Palifermin

Für die vorliegenden Untersuchungen wird eine trunkierte rekombinante Form des humanen KGF ($\Delta 23$ -rHuKGF, Palifermin) verwendet, die von AMGEN Inc., Thousand Oaks (USA), zur Verfügung gestellt wird. Palifermin wird in Escherichia coli produziert und

liegt nach der Reinigung als Lyophilisat vor. Zur Herstellung der Injektionslösung für die eigenen Untersuchungen werden 6,25 mg Palifermin in 1,25 ml eines Lösungsmittels aus

Tween 20 und sterilem Wasser gelöst. Die Lösung wird an jedem Injektionstag frisch hergestellt und mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-DULBECCO 1x, Biochrom AG Berlin) auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die Injektion erfolgt subkutan in die Nackenfalte der Tiere.

3.4 Beschreibung der durchgeführten Versuche

Die Protokolle der Untersuchungen zum Einfluss von Palifermin auf die Strahlenreaktion des Epithels der Zungenunterseite sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Untersuchungen zum Einfluss von Palifermin auf die Strahlenreaktion des Epithels der Zungenunterseite von Mäusen

Die Einzelbestrahlung erfolgt am Tag 0. Palifermin wird an bis zu drei aufeinander folgenden Tagen unmittelbar vor (Tag -3,-2,-1) und nach der Einzelbestrahlung (Tag +1,+2,+3) subkutan injiziert. Erfolgt die Palifermin-Applikation an nur einem Tag vor bzw. nach der Bestrahlung, werden 15 mg/kg Palifermin s.c. verabreicht (X). Wird Palifermin an mehr als einem Tag vor bzw. nach der Bestrahlung injiziert, beträgt die applizierte Palifermin-Dosis 5 mg/kg s.c. (x).

Versuchsnummer	Palifermin-Applikation (Tag)							Strahlendosis (Gy)
	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	
Kontrollversuch K								6, 9, 10, 12, 15
Standardanwendung								
P 1	x	x	x		x	x	x	15, 18, 20, 22, 25
P 2.1	x	x			x	x	x	15, 18, 20, 22, 25
P 2.2		x	x		x	x	x	15, 18, 20, 22, 25
P 3.1	X				x	x	x	15, 18, 20, 22, 25
P 3.2		X			x	x	x	18, 21, 23, 25, 28
P 3.3			X		x	x	x	15, 18, 20, 22, 25
P 4.1	x	x	x		x	x		15, 18, 20, 22, 25, 27, 29, 31
P 4.2	x	x	x			x	x	25, 27, 29, 31, 35
P 5.1	x	x	x		X			17, 20, 22, 24, 27
P 5.2	x	x	x			X		25, 27, 29, 31, 35
P 5.3	x	x	x				X	25, 27, 29, 31, 35
P 6	X						X	25, 27, 29, 31, 35

3.4.1 Alleinige Einzeitbestrahlung (Versuch K)

Ziel dieses Kontrollversuchs ist die Bestimmung der Strahlentoleranz des Epithels der Zungenunterseite und die Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Schleimhautreaktion nach Einzeitbestrahlung. Fünfzig Mäuse werden auf fünf Strahlendosisgruppen mit je 10 Tieren aufgeteilt und die einzelnen Gruppen mit 6 Gy, 9 Gy, 10 Gy, 12 Gy oder 15 Gy bestrahlt (Versuch K, Tab. 6).

3.4.2 Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation (Versuchsreihe P)

Zwölf Versuche mit verschiedenen Protokollen der Palifermin-Applikation werden durchgeführt. Die Protokolle sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Jeder Versuch umfasst 50 Mäuse, aufgeteilt in Dosis-Gruppen zu je zehn Tieren. Die Bestrahlung erfolgt am Tag 0.

3.4.2.1 Palifermin-Applikation an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Einzeitbestrahlung (Standardanwendung, Versuch P 1)

Palifermin wird in einer Dosis von 5 mg/kg subkutan an drei aufeinander folgenden Tagen unmittelbar vor und nach der Einzeitbestrahlung (Tag -3,-2,-1,+1,+2,+3) appliziert. Die applizierten Strahlendosen sind in Tabelle 6 angegeben. Dieses Protokoll entspricht der klinischen Anwendung beim Menschen im Rahmen der Therapie hämatologischer Tumoren.

3.4.2.2 Modifikation der Palifermin-Applikation vor der Einzeitbestrahlung (Versuche P 2.x, P 3.x)

Die Injektion von Palifermin erfolgt an zwei Tagen (P 2.x: Tag -3,-2 bzw. Tag -2,-1) oder nur an einem Tag (P 3.x: Tag -3, -2 bzw. -1) subkutan unmittelbar vor der Einzeitbestrahlung. Nach der Bestrahlung wird Palifermin an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag +1,+2,+3; 5 mg/kg/Tag) appliziert. Erfolgt die Palifermin-Applikation vor der Bestrahlung an zwei Tagen, beträgt die applizierte Palifermin-Dosis 5 mg/kg/Tag. Wird dagegen Palifermin vor der Bestrahlung an nur einem Tag verabreicht, beträgt die Dosis 15 mg/kg/Tag. Die applizierten Strahlendosen sind in Tabelle 6 angegeben.

3.4.2.3 Modifikation der Palifermin-Applikation nach der Einzeitbestrahlung (Versuch P 4.x, P 5.x)

Während vor der Einzeitbestrahlung die dreitägige Palifermin-Applikation (Tag -3,-2,-1; 5 mg/kg/Tag) beibehalten wird, erfolgt die subkutane Palifermin-Gabe nach der Bestrahlung

nur an zwei Tagen (P 4.x: Tag +1,+2 bzw. Tag +2,+3) oder nur an einem Tag (P 5.x: Tag +1, +2 bzw. +3). Erfolgt die Palifermin-Applikation nach der Bestrahlung an zwei Tagen, beträgt die applizierte Palifermin-Dosis 5 mg/kg/Tag. Wird dagegen Palifermin nach der Bestrahlung nur an einem Tag verabreicht, beträgt die Dosis 15 mg/kg/Tag. Die angewendeten Strahlendosen sind in Tabelle 6 angegeben.

Für den Versuch P 4.1 mit der Palifermin-Gabe an den drei Tagen vor sowie an den ersten beiden Tagen nach der Bestrahlung (Tag -3,-2,-1,+1,+2) werden drei weitere Strahlendosen (27 Gy, 29 Gy, 31 Gy) mit je zehn Tieren verwendet, da die Strahlendosis von 25 Gy für eine Induktion von ulzerativen Läsionen in der Zungenunterseite zur Erstellung einer Dosis-Effekt-Kurve nicht ausreicht.

3.4.2.4 Palifermin-Applikation an einem Tag vor und nach der Einzeitbestrahlung (Versuch P 6)

Palifermin wird an einem Tag vor und nach der Einzeitbestrahlung (Tag -3,+3) subkutan appliziert. Die Dosierung beträgt 15 mg/kg. Die angewendeten Strahlendosen sind in Tabelle 6 angegeben.

3.5 Klinische Beurteilung der Strahlenreaktion

Die makroskopische Beurteilung der strahleninduzierten Veränderungen der Zungenunterseite erfolgt unter Narkose zur Immobilisierung (Pentobarbital-Natrium, Narcoren[®], Fa. Merial, Halbergmoos, 60 mg/kg intraperitoneal). Die Zunge der anästhesierten Tiere wird mit einer Pinzette vorsichtig ohne Berührung der bestrahlten Fläche aus der Mundhöhle vorgelagert und die Veränderungen der Zungenunterseite werden mit bloßem Auge unter Kunstlicht beurteilt. Erfasst wird die vermehrte Schuppenbildung (Desquamation), die ein raues Aussehen der Zungenoberfläche mit drei Schweregraden (+, ++, +++) zur Folge hat. Das Auftreten ulzerativer Läsionen wird als Ja/Nein-Antwort protokolliert. Die Dokumentation der Strahlenreaktionen erfolgt täglich ab dem Auftreten der ersten klinischen Veränderungen bis zur vollständigen Reepithelialisierung der Läsionen.

3.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Statistical Analysis System (SAS), Version 9.13 Service Pack 3 (SAS Institute Inc. 1990).

3.6.1 Dosis-Effekt-Beziehungen

Das Auftreten ulzerativer Läsionen ist dosisabhängig und wird als quantaler Endpunkt für die Erstellung von Dosis-Effekt-Beziehungen verwendet. Die Dosis-Effekt-Analyse erfolgt mittels Probit-Analyse (SAS PROC PROBIT) auf der Basis einer logarithmischen Verteilungsfunktion (Logit-Analyse) ohne Annahme einer Schwellendosis (SAS Institute Inc. 1990, SCHUEMER et al. 1990). Aus der Probit-Analyse resultieren sigmoide Dosis-Effekt-Kurven, die durch den ED₅₀-Wert (Dosis, bei der bei 50 % der Tiere ein Ulkus zu erwarten ist) mit seiner Standardabweichung σ und dem 95 %-Vertrauensbereich charakterisiert werden.

Der Vergleich von Dosis-Effekt-Kurven erfolgt mit Hilfe des Likelihood-Ratio-Tests unter Verwendung des Logit-Modells (SAS Institute 1990, SCHUEMER et al. 1990). Ein p-Wert < 0,05 wird als statistisch signifikant definiert. Der Anstieg der ED₅₀ durch die Anwendung von Palifermin im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung wird durch den Dosis-Modifikations-Faktor (DMF) wiedergegeben. Dieser Faktor gibt das Verhältnis des ED₅₀-Wertes mit Palifermin-Gabe im Vergleich zum ED₅₀-Wert des unbehandelten Epithels wieder.

3.6.2 Zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion

Die Latenzzeit und die Ulkusdauer dienen als Parameter für den zeitlichen Verlauf der ulzerativen Läsionen. Die *Latenzzeit* ist der Zeitraum zwischen Bestrahlung und der erstmaligen Diagnose des Ulkus, die *Ulkusdauer* die Zeit von der ersten Diagnose einer Ulzeration bis zur klinischen Heilung. Mittlere Latenzzeit und mittlere Ulkusdauer werden als arithmetische Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD) für die einzelnen Dosisgruppen der Versuche sowie für alle Reagenten innerhalb der einzelnen Versuche berechnet (SAS PROC MEANS). Die Bewertung der Dosisabhängigkeit erfolgt mit einer linearen Regressions-Analyse (SAS PROC GLM). Zum Vergleich von Mittelwerten dient eine Analyse mittels t-Test (SAS PROC TTEST).

3.7 Histologische Untersuchungen

3.7.1 Versuchsprotokoll

Die Protokolle der histologischen Untersuchung sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Histologische Untersuchungen erfolgen nach alleiniger Einzeitbestrahlung (13 Gy, Versuch HK) oder nach subkutaner Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag) an drei aufeinander folgenden Tagen unmittelbar vor und nach der Bestrahlung (24 Gy, Versuch HP1), an drei aufeinander folgenden Tagen unmittelbar vor der Bestrahlung (25 Gy, Versuch HP2) und an drei aufeinander folgenden Tagen unmittelbar nach der Bestrahlung (21 Gy, Versuch HP3). Die Palifermin-Applikation an den drei Tagen vor und nach der Bestrahlung wird auch hier als Standardanwendung bezeichnet, da dieses Schema der

Palifermin-Behandlung in der Humanmedizin entspricht. Die verwendeten Dosen sind in Bezug auf die Ulkusinduktion isoeffektiv (ED_{80}).

Im Untersuchungszeitraum von Tag -3 bis Tag 15 (Versuche HP1, HP2) bzw. Tag 0 bis Tag 15 (Versuche HK, HP3) werden täglich um 10.00 Uhr drei Mäuse getötet, ihre Zungen entnommen, präpariert, fixiert und der histologischen Untersuchung zugeführt. Der Zeitpunkt der Zungenentnahme richtet sich dabei nach dem diurnalen Rhythmus der Zellproduktion in der unbestrahlten Zungenschleimhaut (siehe Kap. 2.7.3). Erfolgt die Tötung der Tiere bis Tag 9 nach Bestrahlung, wird die gesamte Zungenunterseite ohne Abdeckung durch das Aluminiumblättchen bestrahlt, da bei diesen Tieren keine klinisch manifeste Schleimhautreaktion erwartet wird. Werden die Mäuse später getötet, erfolgt die übliche Begrenzung des Bestrahlungsfeldes auf 3 mm x 3 mm (siehe 3.2.3). In diesen Fällen wird nur der bestrahlte Bereich histologisch ausgewertet.

Tab. 7: Versuchdesign der histologischen Untersuchungen

Palifermin (5 mg/kg/Tag) wird an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Bestrahlung (Tag -3,-2,-1,+1,+2,+3, Versuch HP1, Standardanwendung), an drei aufeinander folgenden Tagen nur vor der Bestrahlung (Tag -3,-2,-1, Versuch HP2) oder an drei aufeinander folgenden Tagen ausschließlich nach der Bestrahlung (Tag +1,+2,+3, Versuch HP3) appliziert. Die Kontrolltiere (Versuch HK) werden nur bestrahlt und nicht mit Palifermin behandelt. Die Einzelbestrahlung erfolgt am Tag 0. An jedem Untersuchungstag werden 3 Mäuse getötet. Die Strahlendosis in den einzelnen Versuchen ist isoeffektiv für die Ulkusinduktion (ED_{80}).

Versuch	Strahlendosis (Gy)	Palifermin-Applikation (Tage vor bzw. nach der Bestrahlung)	Untersuchungszeitraum (Tage)
Kontrolle HK	13	-	0 bis +15
Palifermin-Versuche			
Standardanwendung HP1	24	-3, -2, -1, +1, +2, +3	-3 bis +15
HP2	25	-3, -2, -1	-3 bis +15
HP3	21	+1, +2, +3	0 bis +15

3.7.2 Präparation der Zunge und Herstellung histologischer Schnitte

Die Mäuse werden durch Dislokation im Atlantookzipitalgelenk getötet und die Zunge wird mit einer Schere am Zungengrund abgetrennt. Die Zungen werden für mindestens 24 Stunden in Formalin fixiert und anschließend mit einer Rasierklinge median geteilt. Danach erfolgt eine automatisierte Dehydrierung der Präparate in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen in einer Histokinette® (Leica EG 1160, Fa. Leica, Nussloch). Die Präparate werden anschließend in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Rotationsmikrotom 2065, Fa. Reichert-Jung, Nussloch) werden sagittale Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt.

Die Färbung der Präparate mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) erfolgt nach dem in Tabelle 8 dargestellten Protokoll. Die Reagenzien sind im Anhang (Kap. 9.2) aufgelistet.

Tab. 8: Protokoll der HE-Färbung

Dauer	Arbeitsschritt
3 x 10 min	Xylol
je 1 min	absteigende Alkoholkonzentrationen
1 min	Aqua dest.
17 min	Mayers Hämalaun
5-10 min	fließendes Leitungswasser
8 min	Eosinlösung
kurz eintauchen	Ethanol 96 %
kurz eintauchen	Ethanol absolutus
kurz eintauchen	Xylol
eindecken	Entellan

3.8 Histologische Auswertung

Das Epithel wird mit einem Lichtmikroskop (Axioplan, Fa. Carl Zeiss Jena) bei einer 400-fachen Vergrößerung beurteilt. In jedem Präparat wird die Anzahl der kernhaltigen Zellen des gesamten Epithels, sowie separat der Germinativschicht und der funktionellen Schicht bestimmt. Die Auswertung dieser Parameter umfasst mindestens 2 mm Epithel pro Schnitt. Es erfolgt eine Normierung der Werte auf 1 mm Epithellänge. Weiterhin wird die Dicke des Gesamtepithels sowie der einzelnen Epithelschichten (Germinativschicht, funktionelle Schicht, Keratinschicht) in drei verschiedenen Gesichtsfeldern unter Verwendung eines quadratischen Zählrasters mit 5 x 5 Quadraten (Seitenlänge je Quadrat 50 µm) gemessen. Die Änderung des relativen Zellvolumens wird als Index aus der jeweiligen Schichtdicke und Zellzahl der Germinativschicht berechnet. Die Bezugsgröße für die Darstellung von Veränderungen des Zellvolumens nach Bestrahlung und Palifermin-Applikation ist die Germinativschicht des unbehandelten Epithels unbestrahlter Kontrolltiere (Kontrollwert, KW; KLAMMT 2005). Die Berechnung des Zellvolumens erfolgt nach der Formel:

$$RV = \frac{D / KW_D}{Z / KW_Z} \times 100$$

RV	Relatives Zellvolumen (%)
D	Schichtdicke der Germinativschicht (µm)
Z	Zellzahl (Anzahl Zellen der Germinativschicht/mm Epithellänge)
KW _D	Kontrollwert (Schichtdicke der Germinativschicht eines unbehandelten Epithels, µm)
KW _Z	Kontrollwert (Zellzahl der Germinativschicht eines unbehandelten Epithels/mm Epithellänge)

4 Ergebnisse

4.1 Strahlenreaktion des Epithels der Zungenunterseite

4.1.1 Klinische Veränderungen und zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion

Erste Strahlenreaktionen der Mundschleimhaut in Form einer diffusen Rötung und Schwellung der gesamten Zungenunterseite werden fünf bis sechs Tage nach der Bestrahlung sichtbar. Zwei Tage später ist der bestrahlte Bereich der Zunge durch ein raues und schuppiges Aussehen (vermehrte Desquamation) deutlich von der unbestrahlten Schleimhaut abgrenzbar. Abbildung 5 zeigt eine ulzerative Läsion. Derartige Reaktionen, die von einer Pseudomembran bedeckt sind, sind ab Tag 9 nach der Bestrahlung sichtbar (Abb. 6). Die durchschnittliche Latenzzeit beträgt $10,0 \pm 0,7$ Tage (Abb. 7). Sie ist unabhängig von der Strahlendosis ($p = 0,8292$). Die Ulzerationen bleiben durchschnittlich $3,4 \pm 1,0$ Tage bestehen. Die Ulkusdauer wird nur tendenziell von der Strahlendosis beeinflusst ($p = 0,09$, Abb. 7). Am Tag 15 ist das Epithel makroskopisch wieder vollständig hergestellt (Abb. 6) und nicht mehr von einer unbehandelten Schleimhaut zu unterscheiden.

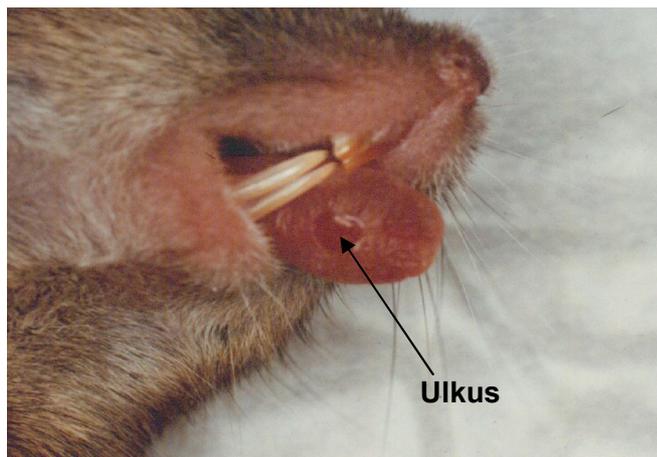


Abb. 5: Ulzerative Läsion der Zungenunterseite (Quelle: DÖRR 1997, mit Erlaubnis)

Die Abbildung zeigt eine ulzerative Veränderung der Zungenunterseite einer Maus am Tag 12 nach lokaler Einzeitbestrahlung mit 16 Gy. Die Läsion ist eindeutig auf das Bestrahlungsfeld beschränkt. Zur besseren photographischen Dokumentation wurde die Pseudomembran entfernt. Dies ist in den Versuchen zur Diagnosestellung jedoch nicht nötig.

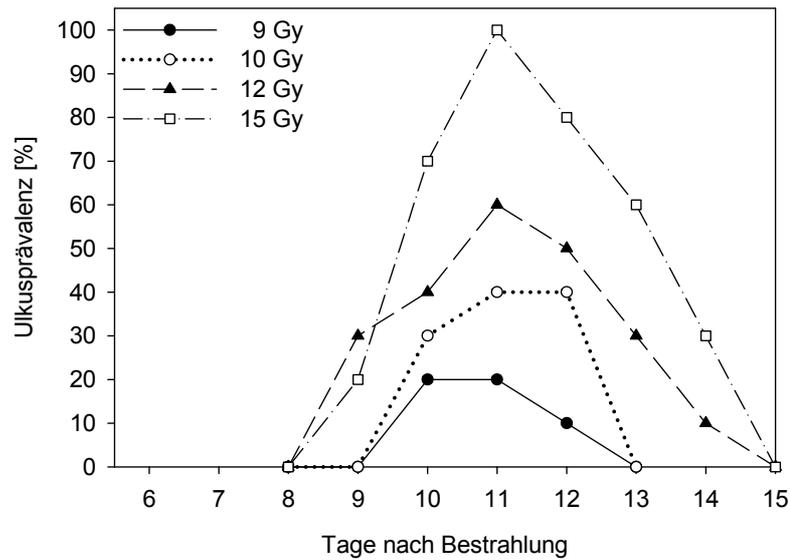


Abb. 6: Ulkusprävalenz nach lokaler Einzeitbestrahlung (6-15 Gy)

Nach Bestrahlung mit 6 Gy werden keine ulzerativen Läsionen beobachtet. Erste Reagenten treten am Tag 9 auf. Alle Ulzerationen sind bis zum Tag 15 verheilt.

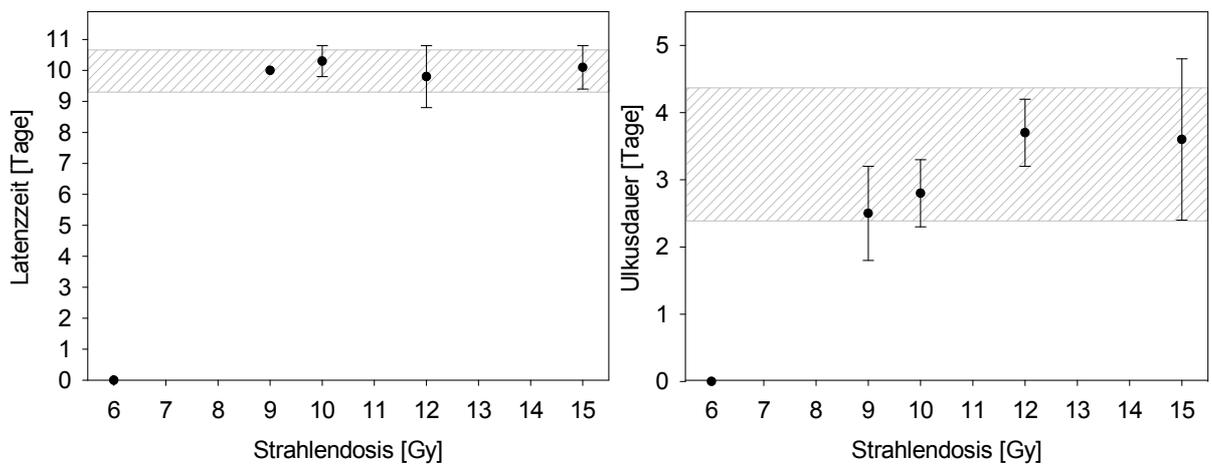


Abb. 7: Ulkuslatenz (linke Abb.) und Ulkusdauer (rechte Abb.) in Abhängigkeit von der Strahlendosis

Die Ulkuslatenz ($MW \pm SD$) ist unabhängig von der Strahlendosis ($p = 0,8292$). Die durchschnittliche Latenzzeit beträgt $10,0 \pm 0,7$ Tage (schraffierter Bereich).

Die Ulkusdauer ($MW \pm SD$) ist tendenziell von der Strahlendosis abhängig ($p = 0,09$). Die Ulzerationen über allen Dosisgruppen bleiben im Durchschnitt $3,4 \pm 1,0$ Tage bestehen (schraffierter Bereich).

4.1.2 Dosisabhängigkeit der Strahlenreaktion

Die Ulkusfrequenz (relativer Anteil der Mäuse mit einer ulzerativen Läsion in %) nimmt mit steigender Strahlendosis signifikant zu ($p = 0,0003$). Die entsprechende Dosis-Effekt-Kurve ist in Abbildung 8 dargestellt. Nach Bestrahlung mit 6 Gy ist bei keiner Maus eine ulzerative Läsion sichtbar. Die Bestrahlung mit 15 Gy führt bei allen Tieren zu Ulzerationen. Die Strahlendosis, welche bei der Hälfte der Tiere eine Ulzeration erwarten lässt (ED_{50}), wird mit $11,0 \pm 1,3$ Gy berechnet.

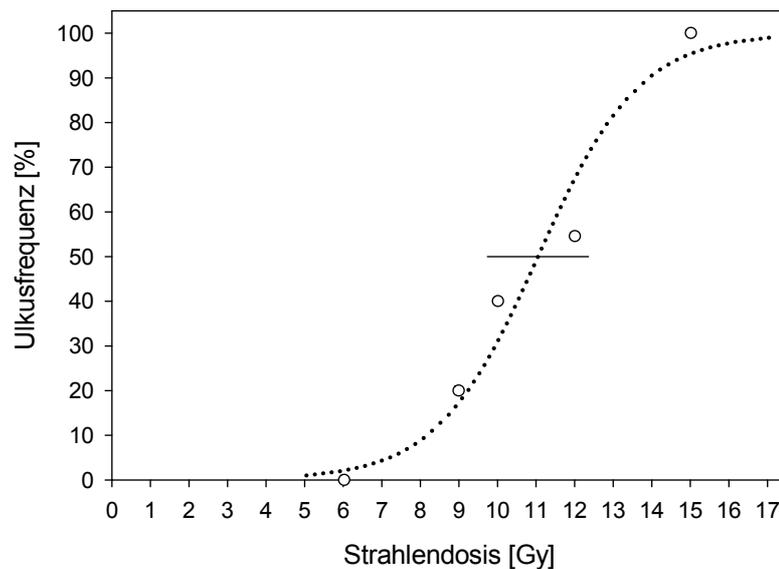


Abb. 8: Dosis-Effekt-Kurve nach lokaler Einzeitbestrahlung

Die Ulkusfrequenz ist signifikant abhängig von der Strahlendosis ($p = 0,0003$). Der ED_{50} -Wert beträgt $11,0 \pm 1,3$ Gy. Die Berechnung der Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mittels Probit-Analyse. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung σ des ED_{50} -Wertes dar.

4.1.3 Sonstige Effekte der Einzeitbestrahlung

Der Gewichtsverlauf der Tiere zeigt keine systematische Abhängigkeit von der Strahlendosis (Abb. 9). Nach Bestrahlung mit 9 Gy nimmt das Gewicht der Tiere bis zum Tag 5 um ca. 1,7 g zu und bleibt dann bis zum Tag 13 nahezu konstant. Nach Bestrahlung mit 6 Gy, 10 Gy und 12 Gy ist die Gewichtszunahme weniger stark ausgeprägt. Das Gewicht der Mäuse bleibt nach Bestrahlung mit 15 Gy nahezu unverändert.

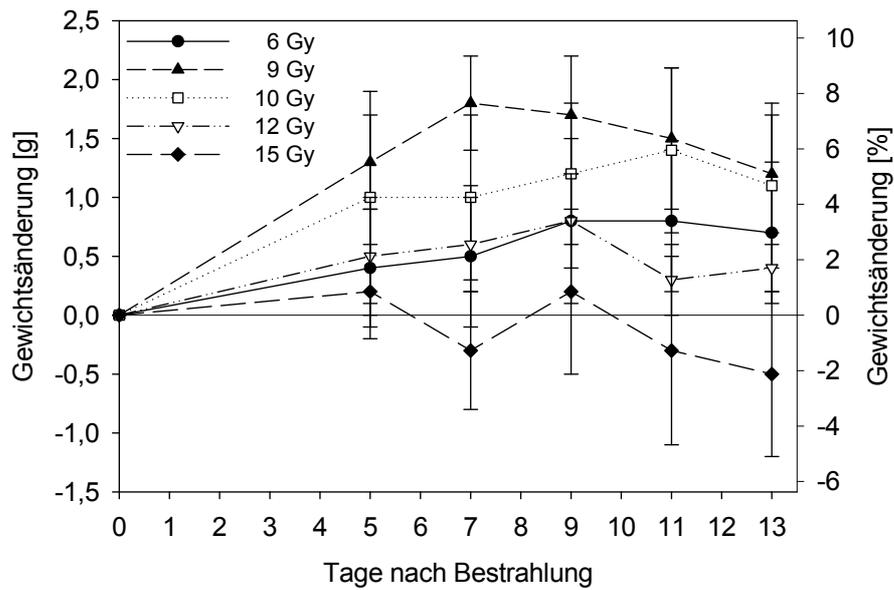


Abb. 9: Gewichtsentwicklung der Mäuse nach Einzeitbestrahlung mit verschiedenen Strahlendosen von 6 Gy bis 15 Gy

Dargestellt sind die absoluten (linke Ordinate) und relativen Gewichtsänderungen (rechte Ordinate) der Tiere in Abhängigkeit von der Strahlendosis ($MW \pm SD$, $n = 10$), bezogen auf das Ausgangsgewicht zum Zeitpunkt der Einzeitbestrahlung.

4.2 Einfluss von Palifermin auf die Strahlenreaktion des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung

Palifermin wird in täglichen Einzeldosen von 5 mg/kg (zwei- bzw. dreimalig) oder 15 mg/kg (einmalig) vor und nach der lokalen Einzeitbestrahlung subkutan appliziert. Die Palifermin-Applikation an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Bestrahlung (Tag -3,-2,-1,+1,+2,+3) wird in der vorliegenden Arbeit auf Grund der Vergleichbarkeit mit dem zugelassenen klinischen Einsatz als Standardanwendung (Versuch P 1) bezeichnet. Die Versuchsprotokolle sind in Tabelle 6 (siehe 3.4) dargestellt und die Ergebnisse in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Wird Palifermin nur an einem Tag appliziert, beträgt die Dosierung 15 mg/kg. Bei wiederholter Palifermin-Gabe werden täglich 5 mg/kg injiziert. ED_{50} = Strahlendosis, die bei der Hälfte der Tiere eine Ulzeration erwarten lässt. Die Werte der Latenzzeit und Ulkusdauer repräsentieren die arithmetischen Mittelwerte ($MW \pm SD$) der fünf Strahlendosisgruppen eines jeden Versuchs. DMF: Dosis-Modifikations-Faktor (siehe Kap. 3.6.1)

Ver- such	Palifermin- Applikation		$ED_{50} \pm \sigma$ (Gy)	p vs Dosis	p vs Kon- trolle	p vs Stan- dard- anwen- dung	DMF	Latenz- zeit (Tage, $MW \pm SD$)	Ulkus- dauer (Tage, $MW \pm SD$)
	vor Be- strah- lung (Tage)	nach Be- strah- lung (Tage)							
Kontrolle K	Keine	Keine	11,0 ± 1,3	0,0003				10,0 ± 0,7	3,4 ± 1,0
Standardanwendung									
P 1	-3 -2 -1	+1 +2 +3	21,9 ± 2,2	0,0007	<0,0001		2,0	8,9 ± 0,8	2,7 ± 0,6
P 2.1	-3 -2	+1 +2 +3	19,1 ± 1,3	0,0003	<0,0001	0,0068	1,7	7,1 ± 0,4	2,9 ± 0,4
P 2.2	-2 -1	+1 +2 +3	18,3 ± 3,7	0,0006	0,0006	0,0098	1,7	8,8 ± 0,7	2,7 ± 0,7
P 3.1	-3	+1 +2 +3	23,4 ± 3,9	0,0145	<0,0001	0,6321	2,1	7,6 ± 0,5	2,5 ± 0,6
P 3.2	-2	+1 +2 +3	23,2 ± 2,3	0,0004	<0,0001	0,2860	2,1	8,2 ± 0,4	2,5 ± 0,5
P 3.3	-1	+1 +2 +3	22,6 ± 3,0	0,0038	<0,0001	0,8069	2,0	6,9 ± 0,5	2,8 ± 0,7
P 4.1	-3 -2 -1	+1+2	31,5 ± 5,1	0,0034	<0,0001	0,0004	2,9	10,3 ± 1,3	2,1 ± 0,6
P 4.2	-3 -2 -1	+2 +3	28,9 ± 3,8	0,0013	<0,0001	0,0006	2,6	9,4 ± 0,5	2,2 ± 0,6
P 5.1	-3 -2 -1	+1	28,7 ± 3,8	0,0412	<0,0001	0,0014	2,6	12,9 ± 0,7	1,5 ± 0,7
P 5.2	-3 -2 -1	+2	29,8 ± 5,7	0,0600	<0,0001	0,0069	2,7	11,6 ± 0,5	2,2 ± 0,5
P 5.3	-3 -2 -1	+3	28,6 ± 2,3	0,0008	<0,0001	0,0006	2,6	10,1 ± 0,5	2,6 ± 0,5
P 6	-3	+3	31,1 ± 3,8	0,0097	<0,0001	0,0005	2,8	9,6 ± 0,5	2,3 ± 0,5

4.2.1 Palifermin-Applikation an drei Tagen unmittelbar vor und nach der Einzeitbestrahlung (Standardanwendung, Versuch P 1)

4.2.1.1 Dosis-Effekt-Beziehung

Die Gabe von Palifermin an den drei Tagen vor sowie an den ersten drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung erhöht signifikant die Strahlentoleranz des Epithels im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (Tab. 9, Abb. 10). Der ED_{50} -Wert beträgt $21,9 \pm 2,2$ Gy ($p < 0,0001$). Der DMF ist 2,0.

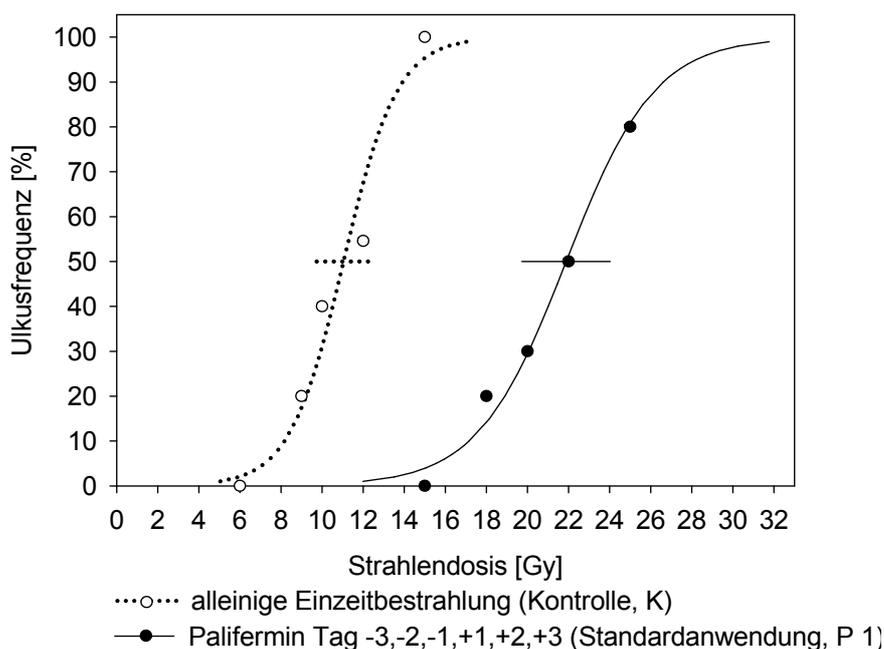


Abb. 10: Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und nach der Bestrahlung (Standardanwendung) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung (Kontrolle)

Die Gabe von Palifermin erhöht signifikant die Strahlentoleranz des Epithels im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ($p < 0,0001$). Die Berechnung der Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mittels Probit-Analyse. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen σ des ED_{50} -Wertes dar.

4.2.1.2 Zeitlicher Verlauf

Ulzerative Läsionen treten nach $8,9 \pm 0,8$ Tagen auf. Die Latenzzeit ist damit signifikant kürzer als nach alleiniger Einzeitbestrahlung ($p < 0,001$). Ulzerative Läsionen sind über $2,7 \pm 0,6$ Tage sichtbar und damit der Dauer bei der alleinigen Bestrahlung vergleichbar ($p = 0,4045$).

4.2.2 Reduktion der Palifermin-Gabe vor der Einzeitbestrahlung auf zwei Applikationen (Versuch P 2.1, P 2.2)

4.2.2.1 Dosis-Effekt-Beziehung

Erfolgt die Palifermin-Applikation an nur zwei Tagen vor der Bestrahlung, ist die Strahlentoleranz **im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung** signifikant erhöht (Tab. 9, Abb. 11). Die ED_{50} beträgt $19,1 \pm 1,3$ Gy (P 2.1: $p < 0,0001$) und $18,3 \pm 3,7$ Gy (P 2.2: $p = 0,0006$). Der DMF liegt für beide Protokolle bei 1,7. **Im Vergleich zur Standardanwendung** führt die Reduktion der Palifermin-Gabe vor der Bestrahlung auf nur zwei Applikationen zu einer signifikanten Verminderung der Strahlentoleranz des

Epithels (P 2.1: $p = 0,0068$, P 2.2: $p = 0,0098$). Die ED_{50} -Werte sind signifikant geringer (Tab. 9, Abb. 11).

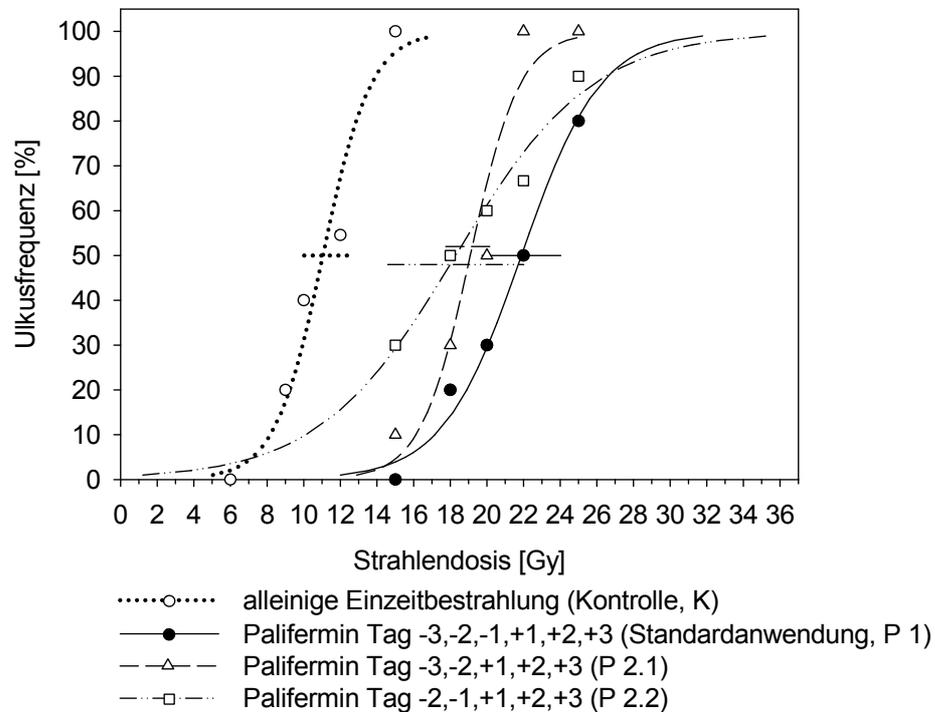


Abb. 11: Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation an zwei Tagen vor und an drei Tagen nach der Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ohne Palifermingabe (Kontrolle) und zur Standardanwendung

Die Strahlentoleranz des Epithels wird durch die Palifermin-Applikation im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung signifikant erhöht. Im Vergleich zur Standardanwendung ist der mukoprotektive Effekt dieser Palifermin-Anwendungen geringer. Die Berechnung der Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mittels Probit-Analyse. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen σ der ED_{50} -Werte dar.

4.2.2.2 Zeitlicher Verlauf

Wird Palifermin nur an zwei Tagen vor der Einzeitbestrahlung appliziert, sind ulzerative Läsionen mit $7,1 \pm 0,4$ Tagen (P 2.1) und $8,8 \pm 0,7$ Tagen (P 2.2) signifikant früher sichtbar als nach **alleiniger Einzeitbestrahlung** (P 2.1 und P 2.2: $p < 0,0001$, Tab. 9). Die Ulkusdauer ist mit $2,9 \pm 0,4$ Tagen (P 2.1: $p = 0,1370$) und $2,7 \pm 0,7$ Tagen (P 2.2: $p = 0,1738$) nicht signifikant verschieden von der Kontrolle. **Im Vergleich zur Standardanwendung** treten ulzerative Läsionen tendenziell eher auf, während die Ulkusdauer ebenfalls unbeeinflusst bleibt (Tab. 9).

4.2.3 Reduktion der Palifermin-Gabe vor der Einzeitbestrahlung auf eine einmalige Applikation (Versuch P 3.1, P 3.2, P 3.3)

4.2.3.1 Dosis-Effekt-Beziehung

Wird Palifermin vor der Einzeitbestrahlung nur an einem Tag in der Dosis von 15 mg/kg appliziert, so ist die Strahlentoleranz des Epithels im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung signifikant erhöht (Tab. 9, Abb. 12). Die ED_{50} -Werte betragen $23,4 \pm 3,9$ Gy (P 3.1: $p < 0,0001$), $23,2 \pm 2,3$ Gy (P 3.2: $p < 0,0001$) und $22,6 \pm 3,0$ Gy (P 3.3: $p < 0,0001$). **Im Vergleich zur Standardanwendung** ist der mukoprotektive Effekt des Palifermins in dieser Anwendung ähnlich (Tab. 9, Abb. 12).

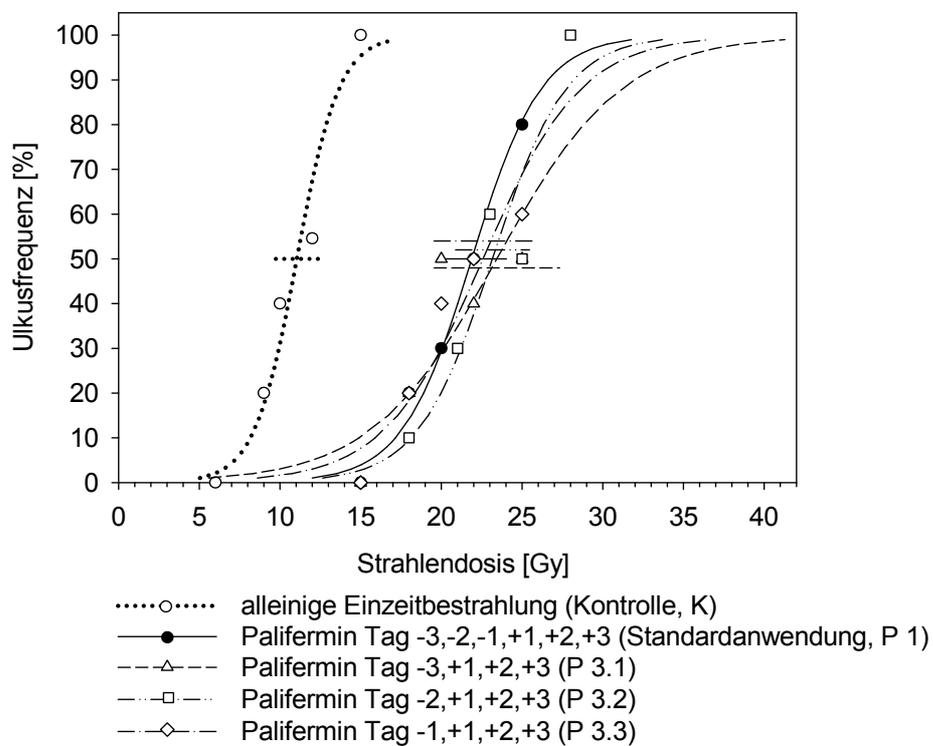


Abb. 12: Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation an einem Tag vor und an drei Tagen nach der Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ohne Palifermin-Gabe (Kontrolle) und zur Standardanwendung

Die Strahlentoleranz des Epithels wird durch die Palifermin-Applikation im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung signifikant erhöht. Im Vergleich zur Standardanwendung sind die isoeffektiven Dosen vergleichbar. Die Berechnung der Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mittels Probit-Analyse. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen σ der ED_{50} -Werte dar.

4.2.3.2 Zeitlicher Verlauf

Wird Palifermin vor der Bestrahlung nur an einem Tag und nach der Bestrahlung an drei aufeinanderfolgenden Tagen appliziert, sind Latenzzeit und Ulkusdauer **im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung** verkürzt (Tab. 9). **Im Vergleich zur Standardanwendung** hat die Reduktion der Palifermin-Applikation auf nur einen Tag vor der Bestrahlung keinen Effekt auf die Ulkusdauer, während die Latenzzeit tendenziell kürzer ist.

4.2.4 Reduktion der Palifermin-Gabe nach der Einzeitbestrahlung auf zwei Applikationen (Versuch P 4.1, P 4.2)

4.2.4.1 Dosis-Effekt-Beziehung

Wird Palifermin zusätzlich zur dreitägigen Palifermin-Gabe vor der Bestrahlung nach der Bestrahlung nur an zwei Tagen appliziert, betragen die ED₅₀-Werte 31,5 ± 5,1 Gy (P 4.1: p < 0,0001) und 28,9 ± 3,8 Gy (P 4.2: p < 0,0001) und sind **im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung** signifikant erhöht. Der DMF beträgt 2,9 und 2,6 (Tab. 9, Abb. 13). **Im Vergleich zur Standardanwendung** wird durch Reduktion der Palifermin-Gaben nach der Bestrahlung die Strahlentoleranz des Epithels weiter erhöht. Die ED₅₀-Werte sind signifikant auf das 1,4- und 1,3-fache erhöht (P 4.1: p = 0,0004, P 4.2: p = 0,0006, Tab. 9, Abb. 13).

4.2.4.2 Zeitlicher Verlauf

Erfolgt die Palifermin-Applikation nach der Bestrahlung an nur zwei Tagen, so ist die Latenzzeit **im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung** kaum verändert (Tab. 9). Die Ulkusdauer ist jedoch mit durchschnittlich 2,1 ± 0,6 Tagen (P 4.1) und 2,2 ± 0,6 Tagen (P 4.2) kürzer als nach alleiniger Bestrahlung (Tab. 9). **Im Vergleich zur Standardanwendung** treten bei Reduktion der Palifermin-Applikationen nach der Bestrahlung auf zwei Tage die ulzerativen Läsionen später auf und dauern etwas kürzer an (Tab. 9).

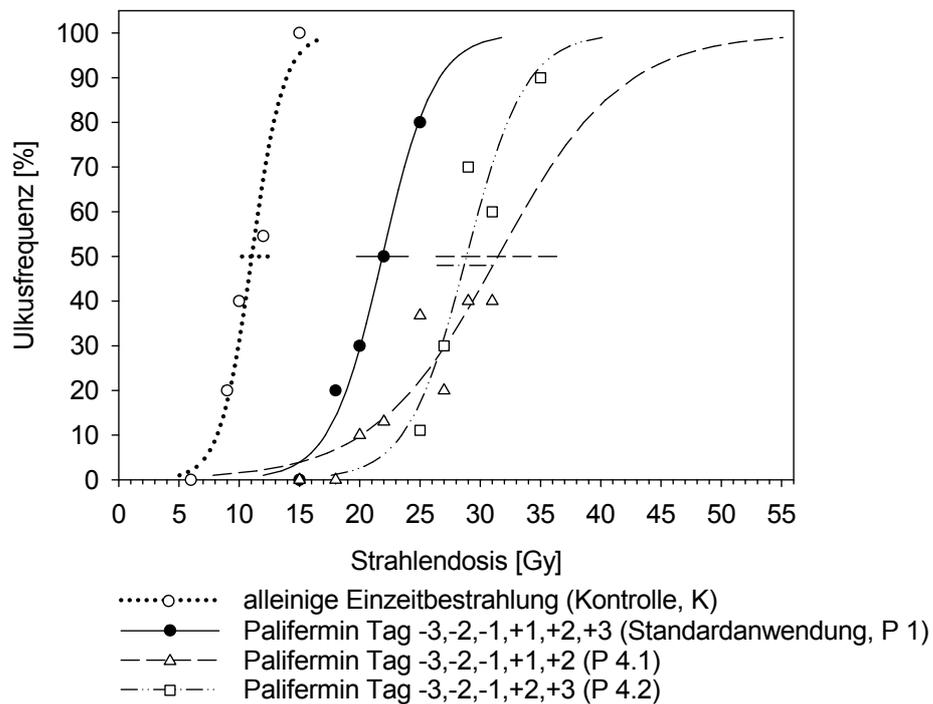


Abb. 13: Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und an zwei Tagen nach der Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ohne Palifermin-Gabe (Kontrolle) und zur Standardanwendung

Im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung wird die Strahlentoleranz des Epithels durch die Palifermin-Applikation signifikant erhöht. Auch im Vergleich zur Standardanwendung sind die isoeffektiven Dosen signifikant erhöht. Die Berechnung der Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mittels Probit-Analyse. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen σ der ED_{50} -Werte dar.

4.2.5 Reduktion der Palifermin-Gabe nach der Einzeitbestrahlung auf eine einmalige Applikation (Versuch P 5.1, P 5.2, P 5.3)

4.2.5.1 Dosis-Effekt-Beziehung

Wird Palifermin zusätzlich zur dreitägigen Gabe vor der Bestrahlung nach der Bestrahlung an nur einem Tag mit der Dosis von 15 mg/kg appliziert, so ist die Strahlentoleranz des Epithels **im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung** signifikant erhöht (Tab. 9, Abb. 14). Die ED_{50} -Werte betragen $28,7 \pm 3,8$ Gy (P 5.1: $p < 0,0001$), $29,8 \pm 5,7$ Gy (P 5.2: $p < 0,0001$) und $28,6 \pm 2,3$ Gy (P 5.3: $p < 0,0001$). Die DMF liegen zwischen 2,6 und 2,7. **Im Vergleich zur Standardanwendung** wird durch Reduktion der Palifermin-Gaben auf eine Applikation nach der Bestrahlung die Strahlentoleranz weiter erhöht. Die ED_{50} -Werte sind im Vergleich zur Standardanwendung signifikant auf das 1,3- bis 1,4-fache erhöht (Tab. 9, Abb. 14).

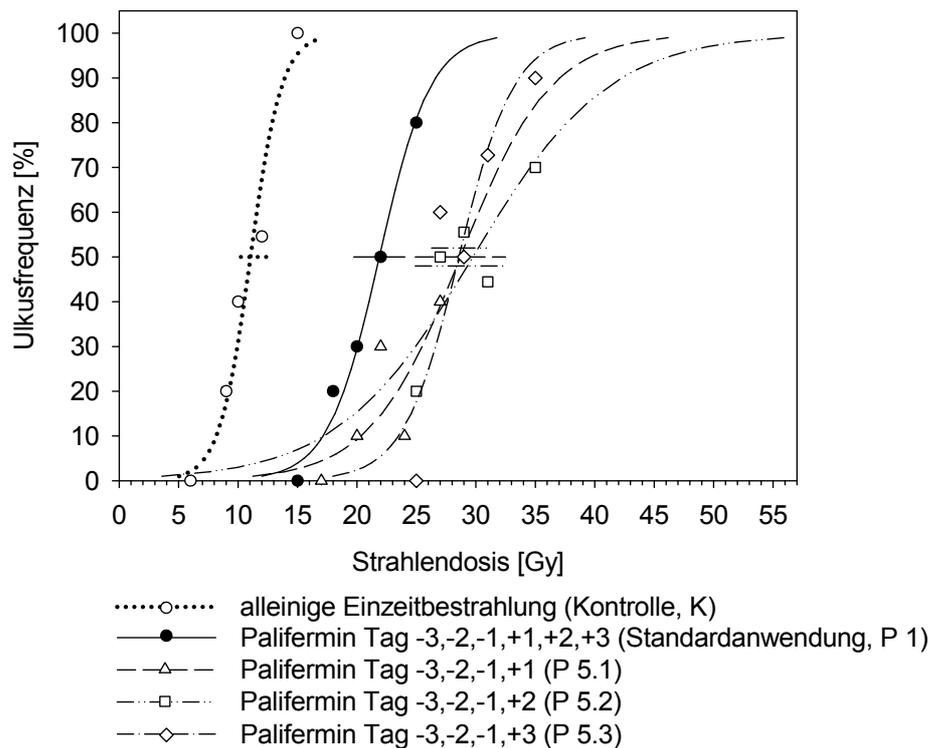


Abb. 14: Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und an einem Tag nach der Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (Kontrolle) und zur Standardanwendung

Die Strahlentoleranz des Epithels wird durch die Palifermin-Applikation im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung signifikant erhöht. Auch im Vergleich zur Standardanwendung sind die isoeffektiven Dosen signifikant erhöht. Die Berechnung der Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mittels Probit-Analyse. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen σ der ED_{50} -Werte dar.

4.2.5.2 Zeitlicher Verlauf

Wird Palifermin zusätzlich zu der dreitägigen Anwendung vor der Bestrahlung nach der Bestrahlung als Einmalgabe verabreicht, treten ulzerative Läsionen zwei bis drei Tage später als nach **alleiniger Einzeitbestrahlung** auf (Tab. 9). Der Effekt scheint umso stärker ausgeprägt, je kürzer das Intervall zwischen Bestrahlung und Palifermingabe ist. Die Ulkusdauer ist auf ein bis zwei Tage verkürzt. **Im Vergleich zur Standardanwendung** ist die Latenzzeit bei Palifermin-Gabe nur am ersten oder zweiten Tag nach der Bestrahlung um drei bis vier Tage verlängert. Die Ulkusdauer ist im Vergleich zur Standardanwendung ein bis zwei Tage kürzer. Erfolgt die einmalige Palifermin-Gabe erst am dritten Tag nach der Bestrahlung ist die Latenzzeit im Vergleich zur Standardanwendung nur um etwa einen Tag verlängert. Die Dauer der ulzerativen Läsionen bleibt unbeeinflusst (Tab. 9).

4.2.6 Einmalige Palifermin-Applikation vor und nach der Einzeitbestrahlung (Versuch P 6)

4.2.6.1 Dosis-Effekt-Beziehung

Eine einmalige Palifermin-Applikation (15 mg/kg) drei Tage vor und am dritten Tag nach der Bestrahlung erhöht **im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung** signifikant die Strahlentoleranz des Epithels. Der ED_{50} -Wert beträgt $31,1 \pm 3,8$ Gy ($p < 0,0001$) und der DMF liegt bei 2,8 (Tab. 9, Abb. 15). **Im Vergleich zur Standardanwendung** wird durch die Reduktion der Paliferminapplikationen auf eine Gabe vor und nach der Einzeitbestrahlung eine weitere signifikante Erhöhung der Strahlentoleranz mit einem Anstieg des ED_{50} -Wertes auf das 1,4-fache erzielt ($p = 0,0005$, Tab. 9, Abb. 15).

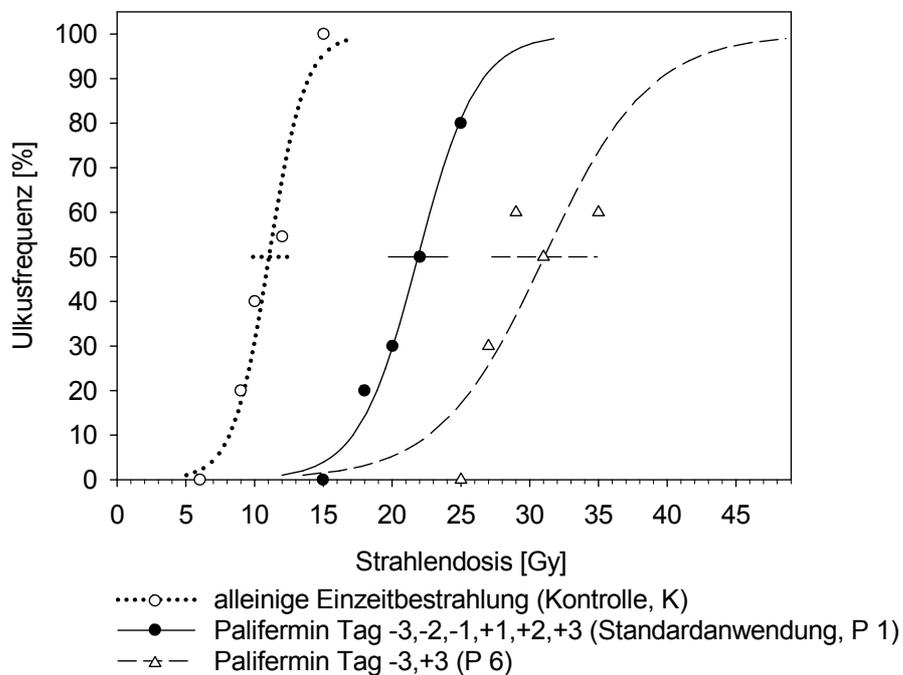


Abb. 15: Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation einmalig drei Tage vor und am dritten Tag nach der Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (Kontrolle) und zur Standardanwendung

Die Gabe von Palifermin erhöht signifikant die Strahlentoleranz des Epithels im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Auch im Vergleich zur Standardanwendung sind die isoeffektiven Dosen signifikant erhöht. Die Berechnung der Dosis-Effekt-Beziehung erfolgt mittels Probit-Analyse. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen σ der ED_{50} -Werte dar.

4.2.6.2 Zeitlicher Verlauf

Eine einmalige Palifermin-Applikation vor und nach der Bestrahlung beeinflusst die Latenzzeit **im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung** nicht, bewirkt aber eine Verkürzung der Ulkusdauer um einen Tag (Tab. 9). **Im Vergleich zur Standardanwendung** werden Latenzzeit und Ulkusdauer kaum verändert.

4.2.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Ulkusinduktion

Die Daten der Untersuchungen zu Ulkusinduktion sind in Tabelle 9 dargestellt. Nach alleiniger Einzeitbestrahlung der Zungenunterseite treten im Bestrahlungsfeld ulzerative Läsionen mit einem ED₅₀- Wert von $11,0 \pm 1,3$ Gy, einer mittleren Latenzzeit von $10,0 \pm 0,7$ Tagen und einer mittleren Ulkusdauer von $3,4 \pm 1,0$ Tagen auf. Palifermin erhöht die Strahlenresistenz des Epithels der Mundschleimhaut in allen getesteten Anwendungsprotokollen.

Erhalten die Mäuse Palifermin als **Standardanwendung**, d.h. in einer Dosis von 5 mg/kg an drei Tagen vor und an drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung, beträgt der DMF 2,0.

Wird die Anzahl der Palifermin-Applikationen **vor der Einzeitbestrahlung** auf zwei Gaben **reduziert**, ist die Strahlentoleranz des Zungenepithels geringer. Wird dagegen vor der Bestrahlung eine Palifermindosis von 15 mg/kg an einem Tag appliziert, ist die Strahlentoleranz des Epithels mit derjenigen der Standardanwendung vergleichbar.

Wird die Anzahl der Palifermin-Applikationen **nach der Einzeitbestrahlung** auf eine oder zwei Gaben **reduziert**, ist im Vergleich zur Standardanwendung die Strahlentoleranz des Zungenepithels signifikant erhöht.

Wird eine Palifermindosis von 15 mg/kg **nur einmalig drei Tage vor der Einzeitbestrahlung und am dritten Tag nach der Einzeitbestrahlung** appliziert, ist im Vergleich zur Standardanwendung die Strahlentoleranz des Zungenepithels ebenfalls signifikant erhöht – vergleichbar mit dem Effekt einer Palifermin-Applikation an drei Tagen unmittelbar vor und an 2 Tagen nach der Bestrahlung.

4.3 Histologische Untersuchungen

4.3.1 Histologie des unbehandelten Epithels

Die durchschnittliche Zellzahl des Epithels der Zungenunterseite der Maus beträgt 560 ± 9 Zellen/Millimeter Epithellänge (MW \pm SD, Tab. 10). Etwa 81 % der Zellen befinden sich in der Germinativschicht (452 ± 16 Zellen/mm, MW \pm SD), die restlichen 19 % gehören zur funktionellen Schicht (108 ± 7 Zellen/mm, MW \pm SD). Die Dicke des Epithels beträgt im Mittel 106 ± 6 μ m (MW \pm SD). Die funktionelle Schicht nimmt 52 % (56 ± 9 μ m, MW \pm SD), die Germinativschicht 23 % (25 ± 1 μ m, MW \pm SD) und die Keratinschicht 24 % (26 ± 1 μ m, MW \pm SD) ein.

Tab. 10: Quantitative histologische Parameter des unbehandelten Epithels der Zungenunterseite

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen.

	Zellzahl/mm MW ± SD	Anteil an der Gesamtzellzahl (%)	Schichtdicke (µm) MW ± SD	Anteil am Gesamtepithel (%)
Gesamtes Epithel	560 ± 9	100	106 ± 6	100
Germinativschicht	452 ± 16	81	25 ± 1	23
Funktionelle Schicht	108 ± 7	19	56 ± 9	52
Keratinschicht	-	-	26 ± 1	24

4.3.2 Qualitative histologische Veränderungen im Epithel durch die Behandlung

4.3.2.1 Alleinige Einzeitbestrahlung

Vier bis fünf Tage nach der Strahlenexposition werden im Bestrahlungsfeld zunehmend vergrößerte und unregelmäßig geformte Epithelzellen beobachtet. Die Zellgrenzen sind nur schwer zu definieren. Die Zellkerne zeigen zunächst eine Chromatinverdichtung (Karyopyknose), gefolgt von einem Zerfall der Zellkernbestandteile (Karyorrhexis) und einer Auflösung der Kerne (Karyolyse). Zwei- bzw. mehrkernige Zellen sind vorhanden. Zusätzlich wird eine allmähliche Reduktion der Zelldichte im Epithel registriert. Auch Veränderungen der Keratinisierung sind sichtbar. Die Dicke der Keratinschicht nimmt zu und die oberen Lagen erscheinen aufgelockert. Das Maximum dieser Veränderungen wird an den Tagen 9 bis 10 beobachtet (Abb. 16). Germinativschicht und funktionelle Schicht können dann nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden. Die Keratinschicht ist deutlich verbreitert. Die Regeneration des Epithels setzt schnell – bevorzugt beginnend von den Rändern des Bestrahlungsfeldes – ein. Nach kurzer Phase der Hyperplasie heilt der Epithelschaden vollständig aus.

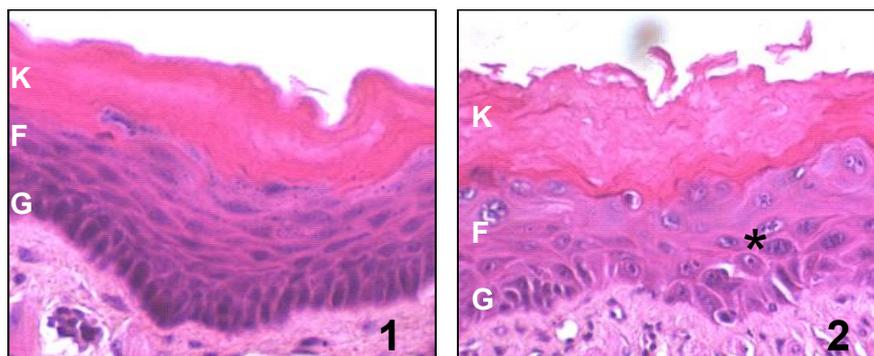


Abb. 16: Histologische Bilder eines unbehandelten Epithels (1) und eines Epithels zehn Tage nach Einzeitbestrahlung mit 13 Gy (2), HE-Färbung

Dargestellt sind Germinativschicht (G), funktionelle Schicht (F) und Keratinschicht (K). Zehn Tage nach Einzeitbestrahlung ist die Zelldichte im Vergleich zum unbehandelten Epithel deutlich geringer. Die Epithelzellen sind vergrößert und die Zellgrenzen nur schwer zu definieren. Zweikernige Zellen sind sichtbar (*). Germinativschicht und funktionelle Schicht sind nicht eindeutig abgrenzbar. Die oberen Lagen der Keratinschicht sind aufgelockert.

4.3.2.2 Palifermin-Applikation

Die Applikation von Palifermin vor der Bestrahlung induziert im Vergleich zum unbehandelten Epithel eine deutliche Zunahme der Zellzahl und der Dicke des Epithels. Die deutlichsten Veränderungen werden nach allen drei Palifermin-Gaben registriert (Abb. 17). Nach der Bestrahlung nimmt die Zellzahl ab. Morphologische Veränderungen der Zellen (Karyopyknose, Karyorrhesis, Karyolyse, zwei- bzw. mehrkernige Zellen) werden ab Tag 7 beobachtet. Das Maximum dieser Veränderungen tritt später als bei alleiniger Einzeitbestrahlung am Tag 11 ein. Bis zum Tag 13 können Germinativschicht und funktionelle Schicht nicht eindeutig voneinander unterschieden werden. Die Reepithelialisierung verläuft sehr schnell. Bereits am Tag 14 ist das Epithel wieder vollständig hergestellt.

Wird Palifermin zusätzlich an drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung appliziert, bleibt die Zelldichte bis zum Tag 2 deutlich erhöht. Ab Tag 3 werden zunehmend vergrößerte und unregelmäßig geformte Epithelzellen mit vergrößerten Zellkernen registriert. Eine allmähliche Reduktion der Zelldichte tritt ein, bis an den Tagen 9 bis 11 Germinativschicht und funktionelle Schicht nicht mehr unterschieden werden können und nur eine dünne Keratinschicht vorhanden ist (Abb. 17). Wie nach alleiniger Bestrahlung setzt die Regeneration des Epithels schnell ein. Bereits am Tag 13 ist der Epithelschaden vollständig verheilt.

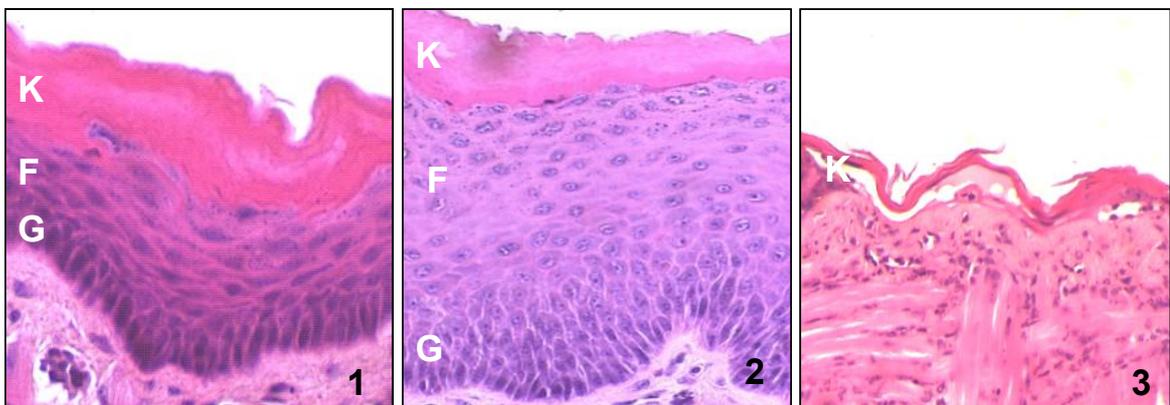


Abb. 17: Histologische Bilder eines unbehandelten Epithels der Zungenunterseite (1), eines Epithels am Tag 3 nach dreitägiger Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag) (2) und eines Epithels 11 Tage nach Einzeitbestrahlung (24 Gy) und Palifermin-Gabe (5 mg/kg/Tag) an 3 Tagen vor und nach der Bestrahlung (3). HE-Färbung, 400-fache Vergrößerung

Dargestellt sind Germinativschicht (G), funktionelle Schicht (F) und Keratinschicht (K). Die dreitägige Gabe von Palifermin bewirkt eine deutliche Zunahme der Zellzahl und Epitheldicke (2) im Vergleich zum unbehandelten Epithel (1). Nach Einzeitbestrahlung und Palifermin-Gabe 3 Tage davor und 3 Tage danach (Standardanwendung) ist die zelluläre Reduktion im Epithel nach 9 bis 11 Tagen maximal. Germinativschicht und funktionelle Schicht sind nicht voneinander abgrenzbar. Nur die Keratinschicht ist darstellbar (3).

Die histologischen Veränderungen nach einer Palifermin-Gabe nach der Bestrahlung sind qualitativ mit denen nach alleiniger Einzeitbestrahlung vergleichbar. Erste morphologische Veränderungen in Form von vergrößerten und mehrkernigen Zellen werden ab Tag 4 beobachtet. Zellzahl und Dicke des Epithels nehmen im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung beschleunigt ab. Bereits an den Tagen 7 bis 9 sind die Veränderungen maximal. Germinativschicht und funktionelle Schicht können dann nicht mehr differenziert werden. Zwölf Tage nach der Bestrahlung ist der Epithelschaden wieder vollständig ausgeheilt.

4.3.3 Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach alleiniger Einzeitbestrahlung

Im Folgenden wird eine Übersicht über die Ergebnisse gegeben. Die Einzelwerte finden sich in den Tabellen 11 bis 22 des Anhangs (Kap. 9.3).

4.3.3.1 Zellzahl

Nach der Einzeitbestrahlung verringert sich ab Tag 2 die Zellzahl im Zungenepithel (Abb. 18). Die Zellverlusten betragen am Tag 2 20 %, am Tag 3 17 % und an den Tagen 4 bis 6 nur noch 0 - 5 %. Die geringste Zellzahl wird an den Tagen 6 bis 8 registriert (73-74 %). Danach nimmt die Gesamtzellzahl wieder zu, bis am Tag 11 der Normalwert erreicht wird. Zum Ende des Versuchs ist die Zellzahl leicht erhöht (119-126 %). In der Germinativschicht und funktionellen Schicht ist der Verlauf der Zellzahlveränderungen ähnlich. Lediglich die Zellzahl in der funktionellen Schicht steigt nach dem Erreichen der Minimalwerte etwas stärker an und die Hyperplasie ist in dieser Schicht bis zum Ende des Versuchs ausgeprägter (bis 175 %).

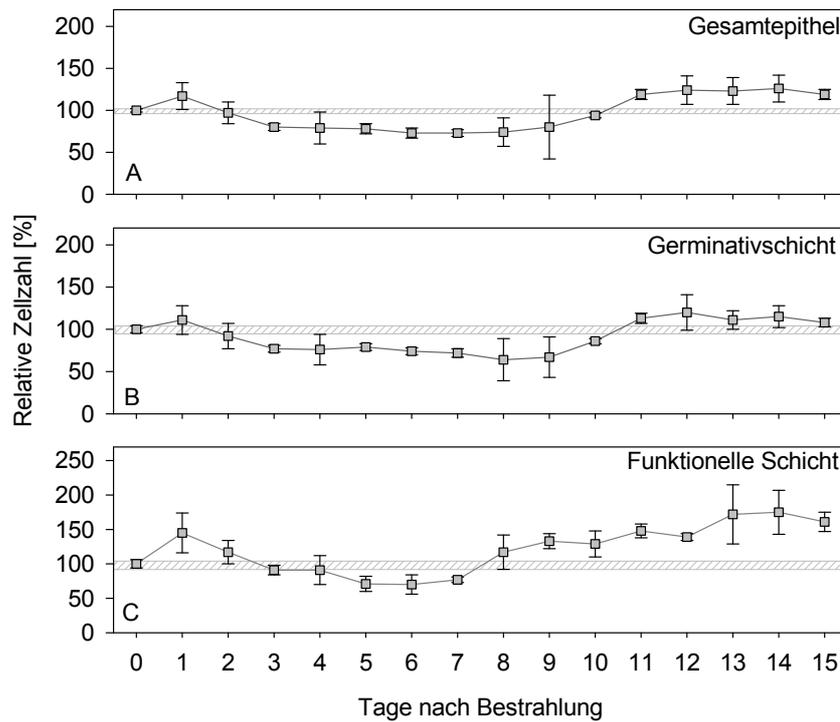


Abb. 18: Zellzahlen des Gesamtepithels (A) und der kernhaltigen Schichten (B, C) nach alleiniger Einzeitbestrahlung (13 Gy)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Zellzahl im Gesamtepithel (A), in der Germinativschicht (B) und in der funktionellen Schicht (C). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Die Zellzahl verringert sich im Gesamtepithel sowie in beiden Einzelschichten ab Tag 2 nach der Bestrahlung (Tag 0). Der Minimalwert wird an den Tagen 6 bis 8 beobachtet. Danach steigt die Zellzahl wieder auf Normalwerte an. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

4.3.3.2 Epitheldicke

Die Epitheldicke verringert sich auf 72 % des Kontrollwertes am Tag 4, verursacht durch Verringerung der Dicke von Germinativschicht (76 %) und funktioneller Schicht (57 %, Abb. 19). Die Dicke der Keratinschicht bleibt bis Tag 6 nahezu konstant. Ab Tag 5 verbreitert sich das Gesamtepithel auf 128 % am Tag 8. Alle epithelialen Schichten, insbesondere die Keratinschicht (154 % am Tag 9) sind an dieser Dickenzunahme beteiligt. Am Ende des Versuchs (ab Tag 13) verringert sich die Epitheldicke wieder auf den Ausgangswert vor der Einzeitbestrahlung.

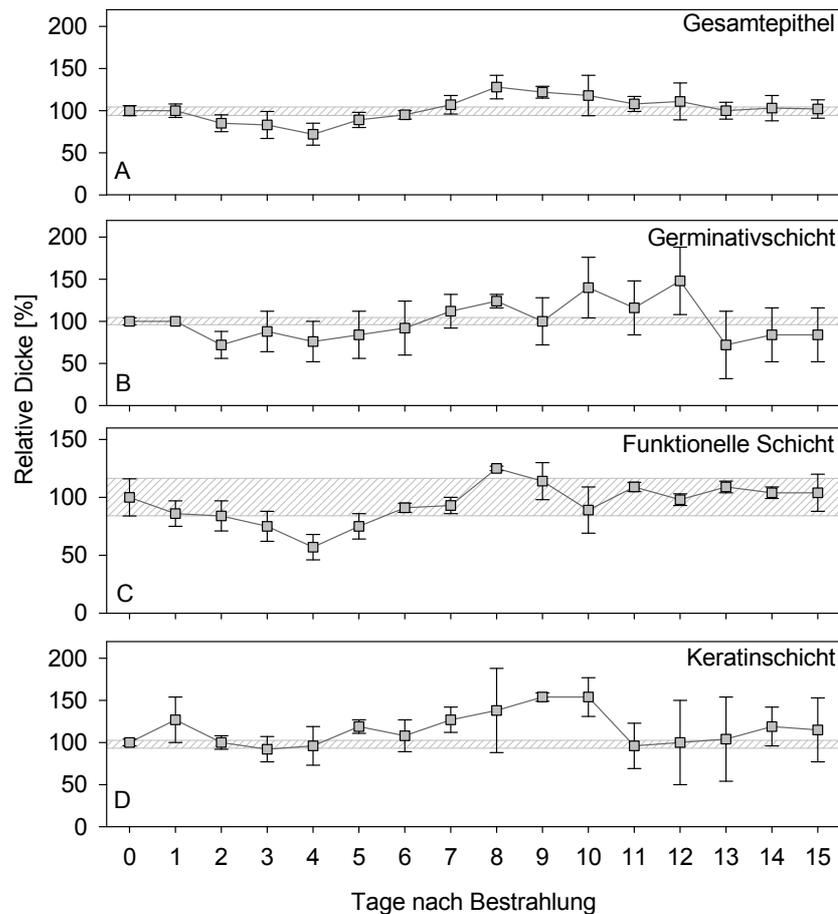


Abb. 19: Dicken des Gesamtepithels (A) und der einzelnen Schichten (B-D) nach Einzeitbestrahlung (13 Gy)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Dicke von Gesamtepithel (A), Germinativschicht (B), funktioneller Schicht (C) und Keratinschicht (D). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Die Dicke des Gesamtepithels, der Germinativschicht und der funktionellen Schicht nimmt in den ersten 4 Tagen nach der Bestrahlung (Tag 0) ab, während die Dicke der Keratinschicht nahezu konstant bleibt. Es folgt eine Zunahme aller Schichtdicken, bis an den Tagen 8 bis 12 Maximalwerte erreicht werden. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

4.3.3.3 Zellvolumen

Als relatives Zellvolumen wird das Verhältnis aus Dicke und Zellzahl in Relation zu den Werten im Kontrollepithel bezeichnet (siehe 3.8).

Nach alleiniger Einzeitbestrahlung nimmt das Zellvolumen der Zellen allmählich zu (Abb. 20). Am Tag 8 sind die Zellen im Vergleich zur Kontrolle mehr als doppelt so groß (239 %). Danach wird das Zellvolumen wieder kleiner und erreicht ab Tag 11 Normalwerte.

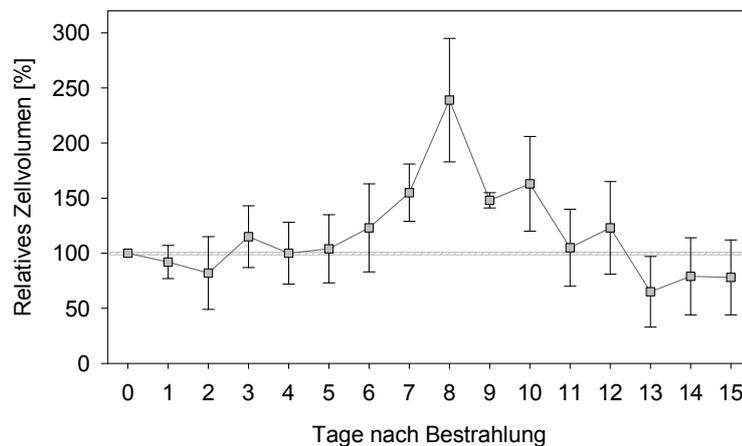


Abb. 20: Relatives Zellvolumen nach Einzeitbestrahlung (13 Gy)

Die Werte repräsentieren die täglichen Mittelwerte (MW \pm SD) von jeweils drei Mäusen. Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Die Zellen vergrößern sich allmählich nach der Einzeitbestrahlung (Tag 0) und sind am Tag 8 im Vergleich zur Kontrolle mehr als doppelt so groß. Danach verringert sich das Zellvolumen wieder.

4.3.4 Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und nach der Einzeitbestrahlung (Standardanwendung)

4.3.4.1 Zellzahl

Die Palifermin-Applikation an drei aufeinander folgenden Tagen unmittelbar vor der Bestrahlung (Abb. 21) bewirkt eine Zunahme der Gesamtzellzahl auf fast das Doppelte (184 %) des Ausgangswertes, bedingt durch eine Zellzahlerhöhung in der Germinativschicht (171 %) und in der funktionellen Schicht (241 %). Nach der Bestrahlung nimmt die Zelldichte im Gesamtepithel und in der Germinativschicht allmählich ab, bis am Tag 7 die geringste Zellzahl (Gesamtepithel 36 %, Germinativschicht 27 %) gemessen wird. Der Verlauf der Zellzahl in der funktionellen Schicht unterscheidet sich deutlich von dem des Gesamtepithels und der Germinativschicht. Die Zelldichte nimmt in dieser Schicht nach der Bestrahlung weiter bis zum Tag 3 (336 %) zu. Erst danach tritt eine Reduktion der Zellzahl bis zum Tag 9 (41 %) ein. Elf Tage nach Bestrahlung entspricht die Zelldichte im Gesamtepithel und in der Germinativschicht wieder dem Ausgangswert vor der Behandlung. In der funktionellen Schicht bleibt die Zellzahl bis zum Versuchsende leicht erhöht. Der zeitliche Verlauf der Zellzahlveränderungen von Gesamtepithel und Germinativschicht nach der Bestrahlung ist dem nach **alleiniger Einzeitbestrahlung** ähnlich. Aufgrund der Palifermin-Vorbehandlung ist die Zellzahl zum Zeitpunkt der Bestrahlung aber größer als im unbehandelten Epithel. Im Gegensatz zur alleinigen Einzeitbestrahlung wird in der funktionellen Schicht eine Zunahme der Zellzahl bis zum Tag 3 registriert. Da in den Versuchen mit Palifermin-Applikation eine im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung deutlich höhere, aber in Bezug auf Ulkusinduktion isoeffektive

Strahlendosis verwendet wird (21 Gy, 24 Gy, 25 Gy vs. 13 Gy), sind die minimalen Zellzahlen geringer als nach alleiniger Einzeitbestrahlung.

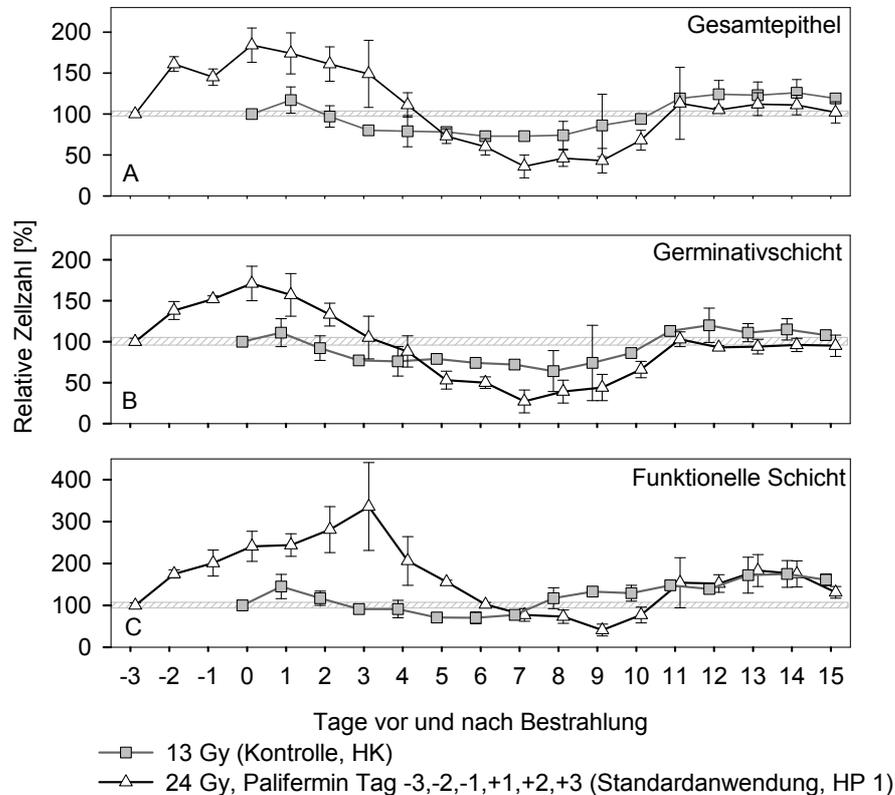


Abb. 21: Zellzahlen des Gesamtepithels (A) und der kernhaltigen Schichten (B, C) nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und nach einer Einzeitbestrahlung (24 Gy, Standardanwendung) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Zellzahl im Gesamtepithel (A), in der Germinativschicht (B) und in der funktionellen Schicht (C). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Die Palifermin-Applikation vor der Bestrahlung (Tag -3 bis Tag -1) bewirkt eine Zunahme der Zellzahl im Gesamtepithel sowie in beiden Einzelschichten. Nach der Bestrahlung verringert sich die Zellzahl im Gesamtepithel und in der Germinativschicht, während in der funktionellen Schicht zunächst eine weitere Zunahme der Zellzahl bis Tag 3 registriert wird. Minimalwerte werden ähnlich wie nach alleiniger Einzeitbestrahlung am Tag 7 bzw. 9 erreicht. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

4.3.4.2 Epitheldicke

Nach drei Palifermin-Applikationen ist das Epithel mehr als doppelt so dick wie ein unbehandeltes Epithel (215 %, Abb. 22). Alle drei Einzelschichten, die Germinativschicht (256 %), die funktionelle Schicht (223 %) und die Keratinschicht (150 %), tragen zu dieser Dickenzunahme bei. Die Fortsetzung der Palifermin-Applikationen an den drei Tagen

nach der Bestrahlung führt zu einer weiteren Zunahme der Epitheldicke bis zum Tag 3 (286 %), insbesondere verursacht durch eine Dickenzunahme der funktionellen Schicht (329 %) und der Keratinschicht (315 %). Danach verringert sich die Epitheldicke. Am Ende des Versuchs werden für das Gesamtepithel sowie für die epithelialen Schichten wieder Ausgangswerte gemessen.

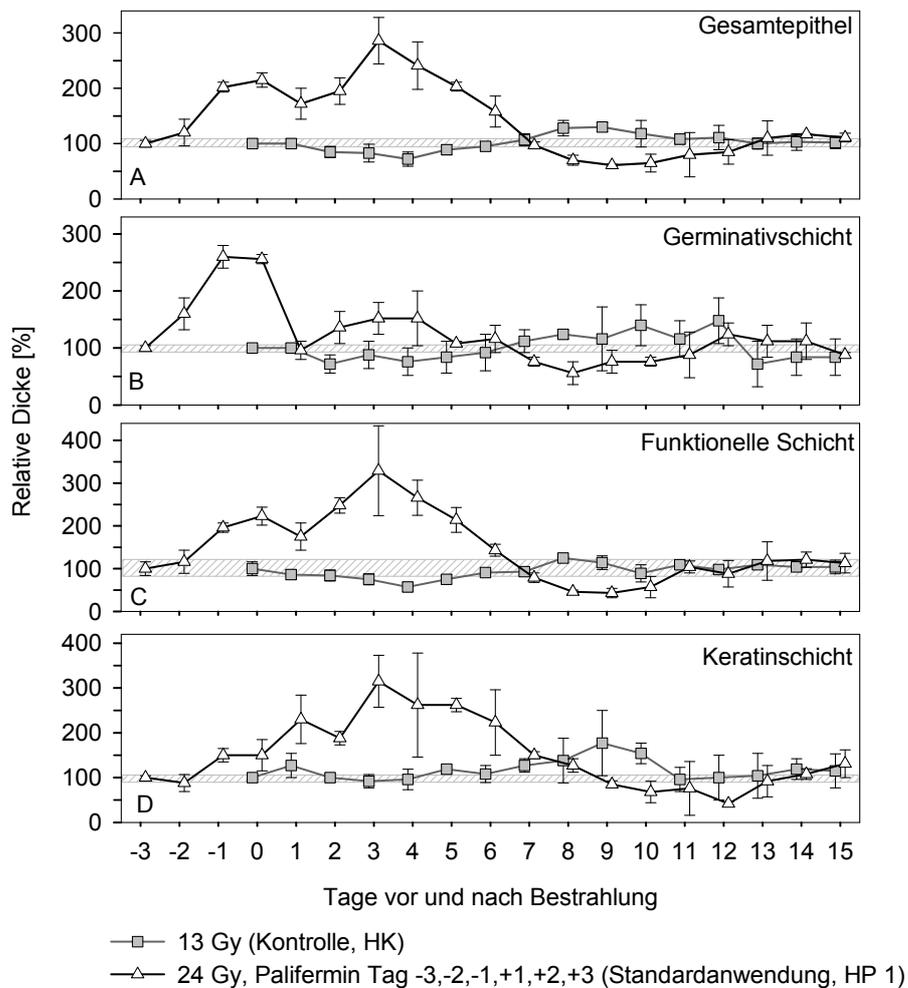


Abb. 22: Dicke des Gesamtepithels (A) und der einzelnen Schichten (B-D) nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und nach einer Einzeitbestrahlung (24 Gy, Standardanwendung) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Dicke von Gesamtepithel (A), Germinativschicht (B), funktioneller Schicht (C) und Keratinschicht (D). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Nach Palifermin-Applikation vor der Bestrahlung (Tag 0) ist das Epithel im Vergleich zum Normalwert doppelt so dick. Nach der Bestrahlung und bei Fortsetzung der Palifermin-Gabe für weitere drei Tage wird eine Zunahme der Epitheldicke bis zum Tag 3 registriert, bedingt v.a. durch eine Dickenzunahme der funktionellen Schicht und der Keratinschicht. Danach verringert sich die Epitheldicke und die erreichten Werte sind mit denen nach alleiniger Einzeitbestrahlung vergleichbar. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

Der zeitliche Verlauf der Veränderungen der Schichtdicken unterscheidet sich von demjenigen nach **alleiniger Einzeitbestrahlung**. Bereits zum Zeitpunkt der Bestrahlung ist das Epithel aufgrund der Palifermin-Applikation deutlich dicker als unbehandeltes Epithel. Nach der Bestrahlung nimmt die Epitheldicke bis zum Tag 3 weiter zu, während sich nach alleiniger Einzeitbestrahlung das Epithel im gleichen Zeitraum reduziert.

4.3.4.3 Zellvolumen

Nach der dreitägigen Palifermin-Applikation sind die Zellen größer (171 %) als unbehandelte Epithelzellen (Abb. 23). Am Tag nach der Einzeitbestrahlung wird ein geringeres Zellvolumen gemessen (62 %). Danach vergrößern sich die Zellen deutlich, bis am Tag 7 der Maximalwert mit einer Volumenerhöhung um das 2,4-fache des Ausgangswertes (337 %) erreicht wird. Der zeitliche Verlauf der Volumenänderung im Vergleich zu derjenigen nach **alleiniger Einzeitbestrahlung** zeigt, dass die Zellen nach der Palifermin-Standardbehandlung vorübergehend an den Tagen 3 bis 7 deutlich größer sind.

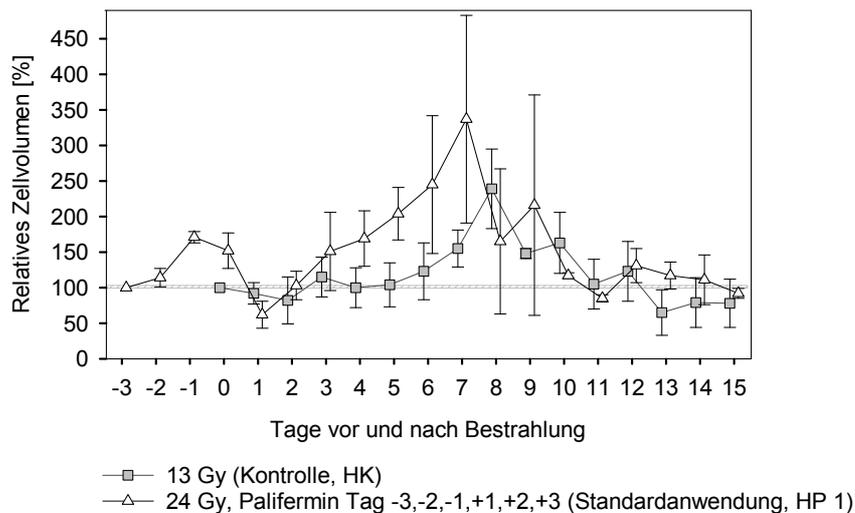


Abb. 23: *Relatives Zellvolumen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor und nach einer Einzeitbestrahlung (24 Gy, Standardanwendung) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle)*

Die Werte repräsentieren die täglichen Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Das Zellvolumen ist nach Palifermin-Gabe vor der Bestrahlung (Tag 0) deutlich erhöht. Nach der Bestrahlung ist der zeitliche Verlauf der Volumenänderung mit dem nach alleiniger Einzeitbestrahlung vergleichbar. An den Tagen 3 bis 7 sind die Zellen aber deutlich größer.

4.3.5 Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor der Einzelzeitbestrahlung
4.3.5.1 Zellzahl

Die dreitägige Palifermin-Applikation vor Bestrahlung bewirkt eine Zunahme der Gesamtzellzahl, so dass die Einzelzeitbestrahlung im vorliegenden Experiment auf ein Epithel mit erhöhter Zelldichte erfolgt.

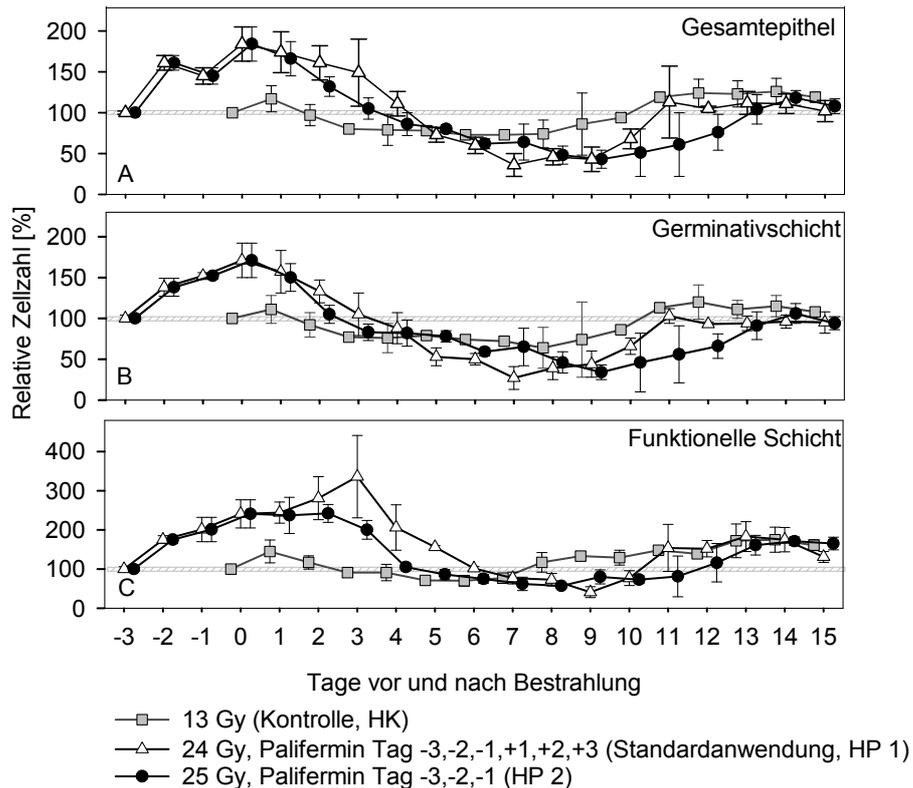


Abb. 24: Zellzahlen des Gesamtepithels (A) und der kernhaltigen Schichten (B, C) nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor einer Einzelzeitbestrahlung (25 Gy) im Vergleich zur alleinigen Einzelzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle) und zur Standardanwendung (24 Gy, Palifermin -3,-2,-1,+1,+2,+3)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Zellzahl im Gesamtepithel (A), in der Germinativschicht (B) und in der funktionellen Schicht (C). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Folge der Palifermin-Vorbehandlung ist eine Zunahme der Zellzahl auf das Doppelte des Ausgangswertes am Bestrahlungstag (Tag 0). Nach der Bestrahlung verringern sich die Zellzahlen im Gesamtepithel und in der Germinativschicht. In der funktionellen Schicht bleibt die Zelldichte bis zum Tag 3 deutlich erhöht. Minimalwerte werden im Vergleich zur Standardanwendung zwei Tage später erfasst. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

Nach der Bestrahlung nimmt die Zellzahl des Gesamtepithels und der Germinativschicht ab, bis am Tag 9 Minimalwerte (Gesamtepithel: 43 %, Germinativschicht: 34 %) erreicht werden (Abb. 24). In der funktionellen Schicht bleibt dagegen die erhöhte Zelldichte noch über drei Tage nach der Bestrahlung bestehen. Am Tag 4 ist die Zellzahl vergleichbar mit einem unbehandelten Epithel (105 %). Danach werden auch in dieser Schicht weniger Zellen als vor der Behandlung gezählt bis am Tag 8 der Minimalwert (57 %) gemessen wird. Zum Ende des Versuchs steigt die Zelldichte in allen Epithelschichten wieder an. Ab Tag 13 werden im Gesamtepithel und in der Germinativschicht wieder Normalwerte gemessen. In der funktionellen Schicht bleibt die Zelldichte bis zum Versuchsende erhöht.

4.3.5.2 Epitheldicke

Nach dreitägiger Palifermin-Applikation vor der Einzeitbestrahlung wird eine Verdickung des Gesamtepithels auf mehr als das Doppelte im Vergleich zum Ausgangswert gemessen (215 %, Abb. 25).

Nach der Bestrahlung nimmt die Epitheldicke bis zu einem Minimalwert (48 %) am Tag 12 ab. Die Keratinschicht wird dagegen dicker. Neun Tage nach der Bestrahlung ist diese Schicht im Vergleich zum Normalwert mehr als doppelt so dick (258 %). Danach verringert sich die Dicke dieser Schicht.

Da das Epithel nach der dreitägigen Palifermin-Vorbehandlung zum Zeitpunkt der Bestrahlung im Vergleich zum Normalwert deutlich verdickt ist, erfolgt **im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung** die Dickenabnahme vier Tage verzögert. **Im Vergleich zur Standardanwendung** wird eine Dickenreduktion des Gesamtepithels unter dem Normalwert ebenfalls 4 Tage später gemessen. Die Ursache für die relativ stabile Dicke des Gesamtepithels ist in der Keratinschicht zu sehen, die bis zum Tag 12 nach der Einzeitbestrahlung deutlich verstärkt ist und deren Dicke nur an den Tagen 13 und 14 leicht unter dem Ausgangsniveau liegt.

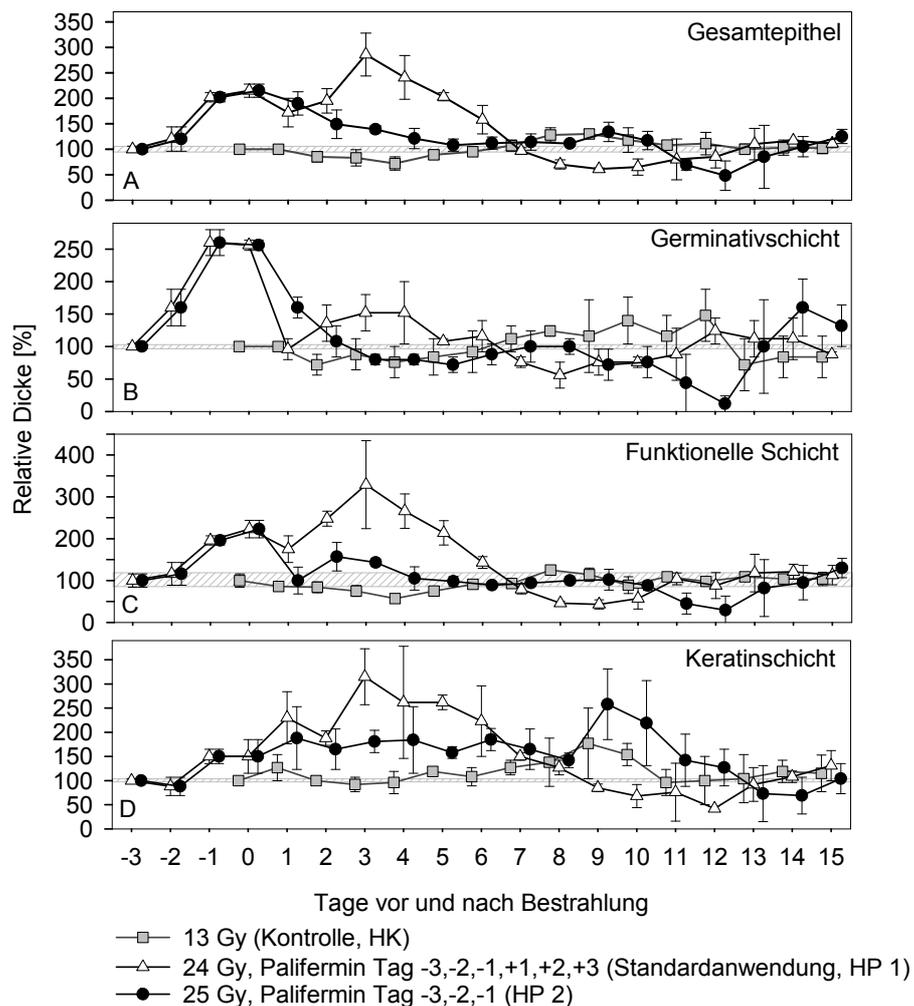


Abb. 25: Dicken des Gesamtepithels (A) und der einzelnen Schichten (B-D) nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor einer Einzeitbestrahlung (25 Gy) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermingabe (13 Gy, Kontrolle) und zur Standardanwendung (24 Gy, Palifermin -3,-2,-1,+1,+2,+3)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Dicke von Gesamtepithel (A), Germinativschicht (B), funktioneller Schicht (C) und Keratinschicht (D). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Nach Palifermin-Gabe ist zum Zeitpunkt der Bestrahlung (Tag 0) die Dicke des Gesamtepithels und der Teilschichten deutlich erhöht. Nach der Bestrahlung kommt es zur Reduktion der Dicke der Germinativschicht und der funktionellen Schicht. Die Dicke der Keratinschicht bleibt bis zum Tag 12 deutlich über den Ausgangswert erhöht. Erst am Tag 13 wird dieser unterschritten. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

4.3.5.3 Zellvolumen

Die Palifermin-Gabe vor der Bestrahlung führt neben einer Zunahme der Zellzahl und Epitheldicke auch zu einer Vergrößerung der Epithelzellen (Abb. 26).

Nach der Bestrahlung vergrößern sich die Zellen weiter bis zu einem Maximum von 236 % am Tag 8. Elf und zwölf Tage nach Bestrahlung sind die Zellen kleiner als vor der

Behandlung, wobei am Tag 12 ein Minimalwert von 15 % gemessen wird. Am Ende des Versuchs werden erneut etwas vergrößerte Zellen registriert. **Im Vergleich zur Standardanwendung** ist die Volumenzunahme der Epithelzellen nach der Einzeitbestrahlung weniger ausgeprägt und der Maximalwert tritt einen Tag später auf.

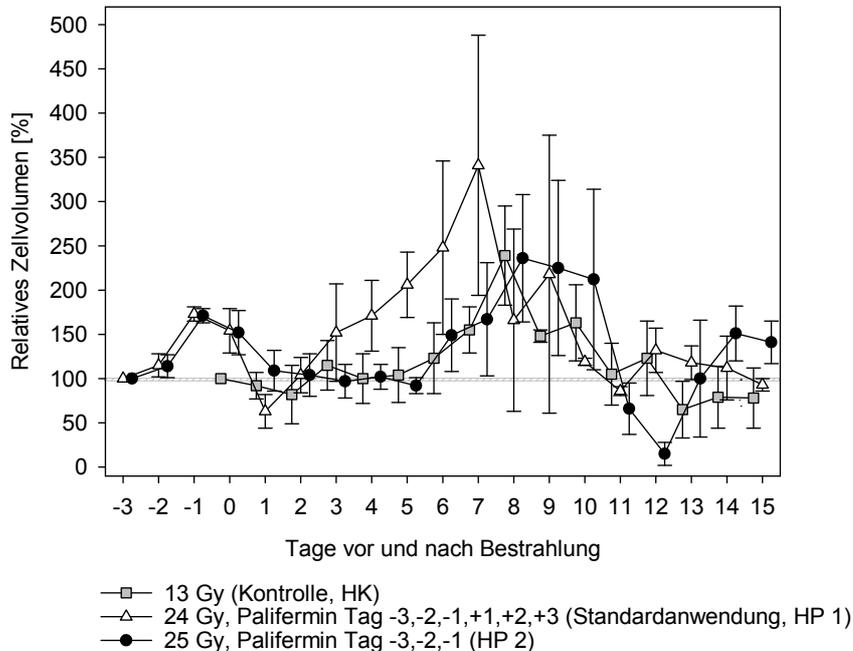


Abb. 26: *Relatives Zellvolumen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen vor einer Bestrahlung (25 Gy) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle) und zur Standardanwendung (24 Gy, Palifermin Tag -3,-2,-1 +1,+2,+3)*

Die Werte repräsentieren die täglichen Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Die Palifermin-Gabe vor der Bestrahlung führt zu einer Vergrößerung der Epithelzellen. Nach der Bestrahlung ähnelt der zeitliche Verlauf der Volumenänderung dem nach alleiniger Einzeitbestrahlung. Im Vergleich zur Standardanwendung ist der Maximalwert der Volumenzunahme geringer und tritt einen Tag später auf.

4.3.6 Quantitative Analyse histologischer Veränderungen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung

4.3.6.1 Zellzahl

Einen Tag nach der Bestrahlung werden im Gesamtepithel mehr Zellen (122 %) als im un-behandelten Epithel erfasst (Abb. 27). Am folgenden Tag (Tag 2) werden weniger Zellen registriert (89 %), am Tag 3 steigt die Zelldichte wieder über den Ausgangswert an (110 %). Dieser Anstieg der Gesamtzellzahl ist auf die Zunahme der Zelldichte in der funktionellen Schicht am Tag 3 (242 %) zurückzuführen. Während die Zellzahl der Germinativschicht bereits ab Tag 2 abnimmt, werden im Gesamtepithel und in der

funktionellen Schicht erst ab Tag 4 bzw. Tag 5 weniger Zellen als vor der Behandlung registriert. Minimalwerte werden im Gesamtepithel (35 %) sowie in der Germinativschicht (26 %) am Tag 5 und in der funktionellen Schicht (70 %) am Tag 9 beobachtet. Zehn Tage nach der Bestrahlung sind im Gesamtepithel sowie in der Germinativschicht die Ausgangswerte wieder erreicht. Die Zelldichte der funktionellen Schicht ist dagegen bis zum Versuchsende erhöht (Tag 10 bis 15: 133 % bis 199 %).

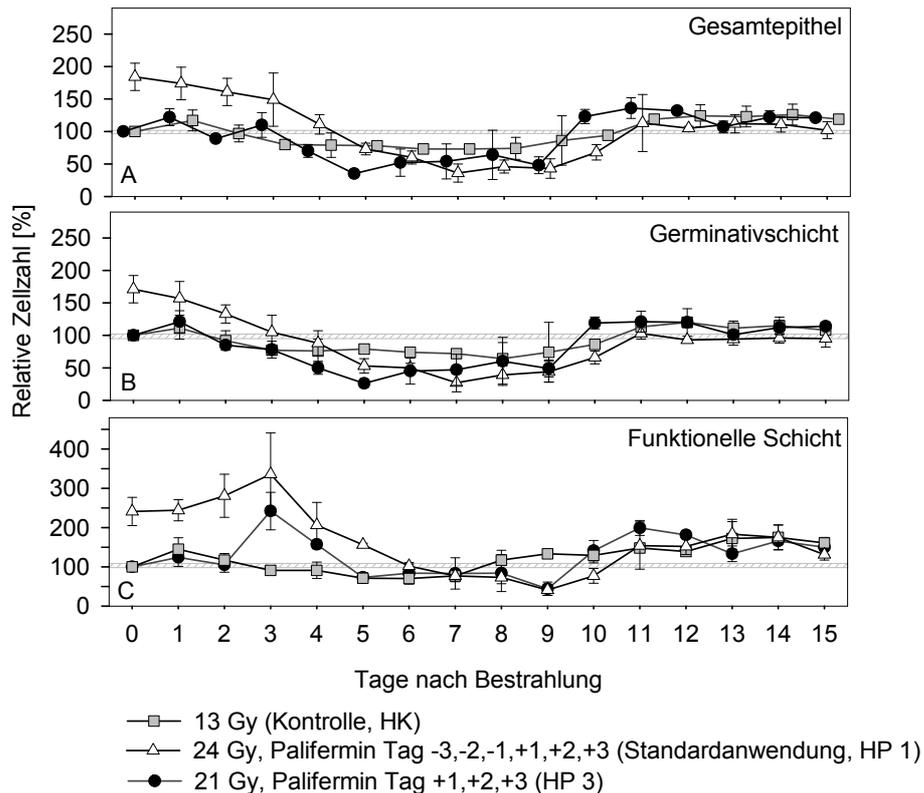


Abb. 27: Zellzahlen des Gesamtepithels (A) und der kernhaltigen Schichten (B, C) nach Palifermin-Applikation an drei Tagen nach einer Einzeitbestrahlung (21 Gy) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle) und zur Standardanwendung (24 Gy, Palifermin Tag -3,-2 -1,+1,+2,+3)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Zellzahl im Gesamtepithel (A), in der Germinativschicht (B) und in der funktionellen Schicht (C). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Trotz Palifermin-Applikation nach der Bestrahlung verringert sich die Zelldichte in der Germinativschicht ab Tag 2. Dagegen nimmt die Zellzahl in der funktionellen Schicht bis zum Tag 3 zu. Erst danach nimmt die Zellzahl auch in dieser Schicht ab. Minimalwerte werden an den Tagen 5 bzw. 9 erreicht. Im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe und zur Standardanwendung werden minimale Zellzahlen früher erreicht. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

Im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe erfolgt die strahlenbedingte Verringerung der Zelldichte im Gesamtepithel und in der funktionellen Schicht mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Tagen. Dagegen werden minimale Zellzahlen im Gesamtepithel und in der Germinativschicht ein bis drei Tage früher und

ausgeprägter beobachtet. **Im Vergleich zur Standardanwendung** erfolgt bei Palifermin-Gabe ausschließlich nach der Bestrahlung die Reduktion der Zellzahl schneller und minimale Zellzahlen werden im Gesamtepithel und in der Germinativschicht zwei Tage früher gefunden. Bei beiden Protokollen zeigt sich in der funktionellen Schicht eine Erhöhung der Zellzahl bis Tag 3 nach der Bestrahlung, die zum Erhalt der Gesamtzellzahl über den Ausgangswert bis zum Tag 3 beiträgt.

4.3.6.2 Epitheldicke

Das Gesamtepithel ist drei bis vier Tage nach der Bestrahlung doppelt so dick (204 % bis 209 %) wie vor der Behandlung (Abb. 28). Alle drei Epithelschichten tragen zu dieser Dickenzunahme bei. Danach verringert sich die Dicke des Gesamtepithels sowie der drei Einzelschichten. Minimalwerte werden sieben bis elf Tage nach der Bestrahlung erreicht. Im weiteren Verlauf nimmt die Dicke des Epithels wieder zu. Ausgangswerte werden im Gesamtepithel und der funktionellen Schicht am Tag 10 und in der Keratinschicht am Tag 12 gemessen. Die Germinativschicht ist an den Tagen 10 und 11 dicker als vor der Behandlung (140 % bzw. 188 %). Nachdem die Dicke dieser Schicht am Tag 14 erneut deutlich vermindert ist (48 %), liegt sie am Tag 15 wieder im Bereich des Normalwertes. Der Verlauf der Schichtdickenänderungen unterscheidet sich von dem nach **alleiniger Einzeitbestrahlung**. Palifermin bewirkt eine deutliche Zunahme aller Schichtdicken bis zum Tag 3 bis 4, während diese nach alleiniger Einzeitbestrahlung sofort abnehmen. Minimale Werte treten nach Palifermin-Applikation drei bis vier Tage später auf als nach alleiniger Einzeitbestrahlung. **Im Vergleich zur Standardanwendung** unterscheiden sich die Schichtdickenänderungen kaum. Die Dicke des Gesamtepithels und der Einzelschichten ist am Bestrahlungstag (Tag 0) geringer. Die Reduktion der Schichtdicken nach der Bestrahlung erfolgt schneller und die Minimalwerte werden ein bis zwei Tage eher erreicht.

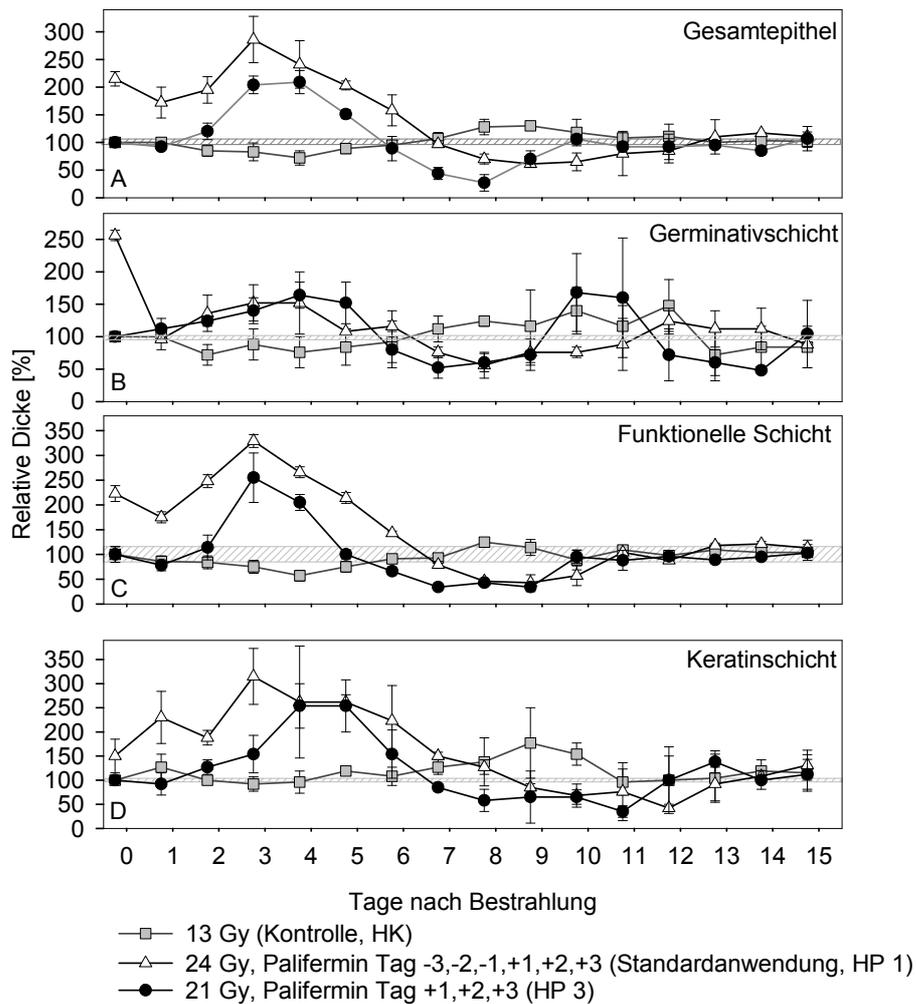


Abb. 28: Dicken des Gesamtepithels (A) und der einzelnen Schichten (B-D) nach Palifermin-Applikation an drei Tagen nach einer Einzeitbestrahlung (21 Gy) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle) und zur Standardanwendung (24 Gy, Palifermin Tag -3,-2,-1,+1,+2,+3)

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen der Dicke von Gesamtepithel (A), Germinativschicht (B), funktioneller Schicht (C) und Keratinschicht (D). Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Die Epitheldicke nimmt bei Palifermin-Gabe an den drei Tagen nach der Bestrahlung bis auf das Doppelte des Ausgangswertes zu. Alle drei epithelialen Schichten sind an dieser Dickenzunahme beteiligt. Danach verringert sich die Dicke des Gesamtepithels und der drei Einzelschichten. Minimale Werte werden an den Tagen 7 bis 11 erreicht. Die Fehlerbalken repräsentieren $MW \pm SD$ ($n = 3$).

4.3.6.3 Zellvolumen

Bei Palifermin-Gabe an den drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung nimmt das Zellvolumen der Zellen in der Germinativschicht deutlich zu (Abb. 29).

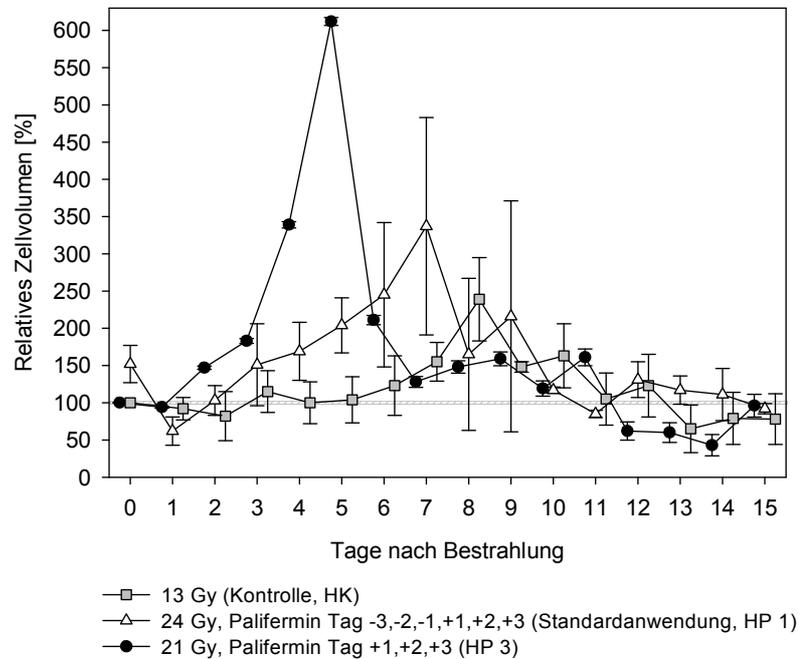


Abb. 29: Relatives Zellvolumen nach Palifermin-Applikation an drei Tagen nach einer Einzeitbestrahlung (21 Gy) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung ohne Palifermin-Gabe (13 Gy, Kontrolle) und zur Standardanwendung (24 Gy, Palifermin Tag -3,-2,-1,+1,+2,+3)

Die Werte repräsentieren die täglichen Mittelwerte (MW \pm SD) von jeweils drei Mäusen. Der Normalwert eines unbehandelten Epithels ist als schraffierter Bereich dargestellt. Die Volumenzunahme bei Palifermin-Gabe nach der Bestrahlung ist deutlich ausgeprägter und tritt früher auf als nach alleiniger Einzeitbestrahlung und Standardanwendung.

Am Tag 5 nach der Bestrahlung weisen die Zellen im Vergleich zum Normalwert die sechsfache Größe (612 %) auf. Im weiteren Versuchsverlauf werden die Zellen wieder kleiner und die Volumina bewegen sich ab Tag 7 näher am Normalwert. Ab Tag 12 verkleinern sie sich auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes, bevor sie am Ende des Versuchs den Normalwert erreichen (Tag 15: 96 %). Im Vergleich zur **alleinigen Einzeitbestrahlung** ohne Palifermin-Gabe und zur **Standardanwendung** ist die Volumenzunahme nach der Bestrahlung und folgender Paliferminbehandlung deutlich stärker ausgeprägt und wird früher beobachtet.

4.3.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zu histologischen Veränderungen des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung und Palifermin-Applikation

Die durchschnittliche Zellzahl im **unbehandelten Epithel** der Zungenunterseite von Mäusen beträgt 560 ± 9 Zellen/mm Epithellänge, wobei sich 81 % der Zellen in der Germinativschicht befinden. Das Epithel ist im Durchschnitt 106 ± 6 μm dick. Die funktionelle Schicht hat dabei mit 52 % den größten Anteil. Die Germinativschicht und die Keratinschicht nehmen jeweils ein Viertel der Gesamtdicke ein.

Nach einer **alleinigen Einzeitbestrahlung** mit 13 Gy verringern sich Zellzahl (Minimalwert Tag 6 bis 8, 73-74 %) und Schichtdicke (Minimalwert Tag 4, 72 %). Es tritt eine Zunahme des Volumens der Zellen bis zu einem Maximalwert am Tag 8 (238 %) auf. Die **dreitägige Palifermin-Applikation vor der Einzeitbestrahlung** induziert im Epithel eine deutliche Hyperplasie (184 %), verursacht durch Zellzahlerhöhung in der Germinativschicht und in der funktionellen Schicht. Zusätzlich wird eine Dickenzunahme des Epithels gemessen (215 %). Im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung sind zum Bestrahlungszeitpunkt (Tag 0) die Zelldichte und die Dicke des Epithels etwa doppelt so groß.

Wird Palifermin zusätzlich an drei Tagen nach der Bestrahlung appliziert (**Standardanwendung**), erfolgt die Abnahme der epithelialen Zelldichte verzögert, basierend auf einer Erhöhung der Zellzahl in der funktionellen Schicht. Die Epitheldicke nimmt bis Tag 3 weiter zu, verursacht durch eine Zunahme der Dicke der funktionellen Schicht und der Dicke der Keratinschicht sowie durch eine stärkere Volumenzunahme der Epithelzellen.

Erfolgt die **Palifermin-Applikation nur an drei Tagen vor der Einzeitbestrahlung**, wird die Zellzahlreduktion früher als bei der Standardanwendung beobachtet. Minimalwerte werden aber später erreicht. Eine deutliche Dickenzunahme der Keratinschicht wird bis Tag 9 nach der Bestrahlung gefunden. Die Volumenzunahme der Epithelzellen ist im Vergleich zur Standardanwendung geringer.

Wird den Mäusen **Palifermin nur an drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung** appliziert, erfolgt die Reduktion der Zellzahl und Epitheldicke im Vergleich zur Standardanwendung schneller. Minimalwerte werden früher erreicht. Deutlich größere Zellen werden am Tag 5 registriert.

5 Diskussion

5.1 Radiogene orale Mukositis und Keratinozyten-Wachstumsfaktor

Die orale Mukositis ist eine der bedeutendsten frühen Nebenwirkungen einer therapeutischen oder akzidentiellen Strahlenexposition. Die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist sehr schmerzhaft und geht mit deutlichen Beschwerden beim Schlucken, Sprechen und Schmecken einher. Das Allgemeinbefinden und die Lebensqualität der Patienten sind stark beeinträchtigt (DÖRR et al. 2005). Keime können über die geschädigte Mundschleimhaut in die Blutbahn gelangen und Infektionen sowie lebensbedrohliche Septikämien hervorrufen (DÖRR et al. 2008). Häufig muss die onkologische Therapie für mehrere Wochen unterbrochen werden, was die Aussichten auf vollständige Tumorheilung verschlechtert (FOWLER und LINDSTRÖM 1992, FU et al. 2000, OVERGAARD et al. 2003).

Bisher gibt es keine befriedigenden Maßnahmen für die Prophylaxe oder Therapie der oralen Mukositis. Eine große Anzahl experimenteller und klinischer Ansätze werden diskutiert (DÖRR et al. 2007). Einen aktuellen Behandlungsansatz liefern Untersuchungen mit dem rekombinanten humanen Keratinozyten-Wachstumsfaktor ($\Delta 23$ -rHuKGF, Palifermin). In präklinischen Untersuchungen kann durch die Applikation von Palifermin eine signifikante Verringerung der Schleimhautreaktion nach Einzeitbestrahlung, fraktionierter Bestrahlung und Radiochemotherapie nachgewiesen werden (DÖRR et al. 2001, 2002, 2005a, 2005b, 2005c). Klinische Studien der Phase III zeigen eine signifikante Reduktion der oralen Mukositis bei Palifermin-Gabe nach Konditionierungstherapie vor Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation (SPIELBERGER et al. 2004) sowie bei der postoperativen Radiochemotherapie fortgeschrittener Kopf-Hals-Tumoren (HENKE et al. 2008).

Palifermin ist seit 2004 in den USA (FDA 2004) und seit 2005 in der Europäischen Union (EMA 2005) zur Reduktion der Dauer und des Schweregrades der oralen Mukositis nach Konditionierungstherapie vor Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation im Rahmen der Behandlung hämatologischer Tumoren zugelassen. Die Anwendung von Palifermin erfolgt dabei als intravenöse Injektion von 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Konditionierungstherapie.

In der vorliegenden Arbeit wird am Modell der Zungenschleimhaut der Maus geprüft, inwieweit eine Verringerung der Anzahl der beim Menschen üblichen Palifermin-Applikationen ohne Wirkungsverlust oder sogar mit gesteigerter Wirksamkeit von Palifermin möglich ist. Dabei wird zuerst die beim Menschen zugelassene Anwendung von Palifermin mit Applikation an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach Einzeitbestrahlung auf das Modell des Zungenepithels der Maus übertragen (Standardanwendung) und das Auftreten von Ulzera sowie die histologischen Veränderungen der murinen Zungenschleimhaut untersucht. Danach werden die klinischen Effekte von Palifermin sowie die histologischen Veränderungen der Mundschleimhaut erfasst, wenn die Palifermin-Gaben vor und/oder nach der Bestrahlung reduziert werden.

5.2 Zungenepithel der Maus als Tiermodell

Das Zungenepithel der Maus ist ein etabliertes Modell für die Untersuchung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut. Die Zunge der Maus ist leicht zugänglich und die Schleimhautreaktion gut zu beurteilen. Durch Einschränkung des Bestrahlungsfeldes auf ein kleines Testfeld der Zungenunterseite werden die Belastungen der Tiere auf ein Minimum reduziert (DÖRR 1987, DÖRR et al. 1993).

NICKSTADT (2000) analysiert die Daten verschiedener Experimentatoren am Mausmodell mit C3H/Neu-Mäusen. Ulzerative Läsionen als klinisch relevanter Endpunkt und Grundlage der Dosis-Effekt-Analysen in der vorliegenden Arbeit stellen eindeutige und reproduzierbar zu beurteilende Reaktionen dar. Sie unterliegen in ihrer Beurteilung kaum subjektiven Einflüssen und die ED₅₀-Werte verschiedener Untersucher variieren nur wenig. Dagegen zeigen die zeitlichen Parameter, Latenzzeit und Ulkusdauer, größere Schwankungen bei den verschiedenen Analysen. Um individuelle Einflüsse bei der Beurteilung der Untersuchungsparameter zu vermeiden, erfolgt in der vorliegenden Arbeit die Beurteilung der Schleimhautreaktion ausschließlich durch die Autorin. Bei den histologischen Untersuchungen sind Zelldichte und Schichtdicke objektive Endpunkte.

Das Geschlecht der Mäuse sowie die zur Bestrahlung erforderliche Narkose haben keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit oder den Verlauf der Schleimhautreaktion (DÖRR 1987, 1997). Jedoch ist der verwendete Mäusestamm von Bedeutung. Die beiden Tierstämme C3H/Neu und BDF-1 zeigen Unterschiede in der Proliferationskinetik des Epithels (DÖRR et al. 2002b). Die Gesamtzellzahl ist im Epithel der C3H/Neu-Mäuse nur halb so groß wie im Epithel der BDF-1-Mäuse. Letztere weisen im Vergleich zu C3H/Neu-Mäusen eine signifikant höhere Proliferationsrate auf und die Umsatzzeit ist um den Faktor 2 verkürzt (POTTEN et al. 2002b, POTTEN et al. 2002c). Auf Grund der Unterschiede zwischen den Mäusestämmen können nur Untersuchungen mit dem gleichen Mäusestamm miteinander verglichen werden.

Bei jedem Tiermodell besteht die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Der histologische Aufbau des Zungenepithels ist bei Maus und Mensch wie auch bei Hund und Katze grundlegend identisch. Auch zellkinetische Parameter, Proliferationsverhalten sowie die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut - bestimmt durch die gleichen intra- und interzellulären sowie parakrinen Einflüsse – sind bei Maus und Mensch im Wesentlichen vergleichbar (DÖRR et al. 1994).

Das Epithel von Maus und Mensch unterscheidet sich in der Verhornung. Während bei der Maus das gesamte Epithel in der Mundhöhle verhornt ist, weist die Mundschleimhaut des Menschen nur an stark beanspruchten Stellen (Gaumen, Gingiva) eine Keratinisierung auf (MÜLLER 2001). Verhornungsprozesse können beim Menschen jedoch bereits früh unter fraktionierter Strahlentherapie beobachtet werden (DÖRR, persönliche Mitteilung). Aus strahlenbiologischer Sicht ist der Unterschied des Zungenepithels von Mensch und Maus jedoch von untergeordneter Bedeutung, da die Strahlenreaktion von Proliferations- und initialen Differenzierungsprozessen dominiert wird und vom terminalen Verhornungsgrad weitgehend unabhängig ist.

Die qualitativen Daten der strahlenbiologischen Untersuchungen an der Maus können auf den Menschen und auf die Patienten der Veterinärmedizin übertragen werden. Eine quantitative Übertragung der experimentellen Daten ist aber nur eingeschränkt möglich und bedarf einer entsprechenden Absicherung durch klinische Ergebnisse (DÖRR 1997).

5.3 Strahlenreaktion des Epithels der Zungenunterseite nach Einzeitbestrahlung

Die Strahlenreaktion des Epithels wird in der vorliegenden Arbeit durch eine Einzeitbestrahlung definiert. Die Ulkusfrequenz, der strahlenbiologische Endpunkt der Strahlenreaktion, zeigt eine eindeutige Dosisabhängigkeit. Die ED₅₀ wird in den eigenen Untersuchungen mit $11,0 \pm 1,3$ Gy bestimmt. Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen u.a. von DÖRR (1997), NICKSTADT (2000), DÖRR et al. (2001) und KILIC et al. (2007) im gleichen Tiermodell.

Die Latenzzeit ist in der vorliegenden Arbeit unabhängig von der Strahlendosis. Die mittlere Latenzzeit beträgt $10,0 \pm 0,7$ Tage. Frühere Untersuchungen ergeben ebenfalls Latenzzeiten zwischen 9 Tagen und 12 Tagen (z.B. DÖRR und KUMMERMEHR 1991, DÖRR 1997, NICKSTADT 2000, DÖRR et al. 2001, DÖRR et al. 2005, KILIC et al. 2007). Die Ulkusdauer beträgt durchschnittlich $3,4 \pm 1,0$ Tage und ist nur tendenziell von der Strahlendosis abhängig. Andere Untersuchungen zeigen ähnliche Werte von 2 Tagen bis 4 Tagen (z.B. DÖRR und KUMMERMEHR 1991, DÖRR 1997, NICKSTADT 2000, DÖRR et al. 2001, DÖRR et al. 2005, KILIC et al. 2007).

Die Mäuse tolerieren die lokale Einzeitbestrahlung der Zungenunterseite sehr gut. Das Körpergewicht wird kaum beeinträchtigt. Die geringen Gewichtsveränderungen im Versuchsverlauf werden auf die Narkose, die zur Beurteilung der Strahlenreaktion unerlässlich ist, zurückgeführt (DÖRR 1997).

5.4 Einfluss von Palifermin auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut

In der vorliegenden Arbeit wird in einem Tiermodell erstmalig die Wirkung einer reduzierten Anzahl an Palifermin-Applikationen vor und nach der Einzeitbestrahlung im Vergleich zur Standardanwendung untersucht. Vergleichbare Studien wurden bisher nicht publiziert.

Palifermin erhöht in allen durchgeführten Versuchsprotokollen signifikant die Strahlentoleranz des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung. Erfolgt die Palifermin-Applikation entsprechend der klinischen Anwendung beim Menschen an jeweils drei Tagen unmittelbar vor und nach der Einzeitbestrahlung, wird die ED₅₀ im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung auf das Doppelte erhöht (DMF = 2,0). Die vorliegenden Daten bestätigen somit die Palifermin-Wirkung beim Menschen.

Wird die Palifermin-Behandlung vor der Bestrahlung auf zwei Applikationen (Tag -3,-2 bzw. Tag -2,-1) reduziert, ist der mukoprotektive Effekt im Vergleich zur Standardanwendung geringer. Die ED₅₀ ist nur auf das 1,7-fache im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung erhöht. Wird dagegen die dreitägige Palifermin-Behandlung vor der Bestrahlung durch eine einmalige Applikation von 15 mg/kg ersetzt, bleibt die mukoprotektive Wirkung von Palifermin im Vergleich zur Standardanwendung unverändert.

Wird im Vergleich zur Standardanwendung die Palifermin-Gabe nach der Einzeitbestrahlung auf zwei Applikationen (Tag +1,+2 oder Tag +2,+3) oder auf eine Applikation (15 mg/kg) reduziert, ist die mukoprotektive Wirkung von Palifermin stärker. Der DMF beträgt 2,6 bis 2,9. Im Vergleich zur Standardanwendung ist die ED₅₀ noch einmal auf das 1,3- bis 1,4-fache erhöht.

Erfolgt die Palifermin-Applikation (15 mg/kg) nur je einmal drei Tage vor und am dritten Tag nach der Einzeitbestrahlung, ist der mukoprotektive Effekt im Vergleich zur Standardanwendung stärker und die ED₅₀ auf das 1,4-fache erhöht.

Die vorliegenden Befunde bestätigen die Ergebnisse früherer Untersuchungen (u.a. DÖRR et al. 2001, 2005a, 2005b, 2005c) und zeigen das mukoprotektive Potential von Palifermin in der Prophylaxe der radiogenen oralen Mukositis. Der Effekt der beim Menschen üblichen Palifermin-Anwendung mit Gabe an drei Tagen vor und nach der Konditionierung wird in der vorliegenden Arbeit am Tiermodell der Mundschleimhaut der Zungenunterseite der Maus bestätigt (Standardanwendung). Der mukoprotektive Palifermin-Effekt kann durch Reduktion der Palifermin-Gaben im Vergleich zur Standardanwendung deutlich erhöht werden. Wird die Palifermin-Gabe vor der Einzeitbestrahlung auf eine oder zwei Applikationen reduziert, ist der mukoprotektive Effekt des Wirkstoffes im Vergleich zur Standardanwendung signifikant geringer oder vergleichbar. Wird Palifermin dagegen nach der Einzeitbestrahlung auf eine bzw. zwei Anwendungen reduziert, wird eine signifikante Verbesserung des mukoprotektiven Effekts von Palifermin gefunden. Die ulzerativen Läsionen treten dabei später auf und bestehen kürzer, insbesondere wenn die Palifermin-Gabe unmittelbar nach der Einzeitbestrahlung erfolgt. Eine ausgeprägte Wirkungsverbesserung wird auch gemessen, wenn Palifermin nur jeweils als eine Applikation drei Tage vor und nach der Einzeitbestrahlung verabreicht wird.

5.5 Histologische Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit beträgt die durchschnittliche Zellzahl im unbehandelten Epithel 560 ± 9 Zellen/mm. Davon befinden sich 81 % in der Germinativschicht (452 ± 16 Zellen/mm Epithellänge). DÖRR und KUMMERMEHR (1991) beschreiben im Epithel der Schleimhaut der Zungenunterseite von C3H/Neu-Mäusen durchschnittlich 430 ± 12 Zellen/mm Epithellänge, von denen 71 % (306 ± 5 Zellen/mm) zur Germinativschicht

gehören. In den Untersuchungen von KLAMMT (2005) werden durchschnittlich 519 ± 21 Zellen/mm im Zungenepithel des gleichen Mäusestammes gezählt, davon 73 % (377 ± 14 Zellen/mm) in der Germinativschicht. Übereinstimmend zeigen alle Untersuchungen, dass sich mehr als zwei Drittel der Epithelzellen in der Germinativschicht befinden. Die unterschiedlichen Gesamtzellzahlen auch bei Tieren des gleichen Stammes beruhen vermutlich auf unterschiedliche Haltungsbedingungen. Die Untersuchungen von DÖRR und KUMMERMEHR (1991) werden in den Tierräumen des GSF-Forschungszentrums München-Neuherberg (jetzt Helmholtz-Zentrum München) durchgeführt. Die Arbeit von KLAMMT (2005) und die vorliegenden Untersuchungen erfolgen in den Einrichtungen der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden. Unterschiedliche Futterzusammensetzungen und Haltungsbedingungen führen möglicherweise zu Unterschieden in der mechanischen Beanspruchung der Mundschleimhaut und damit zu einer differentiellen Zelldichte im Epithel.

5.5.1 Zellzahl

Nach alleiniger Einzeitbestrahlung mit 13 Gy nimmt die Zellzahl im Gesamtepithel, in der Germinativschicht und in der funktionellen Schicht ab. Der Zellverlust entspricht mit 20 % am Tag 2 und 17 % am Tag 3 nach der Bestrahlung der normalen täglichen Verlustrate im unbestrahlten Epithel (19,4 %, DÖRR und KUMMERMEHR 1991). Wäre auch an den Folgetagen die Zellproduktion vollständig unterdrückt, würden minimale Zellzahlen nach 5 Tagen (Umsatzzeit des Epithels, DÖRR und KUMMERMEHR 1991) auftreten. In der vorliegenden Arbeit beträgt die tägliche Zellverlustrate ab dem vierten Tag nach der Bestrahlung jedoch nur 0 % bis 5 % und die geringste Zelldichte wird erst nach 6 Tagen bis 8 Tagen registriert. Die verlangsamte Verringerung der Zellzahl deutet darauf hin, dass auch noch unmittelbar nach der Bestrahlung proliferative Aktivität im Epithel vorhanden ist. Histologische Untersuchungen am Tiermodell der Schleimhaut der Zungenunterseite von C3H/Neu-Mäusen von DÖRR und KUMMERMEHR (1991), DÖRR (1997), LACMANN (2001) und KLAMMT (2005) zeigen nach lokaler Einzeitbestrahlung einen mit den eigenen Untersuchungen vergleichbaren Verlauf der Zellzahlveränderungen. Eine deutliche Abnahme der Zellzahl wird an den ersten beiden Tagen nach der Bestrahlung registriert. Danach ist der tägliche Zellverlust vermindert und minimale Zellzahlen werden am Tag 7 (KLAMMT 2005), am Tag 8 (DÖRR und KUMMERMEHR 1991) sowie an den Tagen 9 bis 10 (DÖRR 1997, LACMANN 2001) registriert. Gezielte proliferationskinetische Untersuchungen werden von DÖRR (1997) am Zungenepithel von C3H/Neu-Mäusen nach einer Einzeitbestrahlung (20 Gy) durchgeführt. Bereits am Tag 2 wird wieder eine Zellproduktion registriert, die zu der beschriebenen Verlängerung der Latenzzeit bis zum Auftreten ulzerativer Läsionen im Vergleich zur Umsatzzeit des Epithels führt (DÖRR 1997). Außerdem kann im Zeitraum zwischen Einzeitbestrahlung und Tag 13 kein Tagesrhythmus der Proliferationsparameter gefunden werden.

In den vorliegenden Untersuchungen sowie in den Arbeiten von DÖRR und KUMMERMEHR (1991) und KLAMMT (2005) besteht eine Diskrepanz zwischen dem Auftreten minimaler Zellzahlen und dem Sichtbarwerden ulzerativer Läsionen. Während die minimale Zelldichte bereits an den Tagen 6 bis 8 erreicht wird, werden ulzerative Läsionen erst an den Tagen 10 bis 11 registriert, an denen bereits eine Normalisierung der Zellzahlen eingetreten ist. Die klinische Latenzzeit spiegelt nicht die Zelldichte im Epithel wider. Sie wird maßgeblich durch das Auftreten der die ulzerative Läsion bedeckenden Pseudomembran beeinflusst (DÖRR et al. 2002b). Auch Untersuchungen an der humanen Mundschleimhaut zeigen, dass bei Auftreten der klinischen Strahlenreaktion die Repopulierung des Epithels auf zellulärer Ebene bereits begonnen hat (DÖRR et al. 2002c).

In den eigenen Untersuchungen wird nach Palifermin-Gabe vor einer Einzeitbestrahlung eine deutliche Zunahme der Zellzahl gemessen. Nach drei Palifermin-Applikationen ist die Zelldichte im Epithel nahezu verdoppelt. Die Daten sind in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen von POTTEN et al. (2002), die nach dreitägiger Palifermin-Applikation (5 mg/kg s.c.) im unbehandelten Zungenepithel von BDF-1-Mäusen eine Verdopplung der Zellzahl zeigen.

Wird die Palifermin-Gabe nach Einzeitbestrahlung an drei aufeinander folgenden Tagen fortgesetzt (Standardanwendung), verringert sich die Zelldichte im Gesamtepithel verzögert, basierend auf einer Zunahme der Zellzahl in der funktionellen Schicht. Minimalwerte werden trotz der erhöhten Zelldichte zum Zeitpunkt der Bestrahlung zum gleichen Zeitpunkt erreicht, wie sie nach alleiniger Einzeitbestrahlung auftreten.

Wird die Palifermin-Gabe nach der Einzeitbestrahlung nicht weitergeführt, entspricht der Verlauf der Zellzahl dem nach alleiniger Einzeitbestrahlung. Infolge der Palifermin-Vorbehandlung ist die Zelldichte zum Zeitpunkt der Bestrahlung deutlich größer, so dass minimale Zellzahlen zwei bis drei Tage später erreicht werden. Auch in Untersuchungen von POTTEN et al. (2002a) werden minimale Zellzahlen nach Palifermin-Gabe (125 µg/Maus/Tag) an drei aufeinander folgenden Tagen vor der Einzeitbestrahlung (20 Gy) einen Tag später als nach alleiniger Einzeitbestrahlung registriert. Voraussetzung für die verzögerte Zellzahlabnahme ist, dass die im Überschuss produzierten Zellen nicht durch Apoptose verloren gehen, wie es im unbehandelten Epithel der Fall wäre (DÖRR et al. 2000).

Wird Palifermin nur an drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung appliziert, verringert sich die Zellzahl im Vergleich zur Einzeitbestrahlung beschleunigt. Der tägliche Zellverlust beträgt 35 % bis 40 % und ist damit deutlich größer als in einem unbehandelten Epithel (19,4 %, DÖRR und KUMMERMEHR 1991). Die minimale Zellzahl wird bereits am Tag 5 gemessen, einen Tag früher als nach alleiniger Bestrahlung. Der Grund ist unklar und aus den histologischen Untersuchungen nicht abzuleiten.

5.5.2 Epitheldicke

Die Dicke des Epithels nimmt nach alleiniger Einzeitbestrahlung bis Tag 4 ab (72 %). Ab Tag 5 nimmt sie wieder zu, am Tag 7 werden Normalwerte erreicht und ab Tag 8 überschritten. Verursacht wird die Zunahme der Epitheldicke ab Tag 5 durch eine Vergrößerung der Epithelzellen. Am Tag 8 wird das dickste Epithel gemessen (128 %), gleichzeitig ist das Volumen der Epithelzellen (Germinativschicht) am größten (239 %). Auch KLAMMT (2005) beschreibt diese Veränderung.

Die Palifermin-Gabe an drei aufeinander folgenden Tagen induziert im unbehandelten Epithel eine Zunahme der Epitheldicke auf das Doppelte des Ausgangswertes. FARRELL et al. (1999) messen bei BDF-1-Mäusen bereits nach einer Palifermin-Applikation (5 mg/kg s.c.) einen Anstieg der Epitheldicke von Zungenrücken und Ösophagus. Nach vier weiteren Palifermin-Gaben ist das Epithel im Vergleich zum Ausgangswert doppelt so dick. Eine Verdopplung der Dicke des Zungenepithels nach dreitägiger Palifermin-Applikation (5 mg/kg s.c.) zeigen auch histologische Untersuchungen von POTTEN et al. (2002) mit BDF-1-Mäusen. Die Dickenzunahme des Epithels wird zum einen auf die Erhöhung der Zellzahl im Epithel, zum anderen auf eine Volumenzunahme der Zellen durch Palifermin zurückgeführt (POTTEN et al. 2002). In der eigenen Arbeit ist die Größe der Zellen nach dreitägiger Palifermin-Applikation auf das 1,7-fache im Vergleich zum Ausgangswert erhöht. Als Ursachen für die Volumenzunahme der Epithelzellen werden die Induktion von Differenzierungsprodukten in den Epithelzellen und die Ödematisierung von Zellen durch Palifermin diskutiert (POTTEN et al. 2002).

Wird die Palifermin-Applikation zusätzlich an drei Tagen nach der Einzeitbestrahlung fortgesetzt (Standardanwendung), wird eine weitere Dickenzunahme des Epithels bis zum Tag 3 gemessen.

Wird die Palifermingabe nach der Einzeitbestrahlung nicht fortgesetzt, entspricht der Verlauf der Dicke des Gesamtepithels, der Germinativschicht und der funktionellen Schicht dem nach alleiniger Einzeitbestrahlung. Eine deutlich verbreiterte Keratinschicht über den nahezu gesamten Versuch wird registriert.

Wird Palifermin nur nach der Einzeitbestrahlung appliziert, nimmt die Dicke des Epithels bis zum Tag 4 nach der Strahlenanwendung deutlich zu. Histologische Untersuchungen von KLAMMT (2005) zeigen ähnliche Ergebnisse. Grundlage dafür ist eine deutliche Volumenzunahme der Zellen bis auf das sechsfache des Ausgangswertes.

5.6 Wirkmechanismen von Palifermin

Der exakte Wirkmechanismus von Palifermin in Bezug auf die Schleimhautprotektion bei Bestrahlung ist bisher nicht bekannt (BLIJLEVENS und SONIS 2007).

Histologische Untersuchungen von POTTEN et al. (2002) am Epithel der Zungenunterseite von BDF-1-Mäusen zeigen nach Palifermin-Applikation eine Zunahme

der Zellzahl auf etwa das Doppelte im Vergleich zum Ausgangswert, basierend auf einem deutlichen Anstieg der Proliferationsrate. Wird Palifermin vor einer Einzeitbestrahlung (20 Gy) appliziert, ist die Abnahme der Zellzahl im Epithel der Zungenunterseite nach der Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung geringer (POTTEN et al. 2002a, KLAMMT 2005). Weiterhin wird nach Palifermin-Applikation eine deutliche Zunahme der Epitheldicke erfasst (FARRELL et al. 1999, POTTEN et al. 2002). Als Ursache dafür wird eine Erhöhung der Zelldichte, eine Dickenzunahme der funktionellen und Keratinschicht sowie eine Vergrößerung des Zellvolumens diskutiert (POTTEN et al. 2002, KLAMMT 2005).

Palifermin bewirkt eine deutliche Zunahme des Zellvolumens der Epithelzellen (POTTEN et al. 2002, KLAMMT 2005), möglicherweise basierend auf der Induktion von Differenzierungsprodukten oder ödematöser Effekte durch die Palifermin-Applikation (POTTEN et al. 2002).

Wahrscheinlich stimuliert Palifermin auch die Produktion von Stammzellen im Epithel, was die Strahlentoleranz der Mundschleimhaut erhöhen kann (LOMBAERT et al. 2008).

Weiterhin kann Palifermin Parameter der zellulären Strahlentoleranz beeinflussen, wodurch die Überlebensrate der Stammzellen gesteigert würde, möglicherweise durch die Aktivierung von DNA-Polymerase, Proteinkinase C und/ oder Tyrosinkinase (WU et al. 1998, TAKEOKA et al. 1997, BUCKLEY et al. 1998). Außerdem aktiviert Palifermin Gene zur Transkription von Enzymen (z.B. Glutathion-Peroxidase, Glutathion-S-Transferase) für die Eliminierung von reaktiven Sauerstoffradikalen (FRANK et al. 1997, ESTIVARIZ et al. 1998).

Palifermin reduziert Entzündungsprozesse in der Mundschleimhaut (RICHTER et al. 2007, 2007a, JAAL et al. 2009). Nach alleiniger Bestrahlung wird in Endothelien der Blutgefäße eine erhöhte Konzentration des Proteins ICAM-1, welches mit Entzündungsprozessen assoziiert ist, gemessen und eine signifikante Vasodilatation registriert. Wird Palifermin unmittelbar vor der Bestrahlung (Tag -1) appliziert, können diese Veränderungen nicht mehr nachgewiesen werden. Auch andere Untersuchungen zeigen, dass Palifermin die strahleninduzierte Entzündungsreaktion vermindert (KRIJANOVSKI et al. 1999, PANOSKALTSIS-MORTARI et al. 2000, 2000a, ELLISON et al. 2004).

Im Rahmen der Wundheilung fördert Palifermin die Reepithelialisierung durch Stimulation von Migrationsprozessen (TSUBOI et al. 1993, PUTNINS et al. 1999, NIU et al. 2007). Möglicherweise bewirkt Palifermin in Verbindung mit Bestrahlung die gesteigerte Migration von teilungsfähigen Zellen aus der Umgebung der bestrahlten Region in das Testfeld.

5.7 Einfluss von Palifermin auf das Tumorwachstum

Der Ausschluss eines Einflusses von Palifermin auf die Strahlenempfindlichkeit und das Wachstum von Tumorzellen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung in der Prophylaxe und Therapie der oralen Mukositis. Zellen hämatologischer Tumoren besitzen

in der Regel keinen Rezeptor für den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (MORONI et al. 2002), so dass Palifermin bei der Therapie dieser Tumoren eingesetzt werden kann.

In vitro Untersuchungen zeigen eine variable Expression des KGF-Rezeptors (KGFR) an epithelialen Tumorzellen. NING et al. (1998) führen Untersuchungen mit zehn humanen epithelialen Tumorzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich durch. Als Kontrolle dient die normale Keratinozytenzelllinie Balb/MK. In sieben der zehn Zelllinien kann KGFR nachgewiesen werden. Werden die Tumorzelllinien nur zwei Tage mit Palifermin behandelt, so tritt keine signifikante Proliferationsstimulation ein. Wird Palifermin länger appliziert, beeinflusst der Wirkstoff die proliferative Aktivität in vier der sieben KGFR-positiven und in zwei der KGFR-negativen Tumorzelllinien. Allerdings ist die proliferative Antwort im Vergleich zur Kontrollzelllinie 24 bis 70 Mal geringer ausgeprägt. Als mögliche Ursache werden funktionelle Unterschiede der KGFR und unterschiedliche Signalwege in den Kontrollzelllinien und Tumorzelllinien diskutiert.

HILLE et al. (2003) verwenden acht Tumorzellkulturen von Karzinomen aus dem oropharyngealen Bereich. Humane nasale Epithelzellen dienen als Kontrolle. In sechs von acht Tumorzelllinien wird mRNA des KGFR registriert, aber im Vergleich mit der Kontrolle nur in geringen Mengen. Nur in einer der acht Tumorzellkulturen stimuliert Palifermin signifikant die Zellproliferation. Im Kontrollmedium führt Palifermin zum zwei- bis dreifachen Anstieg der Zellteilungsrate.

Das klonogene Überleben der Tumorzellen nach der Bestrahlung wird durch Palifermin nicht beeinflusst (NING et al. 1998, HILLE et al. 2003).

OELMANN et al. (2004) registrieren nach Palifermin-Applikation eine signifikante Stimulation des klonalen Wachstums in fünf von 35 epithelialen Tumorzelllinien und in keiner von 22 Lymphom- und Leukämiezelllinien. Die Empfindlichkeit der Tumorzellen für das Zytostatikum 5-Fluorouracil wird durch Palifermin nicht verändert.

In Zelllinien von Brust- und Magentumoren kann nach Palifermin-Applikation eine verstärkte Migration und Proliferation der Tumorzellen nachgewiesen werden (NGUYEN et al. 2002, ZANG und PENTO 2000, NAKAZAWA et al. 2003). Auch in zwei von drei KGFR-positiven Ösophagus-Tumorzelllinien wird nach Palifermin-Applikation eine erhöhte Wachstumsrate registriert (YOSHINO et al. 2007). Palifermin sollte daher bei Patienten mit Brust-, Ösophagus- und Magentumoren nicht angewendet werden.

In in vivo Untersuchungen hat eine Palifermin-Applikation (1 mg/kg) an drei aufeinander folgenden Tagen keinen Effekt auf das Wachstum von humanen Plattenepithelkarzinomen und humanen Melanomen in Mäusen und beeinflusst die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen nicht (NING et al. 1998). Auch bei humanen Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx und humanen kolorektalen Karzinomen in CD1-Mäusen wird kein Einfluss einer Palifermin-Applikation auf das Tumorwachstum gemessen (BRAKE et al. 2008). Die Wirksamkeit diverser Chemotherapeutika (5-Fluorouracil, Cisplatin) bzw. monoklonaler Antikörper (Cetuximab, Bevacizumab, Panitumumab) wird durch den Wachstumsfaktor nicht beeinträchtigt (BRAKE et al. 2008).

OKUNJEFF et al. (2001) applizieren Palifermin an sechs aufeinander folgenden Tagen in intramuskulär wachsende KHT-Sarkome von Mäusen. Eine Beeinträchtigung des Tumorstwachstums mit erhöhten Apoptoseindizes und verminderter Tumorstvaskularisation wird in diesen Untersuchungen registriert.

Mit den bisher vorliegenden Daten kann keine gesicherte Aussage zur Tumorstwirksamkeit von Palifermin gemacht werden. Die Untersuchungen deuten aber übereinstimmend darauf hin, dass Palifermin die Strahlenempfindlichkeit von Tumorstzellen nicht beeinflusst.

5.8 Ausblick

Die orale Mukositis ist eine häufige und schwerwiegende frühe Nebenwirkung nach der Radio(chemo)therapie von Kopf-Hals-Tumoren sowie nach Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der Therapie hämatologischer Tumoren. Eine allgemein anwendbare Strategie für die Prophylaxe und Therapie der oralen Mukositis existiert bisher nicht. Der

Keratinozyten-Wachstumsfaktor stellt einen aktuellen und vielversprechenden Behandlungsansatz dar. Er ist für die Prophylaxe der oralen Mukositis nach myeloablativer Therapie im Rahmen der Behandlung hämatologischer Erkrankungen unter der Wirkstoffbezeichnung Palifermin und dem Markennamen Kepivance® zugelassen. Die Anwendung erfolgt dabei an drei Tagen vor und an drei Tagen nach der Konditionierung.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass im Tiermodell eine Reduktion der Palifermin-Applikation vor und/oder nach einer Einzeitbestrahlung möglich ist und mit gesteigerter Wirksamkeit einhergeht. In weiteren klinischen Studien muss geprüft werden, ob diese Ergebnisse auf die Situation beim Patienten übertragbar sind.

Die vorliegenden histologischen Auswertungen geben wenig Hinweise auf den Mechanismus der Paliferminwirkung. Zusätzliche Untersuchungen sind erstrebenswert: die elektronenmikroskopische Beurteilung der Zellen und Zellorganellen sowie die detaillierte Analyse der proliferativen Aktivität.

Zur Tumorstwirksamkeit von Palifermin liegen derzeit nur unzureichende Daten vor. Weiterführende tierexperimentelle und klinische Studien sind erforderlich.

Die Strahlentherapie ist in der Tumorstbehandlung von Hunden und Katzen eine wichtige Behandlungsmodalität. Die orale Mukositis ist auch in der Veterinärmedizin eine häufige frühe Nebenwirkung nach Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren. Die Pathogenese und der Verlauf der oralen Mukositis entsprechen denen beim Menschen. Die Applikation von Palifermin könnte daher auch bei Hunden und Katzen den Schweregrad und die Dauer von Mundschleimhautreaktionen nach Strahlentherapie vermindern. Präklinische und klinische Untersuchungen sind zur Ermittlung des optimalen Palifermin-Applikationsprotokolls und der Tumorstwirksamkeit notwendig. Bisher limitieren aber die hohen Kosten für Palifermin den Einsatz in der Veterinärmedizin.

6 Zusammenfassung

Ellen Siegemund

Optimierung des Applikationsprotokolls des rekombinanten humanen Keratinozyten-Wachstumsfaktor Palifermin zur Reduktion der radiogenen oralen Mukositis nach einzeitiger Strahlenexposition: Untersuchungen an der Mundschleimhaut der Maus
Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus, Universität Dresden

Eingereicht im Juli 2010

98 Seiten, 29 Abbildungen, 22 Tabellen, 278 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselwörter: Einzeitbestrahlung, orale Mukositis, Palifermin

Die orale Mukositis ist eine der häufigsten und schwerwiegendsten frühen Nebenwirkungen nach einer Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der Therapie hämatologischer Tumoren sowie nach einer Strahlenexposition im Kopf-Hals-Bereich. Es existieren zahlreiche experimentelle und klinische Ansätze zur Prophylaxe und Therapie dieser Strahlenfolge, aus denen jedoch bisher kein allgemein anwendbares Behandlungsschema ableitbar ist. Für Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) werden in präklinischen und klinischen Untersuchungen mukoprotektive Effekte nachgewiesen. Er ist als rekombinante humane Form ($\Delta 23$ -rHuKGF) mit der Wirkstoffbezeichnung Palifermin unter dem Markennamen Kepivance[®] für die Anwendung beim Menschen zur Prophylaxe der oralen Mukositis im Rahmen der Konditionierungsbehandlung bei Knochenmarktransplantationen zugelassen. Die Applikation von Palifermin erfolgt dabei intravenös in einer Dosierung von 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Konditionierungstherapie.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu prüfen, ob eine Reduktion der Anzahl der Palifermin-Applikationen vor und/oder nach der Konditionierungstherapie möglich ist. Zusätzlich sollen histologische Untersuchungen Hinweise zum Mechanismus der Paliferminwirkung geben.

Die Untersuchungen erfolgen am etablierten Modell des Epithels der Zungenunterseite von C3H/Neu-Mäusen. Eine Einzeitbestrahlung der Zunge simuliert die Konditionierungsbehandlung. Gestaffelte Strahlendosen werden zur Auslösung einer Ulzeration verwendet, um komplette Dosis-Effekt-Kurven zu generieren. Primärer Endpunkt ist die Induktion einer ulzerativen Mukositis in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Latenzzeit und Ulkusdauer beschreiben den zeitlichen Verlauf der Veränderungen.

Die beim Menschen zugelassene Anwendung von Palifermin wird auf das Mausmodell übertragen (Standardanwendung), wobei Palifermin in einer Dosierung von 5 mg/kg an drei aufeinander folgenden Tagen vor und nach der Einzeitbestrahlung (Tag -3,-2,-1,+1,+2,+3) subkutan appliziert wird. Die Palifermin-Applikation wird vor der Bestrahlung auf zwei Gaben (Tag -3,-2,+1,+2,+3, Tag -2,-1,+1,+2,+3) bzw. eine Gabe (Tag -3,+1,+2,+3, Tag -2,+1,+2,+3, Tag -1,+1,+2,+3) oder nach der Bestrahlung auf zwei (Tag –

3,-2,-1,+1,+2, Tag -3,-2,-1,+2,+3) bzw. eine Applikation (Tag -3,-2,-1,+1, Tag -3,-2,-1,+2, Tag -3,-2,-1,+3) reduziert. Die Palifermin-Dosierung beträgt bei mehr als einer Applikation 5 mg/kg s.c. täglich, bei einer einmaligen Anwendung 15 mg/kg s.c.. Histologische Untersuchungen der Mukosa erfolgen bei Standardanwendung von Palifermin sowie bei Applikation nur an drei Tagen vor oder nach der Einzeitbestrahlung.

Nach alleiniger Einzeitbestrahlung treten ulzerative Läsionen mit einer ED_{50} von $11,0 \pm 1,3$ Gy (Dosis, bei der bei 50 % der Tiere eine ulzerative Läsion im Zungenepithel erwartet wird) nach durchschnittlich $10,0 \pm 0,7$ Tagen (Latenzzeit) für $3,4 \pm 1,0$ Tage (Ulkusdauer) auf. Erhalten die Mäuse Palifermin im Standardprotokoll, so ist die Strahlentoleranz des Zungenepithels im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung erhöht ($ED_{50}=21,9 \pm 2,2$ Gy, DMF=2,0). Eine signifikant stärkere Wirkung wird erzielt, wenn Palifermin nach der Einzeitbestrahlung nur ein- oder zweimal appliziert ($ED_{50}=31,5 \pm 5,1$ Gy und $28,9 \pm 3,8$ Gy) oder wenn vor und nach der Einzeitbestrahlung der Wirkstoff nur einmal verabreicht wird ($ED_{50}=31,1 \pm 3,8$ Gy). Die ulzerativen Reaktionen treten dabei später auf und sind von kürzerer Dauer, insbesondere wenn die Palifermin-Gabe unmittelbar nach der Einzeitbestrahlung erfolgt. Die Reduktion der Palifermin-Anwendung vor der Einzeitbestrahlung auf eine oder zwei Applikationen ist in ihrer Wirkung mit der Standardanwendung vergleichbar.

Nach einer alleinigen Einzeitbestrahlung mit 13 Gy verringern sich Zellzahl (Minimalwert Tag 6 - 8, 73-74 %) und Dicke (Minimalwert Tag 4, 72 %) des Epithels, das Zellvolumen nimmt zu (Maximalwert Tag 8, 239 %). Palifermin erhöht nach dreitägiger Applikation vor der Bestrahlung die Zellzahl (184 %), die Epitheldicke (215 %) und vergrößert das Zellvolumen (152 %). Wird Palifermin zusätzlich an drei Tagen nach der Bestrahlung appliziert (Standardanwendung), erfolgt die Abnahme der epithelialen Zelldichte verzögert (Minimalwert Tag 7, 36 %). Die Epitheldicke nimmt bis Tag 3 weiter zu (286 %).

Die vorliegenden Untersuchungen am Modell der Zungenseite der Maus zeigen, dass die mukoprotektive Wirkung von Palifermin im Vergleich zu klinisch üblichen Standardanwendung erhöht werden kann, wenn der Wirkstoff vor und nach der Bestrahlung nur einmal gegeben wird oder die Applikationen nach der Bestrahlung reduziert werden.

7 Summary

Ellen Siegemund

Optimization of the application protocol of the recombinant human keratinozyte growth factor Palifermin for the reduction of radiation-induced oral mucositis after a single radiation exposure: studies in mouse oral mucosa

Department of Small Animal Medicine of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Leipzig and Department for Radiotherapy and Radiation Oncology of the Faculty of Medicine Carl Gustav Carus at the University of Technology of Dresden

Submitted July 2010

98 pages, 29 figures, 22 tables, 278 references, appendices

Key words: single-dose radiation exposure, oral mucositis, palifermin

Oral mucositis is the most common and most significant early side effect after total body irradiation within the treatment of hematological tumors as well as after radiation exposure of the head and neck region. A variety of experimental and clinic approaches for prevention or treatment of this radiation effect have been tested, but none of these strategies has entered the clinical routine in radiotherapy. In preclinical and clinical investigations keratinocyte growth factor (KGF) was found to be mucoprotective. This factor in its recombinant human form ($\Delta 23$ -rHuKGF), depicted as palifermin, is approved for human use to prevent oral mucositis after conditioning treatment for bone marrow transplant (Kepivance[®]). Palifermin is administered intravenously at a dosage of 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ on three subsequent days before and after the conditioning treatment.

The present study was initiated to investigate, if a reduction of the number of palifermin administrations before and/or after the conditioning treatment is possible. In addition, histological investigations were performed to indicate the mechanism of action of palifermin.

All investigations are carried out with the established model of the lower surface of the tongue in C3H/Neu-mice. Single-dose irradiation of the oral mucosa simulates the conditioning treatment. Graded radiation doses were administered to generate complete dose-effect curves. The primary endpoint is the induction of mucosal ulceration. The latent period and the ulcer duration are analysed as parameters of the time course of the response.

The palifermin administration approved for humans is transferred to the mouse model (standard administration). Palifermin is subcutaneously applied at a dose of 5 mg/kg on three subsequent days before and after a single-dose irradiation (day -3,-2,-1,+1,+2,+3). The palifermin treatment protocol is reduced either to two applications (day -3,-2,+1,+2,+3, day -2,-1,+1,+2,+3) or one application (day -3,+1,+2,+3, day -2,+1,+2,+3, day -1,+1,+2,+3) before irradiation or two (day -3,-2,-1,+1,+2, day -3,-2,-1,+2,+3) or one application (day -3,-2,-1,+1, day -3,-2,-1,+2, day -3,-2,-1,+3) after irradiation. When palifermin is daily administered repeatedly, the dose is 5 mg/kg s.c., if administered only once, the dose is 15 mg/kg s.c..

SUMMARY

Histological investigations comprise the standard palifermin administration protocol as well as application on three days before or after irradiation.

Single-dose irradiation induces ulcerative lesions with an ED_{50} of 11.0 ± 1.3 Gy (dose required to induced ulcerative lesions in 50 % of the animals) after a latent period of 10.0 ± 0.7 days, lasting 3.4 ± 1.0 days (ulcer duration). Palifermin in the standard administration protocol increases the ED_{50} to 21.9 ± 2.2 Gy (DMF = 2.0). The effect is significantly more pronounced, if palifermin is applied only once or twice after irradiation ($ED_{50}=31.5 \pm 5.1$ Gy and 28.9 ± 3.8 Gy), or if it is administered only once before and after irradiation ($ED_{50}=31.1 \pm 3.8$ Gy). Ulcerative reactions occur later and last shorter particularly if the drug is administrated directly after irradiation. A decrease to one or two palifermin administrations before irradiation has an effect comparable to the standard protocol.

After single dose irradiation with 13 Gy, a reduced cell number (minimum value day 6 - 8, 73-74 %) and epithelial thickness (minimum day 4, 72 %) are found, the individual volume of the cells is increased (maximum day 8, 239 %). Palifermin administration for three days before irradiation increases cell density (184 %), epithelial thickness (215 %) and cell volume (152 %). If palifermin is additionally administrated on three days after irradiation (standard administration), the reduction in epithelial cell density is delayed (minimum value day 7, 36 %). Epithelial thickness further increases until day 3 (286 %).

The present investigations carried out on the model on the mucosa of the lower surface of the mouse tongue demonstrate that the mucoprotective effect of palifermin can be increased in comparison with the standard administration protocol by administration only once before and after irradiation as well as a reduction of the administrations after irradiation.

8 Literaturverzeichnis

Adamietz IA, Rahn R, Böttcher HD, Schäfer V, Reimer K, Fleischer W. Prevention of radio-chemotherapy-induced mucositis. Value of the prophylactic mouth rinsing with PVP-iodine solution. *Strahlenther Onkol.* 1998;174:149-55.

Adams WM, Withrow SJ, Walshaw R, Turrell JM, Evans SM, Walker MA, Kurzman ID. Radiotherapy of malignant nasal tumors in 67 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1987;191:311-5.

Adams WM, Bjorling DE, McAnulty JE, Green EM, Forrest LJ, Vail DM. Outcome of accelerated radiotherapy alone or accelerated radiotherapy followed by exenteration of the nasal cavity in dogs with intranasal neoplasia: 53 cases (1990-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2005;227:936-41.

Al-Nawas R, Grötz KA. Prospective study of the long term change of the oral flora after radiation therapy. *Support Care Cancer.* 2006;14:291-6.

Ara G, Watkins BA, Zhong H, Hawthorne TR, Karkaria CE, Sonis ST, Larochelle WJ. Velafermin (rhFGF-20) reduces the severity and duration of hamster cheek pouch mucositis induced by fractionated radiation. *Int J Radiat Biol.* 2008;84:401-12.

Argyle DJ, Saba C. Gastrointestinal tumors. In: Argyle DJ, Brearley J, Turek MM, Hrsg. *Decision making in small animal oncology.* Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 217-37.

Axlund TW, McGlasson ML, Smith AN. Surgery alone or in combination with radiation therapy for treatment of intracranial meningiomas in dogs: 31 cases (1989-2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2002;221:1597-1600.

Barasch A, Epstein J, Tilashalski K. Palifermin for management of treatment-induced oral mucositis in cancer patients. *Biologics: Targets & Therapy.* 2009;3:111-6.

Bateman KE, Catton PA, Pennock PW, Kruth SA. 0-7-21 Radiation therapy for the treatment of canine oral melanoma. *J Vet Int Med.* 2008;8:267-72.

Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, Darcourt V, Schubert MM. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer.* 1999;7:244-52.

Berger ME, Christensen DM, Lowry PC, Jones OW, Wiley AL. Medical management of radiation injuries: current approaches. *Occup Med (Lond).* 2006;56:162-72.

Bjarnason GA, Jordan RC, Sothorn RB. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. *Am J Pathol.* 1999;154:613-22.

Blackwood L, Dobson JM. Radiotherapy of oral malignant melanoms in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209:98-102.

Blijlevens N, Sonis S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. *Annals of Oncology.* 2007;18:817-26.

Borges L, Rex KL, Chen JN, Wei P, Kaufman S, Scully S, Pretorius J, Farrell CL. A protective role for keratinocyte growth factor in a murine model of chemotherapy and radiotherapy-induced mucositis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66:254-62.

Brake R, Starnes C, Lu J, Chen D, Yang S, Radinsky R, Borges L. Effects of palifermin on antitumor activity of chemotherapeutic and biological agents in human head and neck and colorectal carcinoma xenograft models. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1337-46.

Brearley MJ. Tumoren des Nervensystems. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen.* Berlin: Parey Buchverlag; 2005. p. 444-56.

Brearily MJ, Argyle DJ. Tumors of the brain, spinal cord, peripheral nerves, and special senses. In: Argyle DJ, Brearily MJ, Turek MM, Hrsg. *Decision making in small animal oncology.* Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 355-68.

Brewer WG, Turrel JM. Radiotherapy and hyperthermia in the treatment of fibrosarkomas in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1982;181:146-50.

Brizel DM, Herman T, Goffinet D, Sailer S, Agarwala S, Schwartz G, Venkatesan V, Cripps C, Meredith RF, Logan E, Yao B. A phase I/II trial of escalating doses of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF) in head and neck cancer (HNC) patients receiving radiotherapy (RT) with concurrent chemotherapy (CCT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;51:40.

Brooks MB, Matus RE, Leifer CE, Alfieri AA, Patnaik AK. Chemotherapy versus chemotherapy plus radiotherapy in the treatment of tonsillar squamous cell carcinoma in the dog. *J Vet Intern Med.* 1988;2:206-11.

Buckley S, Barsky L, Driscoll B, Weinberg K, Anderson KD, Warburton D. Apoptosis and DNA damage in type 2 alveolar epithelial cells cultured from hyperoxic rats. *Am J Physiol.* 1998;274:L714-20.

Buentzel J, Micke O, Adamietz IA, Monnier A, Glatzel M, de Vries A. Intravenous amifostine during chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: A randomized placebo-controlled phase III study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;64:684-91.

Burholt DR. Oesophageal epithelial cell proliferation and food consumption patterns following irradiation. *Br J Cancer.* 1986;53:7-8.

Burk RL. Radiation therapy in the treatment of oral neoplasia. *Vet Clin North Am Sm Anim Pract.* 1996;26:155-63.

Carlisle CH, Gould S. Response of squamous cell carcinoma of the nose of the cat to treatment with X-rays. *Vet Radiol.* 1982;23:186-92.

Cassatt DR, Fazenbaker CA, Bachy CM, Kifle G, McCarthy MP. Amifostine (ETHYOL) protects rats from mucositis resulting from fractionated or hyper-fractionated radiation exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005;61:901-7.

Cassatt DR, Fazenbaker CA, Kifle G, Bachy CM. Subcutaneous administration of amifostine (ethyol) is equivalent to intravenous administration in a rat mucositis model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57:794-802.

Chaffin K, Thrall DE. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. *Vet Radiol Ultrasound.* 2002;43:392-5.

Clarke SJ, Abdi E, Davis ID, Schnell FM, Zalcborg JR, Gutheil J, Serdar C, Yao B, Heard R, Meropol N, Rosen LS. Recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF) prevents chemotherapy-induced mucositis in patients with advanced colorectal cancer: a randomised phase II trial. *Proc ASCO.* 2001;20:383a.

Clausen OPF, Potten CS. Heterogeneity of keratinocytes in the epidermal basal cell layer. *J Cutan Pathol.* 1990;17:129-43.

Coomer A, Farese J, Milner R, Liptak J, Bacon N, Lurie D. Radiation therapy for canine appendicular osteosarcoma. *Vet Comp Oncol.* 2009;7:15-27.

Cotter SM. Oral pharyngeal neoplasms in the cat. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1981;17:917-20.

Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C, Franquin JC. Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;38:697-703.

Coyle VJ, Garrett LD. Finding and treating oral melanoma, squamous cell carcinoma, and fibrosarcoma in dogs vom 01. Juni 2009 (zitiert vom 02.06.2010): <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/Finding-and-treating-oral-melanoma-squamous-cell-carcinoma-and-fibrosarcoma-in-dogs/ArticleStandard/Article/detail/601624>>.

Dewhirst MW, Sim DA, Forsyth K, Grochowski KJ, Wilson S, Bicknell E. Local control and distant metastases in primary malignant melanomas treated with hyperthermia and/or radiotherapy. *Int J Hyperthermia*. 1985;1:219-34.

Dische S. A system for quantifying radiation morbidity, fourth draft. Nicht veröffentlicht, als Manuskript verteilt, 1988.

Dorn CR, Priester WA. Epidemiologic analyses of oral and pharyngeal cancers in dogs, cats, horses and cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1976;169:1202-6.

Dörr W. Untersuchungen zur Strahlenreaktion des unbehandelten und stimulierten Zungenepithels der Maus [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Univ. München; 1987.

Dörr W. Strahlenbiologische Parameter der radiogenen Mucositis enoralis [Habilschr. rer. med]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 1997.

Dörr W. Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: Asymmetry loss, Acceleration of stem-cell divisions and Abortive divisions. *Int J Radiat Biol*. 1997a;72:635-43.

Dörr W. Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results. *Int J Radiat Biol*. 2003;79:531-7.

Dörr W. Oral mucosa: Response modification by keratinocyte growth factor. In: Nieder C, Milas L, Ang KK, Hrsg. *Modification of radiation response. Cytokines, Growth Factors and other biological targets*. Heidelberg: Springer Verlag; 2003a. p. 113-23.

Dörr W. Biological response modifiers: normal tissues. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. *Basic Clinical Radiobiology*. 4. Aufl. London: Hodder education; 2009. p. 301-14.

Dörr W. Time factors in normal tissue responses to irradiation. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. *Basic Clinical Radiobiology*. 4. Aufl. London: Hodder education; 2009a. p. 149-57.

Dörr W. Pathogenesis of normal-tissue side-effects. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. *Basic Clinical Radiobiology*. 4. Aufl. Hodder education; 2009b. p. 169-90.

Dörr W, Arui J, Beisker W, Schultz-Hector S. Cell kinetic studies in mouse tongue mucosa by autoradiographic, immunohistochemical and flow cytometric techniques. *Cell Prolif.* 1994;27:321-2.

Dörr W, Bässler S, Reichel S, Spekl K. Reduction of radiochemotherapy-induced early oral mucositis by recombinant human keratinocyte growth factor (palifermin): experimental studies in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005c;62:881-7.

Dörr W, Breitner A, Kummermehr J. Capacity and kinetics of SLD repair in mouse tongue epithelium. *Radiother Oncol.* 1993;27:36-45.

Dörr W, Emmendorfer H, Haide E, Kummermehr J. Proliferation equivalent of „accelerated repopulation“ in mouse oral mucosa. *Int J Radiat Biol.* 1994a;66:157-67.

Dörr W, Groetz KA, Hartmann JT, Riesenbeck D. Orale Mukositis - Experimentelle und klinische Ansätze zur Prävention und Behandlung. *Onkologe.* 2007;13:150-7.

Dörr W, Hamilton CS, Boyd T, Reed B, Denham JW. Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002c;52:911-7.

Dörr W, Heider K, Spekl K. Reduction of oral mucositis by palifermin (rHuKGF): Dose-effect of rHuKGF. *Int J Radiat Biol.* 2005a;81:557-65.

Dörr W, Hendry J. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol.* 2001;61:223-31.

Dörr W, Herrmann Th. Frühe Strahlenveränderungen der Gewebe. In: Bamberg M, Molls M, Sack H, Hrsg. *Radioonkologie Band 1: Grundlagen.* 2. Aufl. Gemering, München: Zuckschwerdt Verlag; 2009. p. 317-25.

Dörr W, Herrmann Th, Reitemeier B, Riesenbeck D, Grötz KA. Folgen der Strahlentherapie in der Mundhöhle. *Zahnmedizin-up2date.* 2008;6:543-69.

Dörr W, Herrmann Th, Riesenbeck D. Prävention und Therapie von Nebenwirkungen in der Radioonkologie. Bremen, London, Boston: Uni-Med Verlag AG; 2005.

Dörr W, Jacubek A, Kummermehr J, Herrmann Th, Dölling-Jochem I, Eckelt U. Effects of stimulated repopulation on oral mucositis during conventional radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1995;37:100-7.

Dörr W, Kummermehr J. Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal conditions and following single dose irradiation. *Virchows Arch B.* 1991;60:287-94.

Dörr W, Lacmann A. Effects of keratinocyte growth factor (KGF) on the radiation response of in vitro reconstituted oral mucosa. *Cell Prolif.* 2001;34:167.

Dörr W, Lacmann A, Noack R, Spekl K, Rex K, Farrell CL. Modulation der Strahlenwirkung an Plattenepithelien durch Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF). In: Heinemann G, Müller W-U, Hrsg. *Strahlenbiologie und Strahlenschutz, Band 1.* Köln: TÜV-Verlag; 2000. p. 209-22.

Dörr W, Noack R, Spekl K, Farrell CL. Modification of oral mucositis by keratinocyte growth factor: single radiation exposure. *Int J Radiat Biol.* 2001;77:341-7.

Dörr W, Reichel S, Spekl K. Effects of keratinocyte growth factor (palifermin) administration protocols on oral mucositis (mouse) induced by fractionated irradiation. *Radiother Oncol.* 2005b;75:99-105.

Dörr W, Riesenbeck D. Mundhöhle. In: Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg. *Nebenwirkungen in der Radioonkologie: Klinisches Kompendium.* München: Urban und Vogel; 2000. p. 130-42.

Dörr W, Spekl K, Farrell CL. The effect of keratinocyte growth factor on healing of manifest radiation ulcers in mouse tongue epithelium. *Cell Proliferation.* 2002a;35:86-92.

Dörr W, Spekl K, Farrell CL. Amelioration of acute oral mucositis by keratinocyte growth factor: fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;54:245-51.

Dörr W, Spekl K, Martin M. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. *Cell Prolif.* 2002b;35:60-7.

Dörr W, Trott K-R. Strahlenbiologie der Normalgewebe. In: Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg. *Nebenwirkungen in der Radioonkologie: Klinisches Kompendium.* München: Urban und Vogel; 2000. p. 9-23.

Dörr W, van der Kogel AJ. The volume effect in radiotherapy. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. *Basic Clinical Radiobiology.* 4. Aufl. London: Hodder education; 2009. p. 191-206.

Dorsch RMH. Radiotherapie bei Hund und Katze. Eine Literaturstudie [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilians-Univ. München; 2002.

Durrant S, Pico JL, Schmitz N, Blaise D, Harousseau JL, Szer J, Boogaerts M, Finke J, Goldstone AH, Borkett K, Heard RG. A phase 1 study of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF) in lymphoma patients receiving high-dose chemotherapy (HDC) with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation (AutoPBPCT). *Blood*. 1999;4:708a.

Eble MJ, Dörr W. Intraoperative Strahlentherapie. In: Bamberg M, Molls M, Sack H, Hrsg. *Radioonkologie Grundlagen*. München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt; 2009. p. 68-84.

Elliot KM, Mayer MN. Radiation therapy for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs. *CVJ*. 2009;50:309-12.

Ellison CA, Natuik SA, Fischer JM, McIntosh AR, Scully SA, Bow EJ, Danilenko DM, Hayglass KT, Gartner JG. Effect of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF) on the immunopathogenesis of intestinal graft-vs.-host disease induced without a preconditioning regimen. *J Clin Immunol*. 2004;24:197-211.

Elmslie RE, Ogilvie GK, Gillette EL, McChesney-Gillette S. Radiotherapy with and without chemotherapy for localized lymphoma in 10 cats. *Vet Radiol Ultrasound*. 1991;32:277-80.

Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68:1110-20.

Epstein JB, Klasser GD. Emerging approaches for prophylaxis and management of oropharyngeal mucositis in cancer therapy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2006;11:353-73.

Epstein JB, Stevenson-Moore P, Jackson S, Mohamed JH, Spinelli JJ. Prevention of oral mucositis in radiation therapy: a controlled study with Benzylamine hydrochloride rinse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;16:1571-5.

Estivariz CF, Jonal CR, Gu LH, Díaz EE, Wallace TM, Pascal RR, Farrell CL, Ziegler TR. Gut-trophic effects of keratinocyte growth factor in rat small intestine and colon during enteral refeeding. *J Parenter Enteral Nutr*. 1998;22:259-67.

European medicine agency (EMA) 2005. Kepivance vom 8. September 2009 (zitiert vom 21.01.2010): <http://www.ema.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/kepivance/kepivance.htm>.

Evans SM, Goldschmidt M, McKee LJ, Harvey CE. Prognostic factors and survival after radiotherapy for intranasal neoplasms in dogs: 70 cases (1974-1985). *J Am Vet Med Assoc*. 1989;194:1460-3.

Farrell CL, Bready JV, Rex KL, Chen JN, DiPalma CR, Whitcomb KL, Yin S, Hill DC, Wiemann B, Starnes CO, Havill AM, Lu ZN, Aukerman SL, Pierce GF, Thomason A, Potten CS, Ulich TR, Lacey DL. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. *Cancer Res.* 1998;58:933-9.

Farrell CL, Rex KL, Kaufman SA, Dipalama CR, Chen JN, Scully S, Lacey DL. Effects of keratinocyte growth factor in the squamous epithelium of the upper aerodigestive tract of normal and irradiated mice. *Int J Radiat Biol.* 1999;75:609-20.

Feyer P, Bruns F, Fraunholz J, Heide J, Riesenbeck D, Steingraber M, Zimmermann F, Dörr W, Grötz K, Höller U, Schneider O, Wenz F. Leitlinie in der Radioonkologie: Supportive Maßnahmen. 2006 (zitiert vom 21.01.2010): 1-84, <[http://www.degro.org/dav/html/download/pdf/LeitlinieSupportive Maßnahmen.pdf](http://www.degro.org/dav/html/download/pdf/LeitlinieSupportive%20Ma%C3%9Fnahmen.pdf)>.

Fidel JL, Sellon R, Houston RK, Wheeler BA. A nine-day accelerated radiation protocol for feline squamous cell carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound.* 2007;48:482-5.

Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science.* 1989;245:752-5.

Fliedner TM, Friesecke I, Beyrer K, Hrsg. Medical Management of Radiation Accidents: Manual on the Acute Radiation Syndrome. Oxford: British Institute of Radiology; 2001.

Food and Drug Administration U.S. (FDA) 2004. Kepivance Drug Details vom 15. Dezember 2004 (zitiert vom 29.01.2010): <<http://accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=SearchDrugDetails>>.

Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;23:457-67.

Frank S, Muna B, Werner S. The human homologue of a bovine non-selenium glutathione peroxidase is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene. *Oncogene.* 1997;14:915-21.

Friesecke I, Beyer K, Fliedner TM. How to cope with radiation accidents: the medical management. *Br J Radiol.* 2001;74:121-2.

Frimberger AE, Moore AS, LaRue SM, Gliatto JM, Bengtson AE. Radiotherapy of incompletely resected, moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989-1993). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1997;33:320-4.

Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, Garden AS, Ridge JA, Cooper JS, Ang KK. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48:7-16.

Gallagher JG, Berg J, Knowles KE, Williams LL, Bronson RT. Prognosis after surgical excision of cerebral meningiomas in cats: 17 cases (1986-1992). *J Am Vet Med Assoc.* 1993;203:1437-40.

Gehrisch A, Dörr W. Effect of systemic or topical administration of sodium selenite on early radiation effects in mouse oral mucosa. *Strahlenther Oncol.* 2007;183:35-42.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (GEKID) und das Robert Koch Institut (RKI). *Krebs in Deutschland 2005-2006, Häufigkeiten und Trends.* 7. Aufl. Berlin: Robert Koch Institut; 2010. p. 1-120.

Gibbs S, Silva Ponto AN, Murli S, Huber M, Hohl D, Ponc M. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth and differentiation. *Wound Repair Regen.* 2000;8:192-203.

Girinsky T, Benhamou E, Bourhis JH, Dhermain F, Guillot-Valls D, Ganansia V, Lubinski M, Perez A, Cosset JM, Socie G, Baume D, Bouacouina N, Briot E, Beaudre A, Bridier A, Pico JL. Prospective randomised comparison of single-dose versus hyperfractionated total-body irradiation in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol.* 2000;18:981-6.

Goepp R, Fitch FW. Pathological study of oral radiation death in mice. *Radiat Res.* 1962;16:641-5.

Gordon LE, Thacher C, Matthiesen DT, Joseph RJ. Results of craniotomy for the treatment of cerebral meningioma in 42 cats. *Vet Surg.* 1994;23:94-100.

Gränitz U. Tumoren der Augen. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen.* Berlin: Parey Buchverlag; 2005. p. 457-71.

Greenberger JS, Epperly MW, Gretton J, Jefferson M, Nie S, Bernarding M, Kagan V, Guo HL. Radioprotective gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2003;3:183-95.

Grier CK, Mayer MN. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. *CVJ.* 2007;48:1189-91.

Grötz K.A. Zahnärztliche Betreuung von Patienten mit tumortherapeutischer Kopf-Hals-Bestrahlung. Gemeinsame wissenschaftliche Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK, <http://www.dgzmk.de>) und der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, medizinische Physik und Strahlenbiologie (DEGRO) in Abstimmung mit dem Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Zahnerhaltungskunde (DGZ). *Strahlenther Onkol.* 2003;179:275-8.

Grötz KA, Dörr W. Die Mundhöhle des Patienten mit Kopf-Hals-Strahlentherapie III. Post-radiotherapeutische Betreuung. *Im Focus Onkologie.* 2003;7-8:58-61.

Grötz KA, Genitsariotis S, Vehling D, Al-Nawas B. Long-term oral Candida colonization, mucositis and salivary function after head and neck radiotherapy. *Support Care Cancer.* 2003;11:717-21.

Gustafson NR, Lana SE, Mayer MN, LaRue SM. A preliminary assessment of whole-body radiotherapy interposed within a chemotherapy protocol for canine lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2004;2:125-31.

Hahn KA, King GK, Carreras JK. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade-III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224:79-82.

Hardie EM, Barsanti JA, Rawlings CA. Complications of prostatic surgery. *J Am Vet Med Assoc.* 1984;20:50-6.

Hargis AM, Miller LM. Prostatic carcinoma in dogs. *Comp Contin Educ Pract Vet.* 1983;5:647-53.

Hartmann JT, Dörr W, Steingraber M, Grötz KA. Schleimhauttoxizität. 2007 (zitiert vom 05.04.2008): <http://www.onkosupport.de/aso/content/e974/e1109/e1705/071123_ASO_Leitlinie_Schleimhaut.pdf>.

Harvey HJ, MacEwen EG, Braun D, Patnaik AK, Withrow SJ, Jongeward S. Prognostic criteria for dogs with oral melanoma. *J Am Vet Med Assoc.* 1981;178:580-2.

Heidner GL, Kornegay JN, Page RL, Dodge RK, Thrall DE. Analysis of survival in a retrospective study of 86 dogs with brain tumors. *J Vet Int Med.* 1991;5:219-26.

Henke M, Alfonsi M, Foa P, Giralt J, Bardet E, Cerezo L, Salzwimmer M, Whiley M, Emmerson L, Berger D. Palifermin significantly reduces severe oral mucositis in subjects with resected locally advanced head and neck cancer undergoing post-operative concurrent radio-chemotherapy. *Radiother Oncol.* 2008;88:152.

Henry CJ, Brewer WG Jr, Tyler JW, Brawner WR, Henderson RA, Hankes GH, Royer N. Survival in dogs with nasal adenocarcinoma: 64 cases (1981-1995). *J Vet Intern Med.* 1998;12:436-9.

Henzel M, Gross MW, Hamm K, Surber G, Kleinert G, Failing T, Strassmann G, Engenhart-Cabillic R. Significant tumor volume reduction of meningiomas after stereotactic radiotherapy: results of a prospective multicenter study. *Neurosurgery.* 2006;59:1188-94.

Herrmann Th, Baumann M, Dörr W. Pathogenese von Strahlenreaktionen. In: Herrmann Th, Baumann M, Dörr W, Hrsg. *Klinische Strahlenbiologie kurz und bündig.* München: Elsevier GmbH; 2006. p. 81-7.

Herrmann T, Jacubek A, Trott KR. The importance of timing of a gap in radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Strahlenther Onkol.* 1994;170:545-9.

Hille A, Rave-Frank M, Pradier O, Damm C, Dörr W, Jäckel MC, Christiansen H, Hess CF, Schmidberger H. Effect of keratinocyte growth factor on the proliferation, clonogenic capacity and colony size of human epithelial tumour cells in vitro. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:119-28.

Hirschfeld D, Simon D, Schönrock D, Culmsee K, Mellin A, Nolte I. Strahlentherapie in der Kleintiermedizin. *Praktischer Tierarzt.* 2001;82:16-21.

Howaldt HP, Kainz M. 8. Projektbericht des Zentralregisters des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK) für den Zeitraum vom 1. April 1989 – 20. Juni 1997.

Hutson CA, Willauer CC, Walder EJ, Stone JL, Klein MK. Treatment of mandibular squamous cell carcinoma in cats by use of mandibulectomy and radiotherapy: seven cases (1987-1989). *J Am Vet Med Assoc.* 1992;201:777-81.

Jaal J, Richter C, Dörr W. Effect of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF, Palifermin) on inflammatory changes in mouse tongue during fractionated irradiation. *Molec Radiat Biol/Oncol.* 2009;8:71.

Jeffery N, Brearley MJ. Brain tumors in the dog: treatment of 10 cases and review of recent literature. *J Sm Anim Pract.* 1993;34:367-72.

Joiner MC, Wouters BG. The oxygen effect and fractionated radiotherapy. In: Joiner M, Van der Kogel A, Hrsg. *Basic Clinical Radiobiology.* 4. Aufl. London: Hodder Education; 2009. p. 207-32.

Kaser-Hotz B. Prinzipien der Strahlentherapie. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie-Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze. Stuttgart: Parey-Verlag; 2005. p. 151-62.

Kaser-Hotz B, Fodor G, Cordt-Riehle I, Blattmann H, Munkel G, Egger E, LaRue SM, Suter PF. Radiotherapie in der Kleintiermedizin: Grundlagen, Indikation und Bedeutung. Schweiz Arch Tierheilk. 1994;136:319-28.

Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, Migliorati CA, McGuire DB, Hutchins RD, Peterson DE. Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. Cancer. 2007;109:820-31.

Kessler M. Tumoren der Maulhöhle. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; 2005. p. 252-73.

Kessler M. Tumoren der Haut. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; 2005a. p. 196-236.

Kessler M. Primäre Knochentumoren der Katze. In: Kessler M, Hrsg. Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen. Berlin: Parey Buchverlag; 2005b. p. 410-4.

Kilic Y, Rajewski K, Dörr W. Effect of post-exposure administration of keratinocyte growth factor (Palifermin) on radiation effects in oral mucosa in mice. Radiat Environ Biophys. 2007;46:13-9.

Kim JH, Chu FCH, Lakshmi V, Houde R. Benzylamine HCl, a new agent for the treatment of radiation mucositis of the oropharynx. Am J Clin Oncol (CTT). 1986;9:132-4.

Klammt S. Einfluss einer Nachbehandlung mit Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rHuKGF, Palifermin) auf die Mucositis enoralis (Maus) nach Einzeitbestrahlung: Histologische und immunhistochemische Untersuchungen [Dissertation med. dent]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 2005.

Krijanovski OI, Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Brinson YS, Ferrara J. Keratinocyte growth factor separates graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host disease. Blood. 1999;94:825-31.

Lacmann A. In vitro rekonstituiertes Plattenepithel als strahlenbiologisches Modell der Mundschleimhaut [Dissertation rer. med]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 2001.

Lacmann A, Dörr W, Farrell CL. Einfluss von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rhuKGF) auf Keratinozyten in vitro. *Strahlenther Onkol.* 1999;175:57.

LaDue TA, Dodge R, Page RL, Price GS, Hauck ML, Thrall DE. Factors influencing survival after radiotherapy of nasal tumors in 130 dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 1999;40:312-7.

LaDue T, Price GS, Dodge R, Page RL, Thrall DE. Radiation therapy for incompletely resected canine mast cell tumors. *Vet Radiol Ultrasound.* 1998;39:57-62.

LaDue-Miller T, Price GS, Page RL, Thrall DE. Radiotherapy of canine non-tonsillar squamous cell carcinoma. *Vet Radiol Ultrasound.* 1996;37:74-7.

Laing EJ, Fitzpatrick PJ, Binnington AG, Norris AM, Mosseri A, Rider WD, Valli VE. Half-body radiotherapy in the treatment of canine lymphoma. *J Vet Int Med.* 2008;3:102-8.

Laing EJ, Fitzpatrick PJ, Norris AM, Mosseri A, Rider WD, Binnington AG, Baur A, Valli VE. Half-body radiotherapy - Evaluation of the technique in normal dogs. *J Vet Int Med.* 2008a;3:96-101.

Lana SE, Dernell WS, Lafferty MH, Withrow SJ, LaRue SM. Use of radiation and a slow release cisplatin formulation for treatment of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound.* 2004;45:577-81.

Lana SE, Ogilvie GK, Withrow SJ, Straw RC, Rogers KS. Feline cutaneous squamous cell carcinoma of the nasal planum and the pinnae: 61 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1997;33:329-32.

LeCouteur RA. Diagnosis and treatment of brain tumors, Proceedings vom 01. April 2009 (zitiert vom 02.06.2010): <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/Diagnosis-and-treatment-of-brain-tumors-Proceedings/ArticleStandard/Article/detail/609408>>.

Lester NV, Hopkins AL, Bova FJ, Friedman WA, Buatti JM, Meeks SL, Chrisman SL. Radiosurgery using a stereotactic headframe system for irradiation of brain tumors in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;219:1562-7.

Liptak JM, Withrow SJ. Oral tumors. In: Withrow SJ, Vail DM, Hrsg. Withrow and MacEwen`s small animal clinical oncology. 4. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Co; 2007. p. 455.

Lohr F, Wenz F. Strahlentherapie kompakt. 2. Aufl. München: Urban & Fischer; 2007.

Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Kampinga HH, de Haan G, Coppes RP. Keratinocyte growth factor prevents radiation damage to salivary glands by expansion of the stem/progenitor pool. *Stem Cells*. 2008;26:2595-601.

MacEwen EG, Withrow SJ, Patnaik AK. Nasal tumors in the dog: retrospective evaluation of diagnosis, prognosis, and treatment. *J Am Vet Med Assoc*. 1977;170:45-8.

Maciejewski B, Zajusz A, Pilecki B, Skladowski K, Dörr W, Kummermehr J, Trott K-R. Acute mucositis in the stimulated oral mucosa of patients during radiotherapy for head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 1991;22:7-11.

MacMillan R, Withrow SJ, Gillette EL. Surgery and regional irradiation for treatment of canine tonsillar squamous cell carcinoma: retrospective review of eight cases. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1982;18:311-4.

Marretta JJ, Garrett LD, Marretta SM. Feline oral squamous cell carcinoma: An overview vom 01. April 2007 (zitiert vom 02.06.2010): <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/Feline-oral-squamous-cell-carcinoma-An-overview/ArticleStandard/Article/detail/433715>>.

Mauldin GN, Mauldin GE, Meleo KA. Treatment of feline oral squamous cell carcinoma with radiation therapy alone or radiation therapy and hyperthermia. *Newslet Vet Cancer Soc*. 1992;16:4-5.

Mayer MN, LaRue SM. Radiation therapy in the treatment of canine lymphoma. *Can Vet J*. 2005;46:842-4.

McEntee MC, Page RL, Heidner GL, Cline JM, Thrall DE. A retrospective study of 27 dogs with intranasal neoplasms treated with cobalt radiation. *Vet Radiol*. 1991;23:135-9.

McEntee MC, Page RL, Novotney CA, Thrall DE. Palliative radiotherapy for canine appendicular osteosarcoma. *Vet Radiol Ultrasound*. 1993;21:183-8.

Meropol NJ, Samer RA, Gutheil J, Pelley RJ, Modiano MR, Rowinsky EK, Rothenberg ML, Redding SW, Serdar CM, Yao B, Heard R, Rosen LS. Randomized phase I trial of recombinant human keratinocyte growth factor plus chemotherapy: potential role as mucosal protectant. *J Clin Oncol*. 2003;21:1452-8.

Meyer J, Squier SA, Gerson SJ. The structure and function of oral mucosa. 1. Aufl. Oxford, New York: Pergamon press; 1984.

Migliorati CA, Oberle-Edwards L, Schubert M. The role of alternative and natural agents, cryotherapy, and/or laser for management of oral mucositis. *Supp Care Cancer*. 2006;14:533-40.

Miller MA, Nelson SL, Turk JR, Pace LW, Brown TP, Shaw DP, Fischer JR, Gosser HS. Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Vet Pathol*. 1991;28:389-95.

Molander-McCrary H, Henry CJ, Potter K, Tyler JW, Buss MS. Cutaneous mast cell tumors in cats: 32 cases (1991-1994). *J Am Anim Hosp Assoc*. 1998;34:281-4.

Moroni E, Dell'Era P, Rusnati M, Presta M. Fibroblast growth factors and their receptors in hematopoiesis and hematological tumors. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002;11:19-32.

Moses R, Kummermehr J. Radiation response of the mouse tongue epithelium. *Br J Cancer*. 1986;53:12-5.

Müller H-P. *Checkliste Parodontologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag; 2001.

Murphy S, Brearley MJ. Mast cell tumors. In: Argyle DJ, Brearley MJ, Turek MM, Hrsg. *Decision making in small animal oncology*. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 147-59.

Murphy CK, Fey EG, Watkins BA, Wong V, Rothstein D, Sonis ST. Efficacy of superoxide dismutase mimetic M40403 in attenuating radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4292-7.

Nagel M-L. Knochentumoren des Hundes. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen*. Berlin: Parey Buchverlag; 2005. p. 389-410.

Nakazawa K, Yashiro M, Hirakawa K. Keratinocyte growth factor produced by gastric fibroblasts specifically stimulates proliferation of cancer cells from scirrhous gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:8848-52.

Napenas JJ, Shetty KV, Streckfus CF. Oral mucositis: review of pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Gen Dent*. 2007;55:335-44.

Nasilowska-Adamska B, Rzepecki P, Manko J, Czyz A, Markiewicz M, Federowicz I, Tomaszewska A, Piatkowska-Jakubas B, Wrzesien-Kus A, Bieniaszewska M, Duda D, Szydlo R, Halaburda K, Szczepinski A, Lange A, Hellman A, Robak T, Skotnicki A, Jedrzejczak WW, Walewski J, Holowiecki J, Komarnicki M, Dmoszynska A, Warzocha K, Marianska B. The influence of palifermin (Kepivance) on oral mucositis and acute graft versus host disease in patients with hematological diseases undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:983-8.

National Cancer Institut (NCI) 2006. Common Toxicity Criteria for Adverse Events 3.0.(zitiert vom 03.02.2010):19-28, <http://ctep.cancer.gov/protocol/Development/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf>.

Nguyen TN, Zang XP, Pento JT. Keratinocyte growth factor stimulates the migration and proliferation of breast cancer cells in a culture wounding model. *Pharmacol Res.* 2002;46:179-83.

Nickstadt T. Kapazität und Kinetik der Erholung von subletalen Strahlenschäden in der Mundschleimhaut (Maus) bei Bestrahlung mit 200 kV Röntgenstrahlen [Dissertation med. dent]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 2000.

Niebauer GW, Dayrell-Hart BL, Speziale J. Evaluation of craniotomy in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198:89-95.

Niethammer AG, Hensley FW. Ganzkörperbestrahlung. In: Wannemacher M, Debus J, Wenz F, Hrsg. *Strahlentherapie.* Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2006. p. 145-53.

Ning S, Shui C, Khan WB, Benson W, Lacey DL, Knox SJ. Effects of keratinocyte growth factor on the proliferation and radiation survival of human squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;40:177-87.

Niu J, Chang Z, Peng B, Xia Q, Lu W, Huang P, Tsao MS, Chiao PJ. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem.* 2007;282:6001-11.

Northrup N. Mast cell tumors in dogs and cats, Proceedings vom 01. April 2008 (zitiert vom 02.06.2010): <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/Mast-cell-tumors-in-dogs-and-cats-Proceedings/ArticleStandard/Article/detail/563738>>.

Northrup N. Feline oral tumors, Proceedings vom 01. April 2008a (zitiert vom 02.06.2010): <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/Medicine/Feline-oral-tumors-Proceedings/ArticleStandard/Article/detail/563740>>.

Northrup NC, Etue SM, Ruslander DM, Rassnick KM, Hutto DL, Bengtson A, Rand W, Moore AS. Retrospective study of orthovoltage radiation therapy for nasal tumors in 42 dogs. *J Vet Intern Med.* 2001;15:183-9.

Oakley RE, Patterson JS. Tumors of the central and peripheral nervous system. In: Slatter D, Hrsg. *Textbook of small animal surgery.* Philadelphia: Elsevier Science; 2003. p. 2405-425.

Oelmann E, Haghgu S, Kulimova E, Mesters RM, Kienast J, Herbst H, Schmitmann C, Kolkmeier A, Serve H, Berdel WE. Influence of keratinocyte growth factor on clonal growth of epithelial tumor cells, lymphoma and leukemia cells and on sensitivity of tumor cells toward 5-fluorouracil in vitro. *Int J Oncol.* 2004;25:1001-12.

Okunjeff P, Li M, Liu W, Sun J, Fenton B, Zhang L, Ding I. Keratinocyte growth factors radioprotect bowel and bone marrow but not KHT sarcoma. *Am J Clin Oncol.* 2001;24:491-5.

Overgaard J, Hansen HS, Specht L, Overgaard M, Grau C, Andersen E, Bentzen J, Bastholt L, Hansen O, Johansen J, Andersen L, Evensen JF. Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6 and 7 randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;365:933-40.

Pabst S, Spekl K, Dörr W. Changes in the effect of dose fraction during daily fractionated irradiation: studies in mouse oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58:485-92.

Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, Mason RJ. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparinbinding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest.* 1993;92:969-77.

Panoskaltis-Mortari A, Ingbar DH, Jung P, Haddad IY, Bittermann PB, Wangenstein OD, Farrell CL, Lacey DL, Blazar BR. KGF pretreatment decreases B7 and granzyme B expression and hastens repair in lungs of mice after allogeneic BMT. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;278:L988-99.

Panoskaltis-Mortari A, Taylor PA, Rubin JS, Uren A, Welniak LA, Murphy WJ, Farrell CL, Lacey DL, Blazar BR. Keratinocyte growth factor facilitates alloengraftment and ameliorates graft-versus-host disease in mice by a mechanism independent of repair of conditioning-induced tissue injury. *Blood.* 2000a;96:4350-6.

Parkins CS, Fowler JF, Yu S. A murine model of lip epidermal/mucosal reactions to X-irradiation. *Radiother Oncol.* 1983;1:159-65.

Postorino Reeves NC, Turrel JM, Withrow SJ. Oral squamous cell carcinoma in the cat. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1993;29:438-41.

Potten CS, Booth D, Cragg NJ, O`Shea JA, Tudor GL, Booth C. Cell kinetic studies in the murine ventral tongue epithelium: the effects of repeated exposure to keratinocyte growth factor. *Cell Prolif.* 2002;35:22-31.

Potten CS, Booth D, Cragg NJ, Tudor GL, O`Shea JA, Booth C, Meineke FA, Barthel D, Loeffler M. Cell kinetic studies in the murine ventral tongue epithelium: mucositis induced by radiation and its protection by pretreatment with keratinocyte growth factor (KGF). *Cell Prolif.* 2002a;35:32-47.

Potten CS, Booth D, Cragg NJ, Tudor GL, O`Shea JA, Appleton D, Barthel D, Gericke TG, Meineke FA, Loeffler M, Booth C. Cell kinetic studies in murine ventral tongue epithelium: thymidine metabolism studies and circadian rhythm determination. *Cell Prolif.* 2002b;35:1-15.

Potten CS, Booth D, Cragg NJ, O`Shea JA, Tudor GL, Booth C. Cell kinetic studies in murine ventral tongue epithelium: cell cycle progression studies using double labelling techniques. *Cell Prolif.* 2002c;35:16-21.

Prada A, Chiesa F. Effects of benzydamine on the oral mucositis during antineoplastic radiotherapy and/or intraarterial chemotherapy. *Int J Tiss React.* 1987;9:115-9.

Putnins EE, Firth JD, Lohachitranont A, Uitto VJ, Larjava H. Keratinocyte growth factor (KGF) promotes keratinocyte cell attachment and migration on collagen and fibronectin. *Cell Adhes Commun.* 1999;7:211-21.

Quast U. Whole body radiotherapy: A TBI-guideline. *J Med Phys.* 2006;31:5-12.

Quast U, Sack H. Ganzkörper-Strahlenbehandlung. DGMP-Bericht Nr. 18; 2003. p. 1-27.

Rajewski K. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Modifikation der radiogenen Mucositis enoralis nach einzeitiger Strahlenexposition durch Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF): Protokolloptimierung [Dissertation med. dent]. Dresden: Technische Univ. Dresden; 2009.

Reitemeier B, Reitemeier G, Schmidt A, Schaal W, Blochberger P, Lehmann D, Herrmann Th. Evaluation of a device for attenuation of electron release from dental restorations in a therapeutic radiation field. *J Proshet Dent.* 2002;87:323-7.

Reitemeier B, Herrmann Th, Blochberger P. Zahnärztliche Behandlungsmittel für Patienten mit Bestrahlung im Kopf-/Halsbereich. In: Kielbassa AM, Hrsg. Strahlentherapie im Kopf- und Halsbereich. Implikationen für Zahnärzte, HNO-Ärzte und Radiotherapeuten. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft; 2004.

Rezvani M, Ross GA. Modification of radiation-induced acute oral mucositis in the rat. *Int J Radiat Biol.* 2004;80:177-82.

Richter E, Feyerabend T. Grundlagen der Strahlentherapie. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2002.

Richter C, Jaal J, Kuschel M, Dörr W. Modulation of inflammatory changes in oral mucosa (mouse) during fractionated irradiation by recombinant human keratinocyte growth factor. *Molec Radiat Biol Oncol.* 2007;7:79.

Richter C, Jaal J, Kuschel M, Dörr W. Recombinant human keratinocyte growth factor modulates inflammatory changes in mouse oral mucosa during fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007a;69:603.

Riesenbeck D, Dörr W. Documentation of radiation-induced oral mucositis. Scoring systems. *Strahlenther Onkol.* 1998;174:44-6.

Riesenbeck D, Dörr W, Feyerabend T, Fietkau R, Henne K, Richter E, Schendera A. Photographic documentation of acute radiation-induced side effects of the oral mucosa. *Strahlenther Oncol.* 1998;174:40-3.

Rohrer Bley C. Krebserkrankungen bei Hund und Katze, Teil 1. *Schweizer Hunde Magazin.* 2007;4:33-7.

Rohrer Bley C. Krebserkrankungen bei Hund und Katze, Teil 2. *Schweizer Hunde Magazin.* 2007a;5:26-9.

Rosen LS, Abdi E, Davis ID, Gutheil J, Schnell FM, Zalcborg J, Cesano A, Gayko U, Chen MG, Clarke S. Palifermin reduces the incidence of oral mucositis in patients with metastatic colorectal cancer treated with fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2006;24:5183-5.

Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, Cunha GR, Finch PW. Keratinocyte growth factor as a cytokine that mediates mesenchymal-epithelial interaction. *EXS.* 1995;74:191-214.

Rubin JS, Osada J, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:802-6.

Ruslander D. Tumoren der Nasenhöhle. In: Kessler M, Hrsg. *Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katzen*. Berlin: Parey Buchverlag; 2005. p. 299-305.

Sarfaty D, Carrillo JM, Peterson ME. Neurologic, endocrinologic, and pathologic findings associated with large pituitary tumors in dogs: (1976-1984). *J Am Vet Med Assoc*. 1988;193:854-6.

Salisbury SK, Lantz GC. Long-term results of partial mandibulectomy for treatment of oral tumors in 30 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1988;24:285-94.

SAS Institute Inc., Cary, N.2.-8., U.S.A., *SAS/STAT Users Guide Version 6*. 4. Aufl. 1990.

Sasse AD, de Oliveira Clark LG, Sasse EC, Clark OA. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: Result of a meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;64:784-91.

Schmidt E, Thoennissen NH, Rudat A, Bieker R, Schliemann C, Mesters RM, Zühlsdorf M, Müller-Tidow C, Berdel WE. Use of Palifermin for the prevention of high-dose methotrexate-induced oral mucositis. *Annals of Oncology*. 2008;19:1644-9.

Schroeder HE. *Differentiation of human oral stratified epithelia*. Basel: Karger; 1981.

Schuemer R, Ströhlein G, Gogolok J. *Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS. Band II: Komplexe statistische Analyseverfahren*. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 1990.

Schwarz PD, Withrow SJ, Curtis CR, Powers BE, Straw RC. Mandibular resection as a treatment for oral cancer in 81 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1991;27:601-10.

Schwarz PD, Withrow SJ, Curtis CR, Powers BE, Straw RC. Partial maxillar resection as a treatment for oral cancer in 61 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1991a;27:617-24.

Sciubba JJ, Goldenberg D. Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol*. 2006;7:175-83.

Seegenschmiedt MH. *Nebenwirkungen in der Onkologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1998.

Serdar CM, Heard R, Prathikanti R, Lau D, Danilenko D, Hunt T, Lacey D. Safety, pharmacokinetics and biologic activity of rHuKGF in normal volunteers: results of a placebo-controlled randomised double-blind phase 1 study. *Blood*. 1997;90:172a.

Sessums K, Mariani C. Intracranial meningioma in dogs and cats: a comparative review. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*. 2009;31:330-9.

Slonina D, Hoinkis C, Dörr W. Effect of keratinocyte growth factor on radiation survival and colony size of human epidermal keratinocytes in vitro. *Radiation Research*. 2001;156:761-6.

Sonis ST, Costa JW Jr, Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;74:749-55.

Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB, LeVeque FG, Liggett WH jr, Mulagha MT, Peterson DE, Rose AH, Schubert MM, Spijkervet FK, Wittes JP. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. *Cancer*. 1999;85:2103-13.

Sonis ST, Lindquist L, Van Vugt A, Stewart AA, Stam K, Qu GY, Iwata KK, Haley JD. Prevention of chemotherapy-induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta 3. *Cancer Res*. 1994;54:1135-8.

Sonis ST, Muska A, O'Brien J, Van Vugt A, Langer-Safer P, Keith J. Alteration in the frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995;31B:261-6.

Sonis ST, O'Donnell KE, Popat R, Bragdon C, Phelan S, Cocks D, Epstein JB. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. *Oral Oncol*. 2004;40:170-6.

Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L, Login G, Ymamkawa M, Moses G, Bouchard P, Hayes LL, Bedrosian C, Dorner AJ. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*. 2000;36:373-81.

Sonis ST, Scherer J, Phelan S, Lucey CA, Barron JE, O'Donnell KE, Brennan RJ, Pan H, Busse P, Haley JD. The gene expression sequence of radiated mucosa in an animal mucositis model. *Cell Prolif*. 2002;35:93-102.

Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990;69:437-43.

Sonis ST, Van Vugt AG, Brien JP, Muska AD, Bruskin AM, Rose A, Haley JD. Transforming growth factor-beta 3 mediated modulation of cell cycling and attenuation of 5-fluorouracil induced oral mucositis. *Oral Oncol.* 1997;33:47-54.

Sonis ST, Van Vugt AG, Mc Donald J, Dotoli E, Schwertschlag U, Szklut P, Keith J. Mitigating effects of interleukin 11 on consecutive courses of 5-fluorouracil-induced ulcerative mucositis in hamsters. *Cytokine.* 1997a;9:605-12.

Spielberger RT, Stiff P, Emmanouilides C, Yanovich S, Bensinger W, Hedrick E, Noga S, Ziegler T, Keating A, Frankel S, Gentile T, Heard R, Yao B, Elhardt D. Efficacy of recombinant human keratinocyte growth factor (rHuKGF) in reducing mucositis in patients with hematologic malignancies undergoing autologous peripheral blood progenitor cell transplantation (auto-PBPCT) after radiation-based conditioning-results of a phase 2 trial. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2001;20:25.

Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, Gentile T, Weisdorf D, Kewalramani T, Shea T, Yanovich S, Hansen K, Noga S, McCarty J, LeMaistre CF, Sung EC, Blazar BR, Elhardt D, Chen M-G, Emmanouilides C. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2004;351:2590-8.

Statistisches Bundesamt 2008. Todesursachen – Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen 2008 (zitiert vom 07.02.2010): <<http://www.destasis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destasis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content100/EckdatenTU,templateId=renderPrint.psml>>.

Stebbins KE, Morse CC, Goldschmidt MH. Feline oral neoplasia: A ten year survey. *Vet Pathol.* 1989;26:121-8.

Steel GG. *Basic Clinical Radiobiology.* 3. Aufl. London: Arnold Publishers; 2002. p. 58-63.

Stokman MA, Spijkervet FKL, Boezen HM, Schouter JP, Roodenburg JLN, Vries EGE. Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: results of meta-analyses. *J Dent Res.* 2006;85 690-700.

Strahlenschutzkommission (SSK). *Der Strahlenunfall, Band 32.* 2. Aufl. Berlin: H Hoffmann GmbH; 2007. p. 1-135.

Straw RC, Withrow SJ, Gillette EL, McChesney AE. Use of radiotherapy for the treatment of intranasal tumors in cats: six cases (1980-1985). *J Am Vet Med Assoc.* 1986;189:927-9.

Takeoka M, Ward WF, Pollack H, Kamp DW, Panos RJ. KGF facilitates repair of radiation-induced DNA-damage in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol.* 1997;272:L1174-80.

Thames HD, Hendry JH. *Fractionation in Radiotherapy.* London: Taylor and Francis; 1987.

Théon AP, LeCouteur RA, Carr EA, Griffey SM. Influence of tumor cell proliferation and sex-hormone receptors on effectiveness of radiation therapy for dogs with incompletely resected meningiomas. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;216:701-7.

Théon AP, Madewell BR, Harb MF, Dungworth DL. Megavoltage irradiation of neoplasms of the nasal and paranasal cavities in 77 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;202:1469-75.

Théon AP, Madewell BR, Schearn VI, Moulton JE. Prognostic factors associated with radiotherapy of squamous cell carcinoma of the nasal plane in cats. *J Am Vet Med Ass.* 1995;206:991-6.

Théon AP, Peaston AE, Madewell BR, Dungworth DL. Irradiation of nonlymphoproliferative neoplasms of the nasal cavity and paranasal sinuses in 16 cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;204:78-83.

Théon AP, Rodriguez C, Madewell BR. Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation. *J Am Vet Med Assoc.* 1997;210:778-84.

Thompson JP, Ackermann N, Bellah JR, Beale BS, Ellison GW. 192 Ir brachytherapy, using an intracavitary afterload device for the treatment of intranasal neoplasms in dogs. *Am J Vet Res.* 1992;53:78-83.

Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;175:567-71.

Trott K-R, Herrmann Th, Dörr W. Allgemeine Pathogenese akuter Strahlenfolgen. In: Trott K-R, Herrmann Th, Dörr W, Hrsg. *Strahlenwirkungen auf Normalgewebe.* München: Verlag Urban und Vogel; 2002. p. 9-15.

Tsuboi R, Sato C, Kurita Y, Ron D, Rubin JS, Ogawa H. Keratinocyte growth factor (FGF-7) stimulates migration and plasminogen activator activity of normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1993;101:9-53.

Turrel JM. Intraoperative radiotherapy of carcinoma of the prostate in ten dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1987;190:48-52.

Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Blitz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest.* 1994;93:1298-306.

Ulich TR, Yi ES, Cardiff R, Yin S, Dikhazin N, Blitz R, Morris CF, Housley RM, Pierce G. Keratinocyte growth factor is a growth factor for mammary epithelium in vivo. *Am J Pathol.* 1994a;144:862-8.

Vandeveld M. Brain tumors in domestic animals: an overview. *Proc Conference on Brain Tumors in Man and Animals: Research Triangle Park, North Carolina 1984.*

Von Bültzingslöwen I, Brennan MT, Spijkervet FK, Logan R, Stringer A, Raber-Durlacher JE, Keefe D. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastro-intestinal mucositis. *Supp Care Cancer.* 2006;14:519-27.

Wardley AM, Jayson GC, Swindell R, Morgenstern GR, Chang J, Bloor R, Fraser CJ, Scarffe JH. Prospective evaluation of oral mucositis in patients receiving myeloablative conditioning regimens and haemopoietic progenitor rescue. *Br J Haematol.* 2000;110:292-9.

Warnakulasuriya KA, MacDonald DG. Diurnal variation in labelling index in human buccale epithelium. *Arch Oral Biol.* 1993;38:1107-11.

Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF, Pesik N, Wiley AL, Dickerson WE, Tsu H, Confer DL, Coleman CN, Seed T, Lowry P, Armitage JO, Dainiak N. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Ann Intern Med.* 2004;140:1037-51.

Williams LE, Johnson JL, Hauck ML, Ruslander DM, Price GS, Thrall DE. Chemotherapy followed by half-body radiation therapy for canine lymphoma. *J Vet Intern Med.* 2004;18:703-9.

Withers HR. Cell renewal system concepts and the radiation response. *Front Radiat Ther Oncol.* 1972;6:93-107.

Withers HR. The four R's of radiotherapy. In: Lett JT, Adler H, Hrsg. *Advances in radiation biology.* 5. Aufl. New York: Academ Press; 1975. p. 241-71.

Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. Treatment volume and tissue tolerance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1988;14:751-9.

Withrow SJ, Vail DM. Therapeutic modalities for cancer patient. In: Withrow SJ, Vail DM, Hrsg. Withrow and MacEwen`s small animal clinical oncology. 4. Aufl. Philadelphia: WB Saunders Co; 2007. p. 157-347.

World Health Organisation (WHO) 1979. WHO-Handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva: World Health Organisation; 1979. p. 48.

Wu KI, Pollack N, Panos RJ, Sporn PHS, Kamp DW. Keratinocyte growth factor promotes alveolar epithelial cell DNA repair after H₂O₂ exposure. *Am J Physiol.* 1998;275:L780-7.

Yi ES, Yin S, Harglerode DL, Bedoya A, Bikhazi N, Housley RM, Ankermann SL, Morris CF, Pierce GF, Ulich TR. Keratinocyte growth factor induced pancreatic ductal epithelial proliferation. *Am J Pathol.* 1994;145:80-5.

Yi ES, Shabaik AS, Lacey DL, Bedoya AA, Yin S, Housley RM, Danilenko DM, Benson W, Cohen AM, Pierce GF, Thomason A, Ulich TR. Keratinocyte growth factor causes proliferation of urothelium in vivo. *J Urol.* 1995;154:1566-70.

Yoon JH, Feeney DA, Jessen CR, Walter PA. External-beam Co-60 radiotherapy for canine nasal tumors: A comparison of survival by treatment protocol. *Res Vet Sci.* 2007;84:140-9.

Yoshino M, Ishiwata T, Watanabe M, Matsunobu T, Komine O, Ono Y, Yamamoto T, Fujii T, Matsumoto K, Tokunaga A, Naito Z. Expression and roles of keratinocyte growth factor and its receptor in esophageal cancer cells. *Int J Oncol.* 2007;31:721-8.

Zaki FA, Hurvitz AI. Spontaneous neoplasms of the central nervous system of the cat. *J Sm Anim Pract.* 1976;17:773-82.

Zang XP, Pento JT. Keratinocyte growth factor-induced motility of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18:573-80.

9 Anhang

9.1 SPF-Bedingungen im Tierstall des Experimentellen Zentrums

Die Mäuse werden auf folgende Pathogene getestet:

Viren: Mäusehepatitisvirus (MHV), Reovirus Typ 3 (Reo3), Theilersches Encephalo-Myelitisvirus der Maus (TMEV), Pneumonievirus der Maus (PVM), Sendavirus

Bakterien: Bordetella bronchiseptica, Citrobacter rhodentium, Clostridium piliformae, Corynebacterium kutscheri, E. coli, Helicobacter spp., Klebsiella oxytocea, Klebsiella pneumoniae, Mycoplasma spp., Pasteurellaceae, Proteus spp., Pseudomonas aeruginosa, Salmonella sp., Staphylococcus aureus, Streptobacillus moniliformis, β -hämolytische Streptococcus sp. und Streptococcus pneumoniae

Parasiten: Aspicularis sp., Syphacia sp., Coccidien, Giardia sp., Spironucleus muris, sonstige Flagellaten, Arthropoden, Trichomonaden

9.2 Reagenzien zur HE-Färbung

- 0,5 % Eosinlösung (100 ml 1 % alkalische Eosinlösung auf 100 ml Ethanol 96 %)
- Xylol
- absteigende Alkoholreihe (Ethanol absolutus, Ethanol 96 %, Ethanol 70 %, Ethanol 40 %)
- Mayers Hämalaun (1 g Hämatoxylin in 1 l Aqua dest., 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure)
- Entellan (Entellan[®]neu, Merck KgaA, Darmstadt)

9.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Tab. 11: Zellzahl nach alleiniger Einzeitbestrahlung (13 Gy)

Angegeben sind absolute und relative Zellzahl von Gesamtepithel, Germinativschicht und funktioneller Schicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahtes Epithel.

Tag	Zellzahl					
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW ± SD	%	Zellzahl/mm MW ± SD	%	Zellzahl/mm MW ± SD	%
0	560 ± 9	100 ± 2	452 ± 16	100 ± 4	108 ± 7	100 ± 6
1	657 ± 89	117 ± 16	500 ± 76	111 ± 17	157 ± 31	145 ± 29
2	543 ± 73	97 ± 13	417 ± 68	92 ± 15	126 ± 18	117 ± 17
3	446 ± 22	80 ± 4	348 ± 19	77 ± 4	98 ± 8	91 ± 7
4	444 ± 104	79 ± 19	346 ± 82	76 ± 18	98 ± 23	91 ± 21
5	435 ± 31	78 ± 6	358 ± 76	79 ± 4	77 ± 12	71 ± 11
6	407 ± 31	73 ± 6	333 ± 16	74 ± 4	76 ± 15	70 ± 14
7	407 ± 16	73 ± 4	324 ± 22	72 ± 5	83 ± 4	77 ± 4
8	411 ± 94	74 ± 17	282 ± 117	64 ± 25	130 ± 32	117 ± 25
9	446 ± 13	80 ± 38	302 ± 71	67 ± 24	144 ± 12	133 ± 11
10	526 ± 19	94 ± 3	387 ± 12	86 ± 3	139 ± 21	129 ± 19
11	669 ± 36	119 ± 6	510 ± 25	113 ± 6	160 ± 11	148 ± 10
12	693 ± 97	124 ± 17	543 ± 93	120 ± 21	150 ± 5	139 ± 5
13	687 ± 89	123 ± 16	500 ± 49	111 ± 11	186 ± 46	172 ± 43
14	708 ± 91	126 ± 16	519 ± 57	115 ± 13	189 ± 35	175 ± 32
15	665 ± 31	119 ± 6	490 ± 24	108 ± 5	175 ± 15	161 ± 14

Tab. 12: Dicke nach alleiniger Einzeitbestrahlung (13 Gy)

Angegeben sind absolute und relative Dicke von Gesamtepithel, Germinativschicht, funktioneller Schicht und Keratinschicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahtes Epithel.

Tag	Dicke							
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%
0	106 ± 6	100 ± 6	25 ± 1	100 ± 4	56 ± 9	100 ± 16	26 ± 1	100 ± 4
1	106 ± 8	100 ± 8	25 ± 0	100 ± 0	48 ± 6	86 ± 11	33 ± 7	127 ± 27
2	91 ± 11	85 ± 10	18 ± 4	72 ± 16	47 ± 7	84 ± 13	26 ± 2	100 ± 8
3	88 ± 17	83 ± 16	22 ± 6	88 ± 24	42 ± 7	75 ± 13	24 ± 4	92 ± 15
4	76 ± 14	72 ± 13	19 ± 6	76 ± 24	32 ± 6	57 ± 11	25 ± 6	96 ± 23
5	94 ± 10	89 ± 9	21 ± 7	84 ± 28	42 ± 6	75 ± 11	31 ± 2	119 ± 8
6	101 ± 5	95 ± 5	23 ± 8	92 ± 32	51 ± 2	91 ± 4	28 ± 5	108 ± 19
7	113 ± 12	107 ± 11	28 ± 5	112 ± 20	52 ± 4	93 ± 7	33 ± 4	127 ± 15
8	137 ± 16	128 ± 14	31 ± 2	124 ± 8	70 ± 1	125 ± 2	36 ± 13	138 ± 50
9	129 ± 9	122 ± 8	25 ± 7	100 ± 28	64 ± 9	114 ± 16	40 ± 2	154 ± 5
10	125 ± 25	118 ± 24	35 ± 9	140 ± 36	50 ± 11	89 ± 20	40 ± 6	154 ± 23
11	115 ± 10	108 ± 9	29 ± 8	116 ± 32	61 ± 2	109 ± 4	25 ± 7	96 ± 27
12	117 ± 23	111 ± 22	36 ± 10	148 ± 40	56 ± 3	98 ± 5	25 ± 13	100 ± 50
13	106 ± 11	100 ± 10	18 ± 10	72 ± 40	61 ± 13	109 ± 5	27 ± 13	104 ± 50
14	109 ± 16	103 ± 15	21 ± 8	84 ± 32	58 ± 3	104 ± 5	31 ± 6	119 ± 23
15	108 ± 12	102 ± 11	21 ± 8	84 ± 32	58 ± 9	104 ± 16	30 ± 10	115 ± 38

Tab. 13: Zellvolumen nach alleiniger Einzeitbestrahlung (13 Gy)

Angegeben ist das relative Zellvolumen der Zellen der Germinativschicht bis 15 Tage nach der Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahtes Epithel.

Tag	Relatives Zellvolumen % MW ± SD
0	100 ± 0
1	92 ± 15
2	82 ± 33
3	115 ± 28
4	100 ± 28
5	104 ± 31
6	123 ± 40
7	155 ± 26
8	239 ± 56
9	148 ± 7
10	163 ± 43
11	105 ± 35
12	123 ± 42
13	65 ± 32
14	79 ± 35
15	78 ± 34

Tab. 14: Zellzahl nach Einzeitbestrahlung (24 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen vor und nach der Bestrahlung (Standardanwendung)

Angegeben sind absolute und relative Zellzahl von Gesamtepithel, Germinativschicht und funktioneller Schicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahtes Epithel.

Tag	Zellzahl					
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW ± SD	%	Zellzahl/mm MW ± SD	%	Zellzahl/mm MW ± SD	%
-3	560 ± 9	100 ± 2	452 ± 16	100 ± 4	108 ± 7	100 ± 6
-2	814 ± 57	161 ± 9	625 ± 48	138 ± 11	189 ± 11	175 ± 10
-1	902 ± 48	145 ± 10	686 ± 19	152 ± 4	217 ± 33	201 ± 31
0	1032 ± 117	184 ± 21	773 ± 94	171 ± 21	260 ± 9	241 ± 36
1	974 ± 142	174 ± 25	710 ± 117	157 ± 26	264 ± 29	244 ± 27
2	904 ± 116	161 ± 21	600 ± 65	133 ± 14	304 ± 59	281 ± 55
3	837 ± 230	149 ± 41	474 ± 118	105 ± 26	363 ± 113	336 ± 105
4	620 ± 83	111 ± 15	398 ± 84	88 ± 19	222 ± 62	206 ± 58
5	408 ± 53	73 ± 9	240 ± 50	53 ± 11	168 ± 4	156 ± 4
6	338 ± 54	60 ± 10	228 ± 34	50 ± 7	110 ± 5	102 ± 5
7	202 ± 76	36 ± 14	120 ± 60	27 ± 14	83 ± 16	77 ± 15
8	257 ± 56	46 ± 10	178 ± 62	39 ± 14	79 ± 17	73 ± 16
9	241 ± 84	43 ± 15	197 ± 72	44 ± 16	44 ± 15	41 ± 14
10	382 ± 66	68 ± 12	299 ± 46	66 ± 10	83 ± 20	77 ± 19
11	635 ± 246	113 ± 44	467 ± 43	103 ± 9	166 ± 65	154 ± 60
12	586 ± 19	105 ± 3	422 ± 7	93 ± 2	164 ± 23	152 ± 21
13	625 ± 79	112 ± 14	427 ± 42	94 ± 9	198 ± 41	183 ± 38
14	623 ± 65	111 ± 12	434 ± 36	96 ± 8	189 ± 33	175 ± 31
15	572 ± 75	102 ± 13	431 ± 60	95 ± 13	142 ± 15	131 ± 14

Tab. 15: Dicke nach Einzeitbestrahlung (24 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen vor und nach der Bestrahlung (Standardanwendung)

Angegeben sind absolute und relative Dicke von Gesamtepithel, Germinativschicht, funktioneller Schicht und Keratinschicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahtes Epithel.

Tag	Dicke							
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%
-3	106 ± 6	100 ± 6	25 ± 1	100 ± 4	56 ± 9	100 ± 16	26 ± 1	100 ± 4
-2	127 ± 25	120 ± 24	40 ± 7	160 ± 28	65 ± 15	116 ± 27	23 ± 5	88 ± 19
-1	214 ± 10	202 ± 9	65 ± 5	260 ± 20	110 ± 6	196 ± 11	39 ± 4	150 ± 15
0	228 ± 14	215 ± 13	64 ± 2	256 ± 8	125 ± 12	223 ± 21	39 ± 9	150 ± 35
1	182 ± 30	172 ± 28	24 ± 4	96 ± 16	98 ± 18	175 ± 32	60 ± 14	230 ± 54
2	222 ± 13	195 ± 24	34 ± 7	136 ± 28	139 ± 10	248 ± 18	49 ± 4	188 ± 15
3	303 ± 44	286 ± 42	38 ± 7	152 ± 28	184 ± 59	329 ± 105	82 ± 15	315 ± 58
4	255 ± 46	241 ± 43	38 ± 2	152 ± 48	149 ± 23	266 ± 41	68 ± 30	262 ± 116
5	215 ± 17	203 ± 8	27 ± 1	108 ± 4	120 ± 16	214 ± 29	68 ± 4	262 ± 15
6	167 ± 30	158 ± 28	29 ± 6	116 ± 24	80 ± 8	143 ± 14	58 ± 19	223 ± 73
7	103 ± 6	97 ± 6	19 ± 2	76 ± 8	44 ± 6	79 ± 11	39 ± 2	150 ± 8
8	74 ± 10	70 ± 9	14 ± 5	56 ± 20	26 ± 2	46 ± 4	33 ± 4	127 ± 15
9	65 ± 2	61 ± 2	19 ± 5	76 ± 20	24 ± 6	43 ± 11	22 ± 2	85 ± 8
10	69 ± 17	65 ± 16	19 ± 2	76 ± 8	32 ± 14	57 ± 25	17 ± 6	68 ± 24
11	85 ± 43	80 ± 40	22 ± 10	88 ± 40	58 ± 8	104 ± 14	19 ± 15	76 ± 60
12	90 ± 23	85 ± 22	31 ± 5	124 ± 20	49 ± 17	88 ± 31	11 ± 1	42 ± 4
13	117 ± 33	110 ± 31	28 ± 7	112 ± 28	66 ± 25	118 ± 45	24 ± 9	92 ± 35
14	124 ± 1	117 ± 1	28 ± 8	112 ± 32	68 ± 10	121 ± 18	28 ± 3	108 ± 12
15	118 ± 8	111 ± 8	22 ± 1	88 ± 4	63 ± 13	113 ± 23	34 ± 8	131 ± 31

Tab. 16: Zellvolumen nach Einzeitbestrahlung (24 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen vor und nach der Bestrahlung (Standardanwendung)

Angegeben ist das relative Zellvolumen der Germinativschicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von drei Mäusen. Tag 0: unbestrahtes Epithel.

Tag	Relatives Zellvolumen % MW ± SD
-3	100 ± 0
-2	114 ± 13
-1	171 ± 8
0	152 ± 25
1	62 ± 19
2	103 ± 20
3	151 ± 55
4	169 ± 40
5	204 ± 37
6	245 ± 97
7	337 ± 146
8	165 ± 102
9	216 ± 155
10	117 ± 4
11	85 ± 5
12	131 ± 24
13	117 ± 19
14	111 ± 35
15	92 ± 7

Tab. 17: Zellzahl nach Einzeitbestrahlung (25 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen vor der Bestrahlung

Angegeben sind die absolute und relative Zellzahl von Gesamtepithel, Germinativschicht und funktioneller Schicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahltes Epithel.

Tag	Zellzahl					
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW ± SD	%	Zellzahl/mm MW ± SD	%	Zellzahl/mm MW ± SD	%
-3	560 ± 9	100 ± 2	452 ± 16	100 ± 4	108 ± 7	100 ± 6
-2	814 ± 57	161 ± 9	625 ± 48	138 ± 11	189 ± 11	175 ± 10
-1	902 ± 48	145 ± 10	686 ± 19	152 ± 4	217 ± 33	201 ± 31
0	1032 ± 117	184 ± 21	773 ± 94	171 ± 21	260 ± 39	241 ± 36
1	932 ± 119	166 ± 21	676 ± 76	150 ± 17	256 ± 50	237 ± 46
2	737 ± 69	132 ± 12	476 ± 50	105 ± 11	261 ± 25	242 ± 23
3	590 ± 74	105 ± 13	374 ± 47	83 ± 10	216 ± 26	200 ± 24
4	483 ± 79	86 ± 14	370 ± 71	82 ± 16	113 ± 9	105 ± 8
5	446 ± 20	80 ± 4	353 ± 31	78 ± 7	93 ± 14	86 ± 13
6	345 ± 34	62 ± 6	265 ± 22	59 ± 5	81 ± 12	75 ± 11
7	361 ± 123	64 ± 22	294 ± 105	65 ± 23	67 ± 18	62 ± 17
8	268 ± 62	48 ± 11	206 ± 58	46 ± 13	62 ± 4	57 ± 4
9	241 ± 62	43 ± 11	155 ± 43	34 ± 9	86 ± 19	80 ± 18
10	288 ± 165	51 ± 29	209 ± 163	46 ± 36	79 ± 11	73 ± 10
11	342 ± 216	61 ± 39	255 ± 161	56 ± 35	87 ± 56	81 ± 52
12	423 ± 122	76 ± 22	298 ± 69	66 ± 15	125 ± 53	116 ± 49
13	584 ± 103	104 ± 18	411 ± 76	91 ± 17	174 ± 27	161 ± 25
14	662 ± 49	118 ± 9	477 ± 54	106 ± 12	185 ± 12	171 ± 11
15	602 ± 51	108 ± 9	425 ± 38	94 ± 8	178 ± 17	165 ± 16

Tab. 18: Dicke nach Einzeitbestrahlung (25 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen vor der Bestrahlung

Angegeben sind die absolute und relative Dicke von Gesamtepithel, Germinativschicht, funktioneller Schicht und Keratinschicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahltes Epithel.

Tag	Dicke							
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%
-3	106 ± 6	100 ± 6	25 ± 1	100 ± 4	56 ± 9	100 ± 16	26 ± 1	100 ± 4
-2	127 ± 25	120 ± 24	40 ± 7	160 ± 28	65 ± 15	116 ± 27	23 ± 5	88 ± 19
-1	214 ± 10	202 ± 9	65 ± 5	260 ± 20	110 ± 6	196 ± 11	39 ± 4	150 ± 15
0	228 ± 14	215 ± 13	64 ± 2	256 ± 8	125 ± 12	223 ± 21	39 ± 9	150 ± 35
1	201 ± 24	190 ± 23	40 ± 4	160 ± 16	112 ± 18	200 ± 32	49 ± 17	188 ± 65
2	158 ± 30	149 ± 28	27 ± 6	108 ± 24	88 ± 19	157 ± 34	43 ± 11	165 ± 42
3	147 ± 7	139 ± 7	20 ± 2	80 ± 8	80 ± 5	143 ± 9	47 ± 6	181 ± 23
4	128 ± 25	121 ± 20	20 ± 2	80 ± 8	59 ± 16	105 ± 28	48 ± 18	184 ± 69
5	114 ± 13	108 ± 12	18 ± 3	72 ± 12	55 ± 7	98 ± 12	41 ± 3	158 ± 12
6	119 ± 13	112 ± 12	22 ± 4	88 ± 16	50 ± 3	89 ± 5	48 ± 6	185 ± 23
7	121 ± 17	114 ± 16	25 ± 6	100 ± 24	53 ± 3	94 ± 5	43 ± 11	165 ± 42
8	118 ± 4	111 ± 4	25 ± 3	100 ± 12	56 ± 3	100 ± 5	37 ± 4	142 ± 15
9	142 ± 20	134 ± 19	18 ± 6	72 ± 24	57 ± 14	102 ± 25	67 ± 19	258 ± 73
10	125 ± 22	117 ± 18	19 ± 6	76 ± 24	49 ± 6	88 ± 11	57 ± 23	219 ± 88
11	73 ± 11	69 ± 10	11 ± 11	44 ± 44	25 ± 14	45 ± 25	37 ± 14	142 ± 54
12	51 ± 31	48 ± 29	3 ± 3	12 ± 12	16 ± 19	29 ± 34	33 ± 10	127 ± 38
13	90 ± 66	85 ± 62	25 ± 18	100 ± 72	46 ± 38	82 ± 68	19 ± 15	73 ± 58
14	111 ± 21	105 ± 20	40 ± 11	160 ± 44	53 ± 23	95 ± 41	18 ± 10	69 ± 38
15	133 ± 15	125 ± 14	33 ± 8	132 ± 32	73 ± 13	130 ± 23	27 ± 8	104 ± 31

Tab. 19: Zellvolumen nach Einzeitbestrahlung (25 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen vor der Bestrahlung

Angegeben ist das relative Zellvolumen der Germinativschicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung (25 Gy). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW \pm SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahltes Epithel.

Tag	Relatives Zellvolumen % MW \pm SD
-3	100 \pm 0
-2	114 \pm 13
-1	171 \pm 8
0	152 \pm 25
1	109 \pm 23
2	104 \pm 24
3	97 \pm 19
4	102 \pm 14
5	92 \pm 9
6	149 \pm 41
7	167 \pm 64
8	236 \pm 72
9	225 \pm 99
10	212 \pm 102
11	66 \pm 29
12	15 \pm 13
13	100 \pm 66
14	151 \pm 31
15	141 \pm 24

Tab. 20: Zellzahl nach Einzeitbestrahlung (21 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen nach der Bestrahlung

Angegeben ist die absolute und relative Zellzahl von Gesamtepithel, Germinativschicht und funktioneller Schicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW \pm SD) von drei Mäusen. Tag 0: unbestrahltes Epithel.

Tag	Zellzahl					
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW \pm SD	%	Zellzahl/mm MW \pm SD	%	Zellzahl/mm MW \pm SD	%
0	560 \pm 9	100 \pm 2	452 \pm 16	100 \pm 4	108 \pm 7	100 \pm 6
1	681 \pm 74	122 \pm 13	546 \pm 76	121 \pm 17	134 \pm 25	124 \pm 23
2	496 \pm 15	89 \pm 3	383 \pm 10	85 \pm 2	113 \pm 20	105 \pm 19
3	616 \pm 107	110 \pm 19	354 \pm 58	78 \pm 13	261 \pm 52	242 \pm 48
4	394 \pm 56	70 \pm 10	224 \pm 44	50 \pm 10	170 \pm 12	157 \pm 11
5	196 \pm 17	35 \pm 3	117 \pm 29	26 \pm 6	79 \pm 13	73 \pm 12
6	293 \pm 116	52 \pm 21	202 \pm 90	45 \pm 20	91 \pm 29	84 \pm 27
7	302 \pm 151	54 \pm 27	211 \pm 109	47 \pm 24	90 \pm 43	83 \pm 40
8	360 \pm 216	64 \pm 38	269 \pm 165	60 \pm 37	91 \pm 51	84 \pm 47
9	276 \pm 66	49 \pm 24	221 \pm 58	49 \pm 13	76 \pm 9	70 \pm 12
10	691 \pm 64	123 \pm 11	538 \pm 39	119 \pm 9	152 \pm 28	141 \pm 26
11	760 \pm 88	136 \pm 16	548 \pm 73	121 \pm 16	215 \pm 20	199 \pm 19
12	739 \pm 30	132 \pm 5	544 \pm 36	120 \pm 8	195 \pm 8	181 \pm 7
13	597 \pm 52	107 \pm 9	456 \pm 27	101 \pm 6	144 \pm 22	133 \pm 20
14	684 \pm 55	122 \pm 10	505 \pm 50	112 \pm 11	179 \pm 11	166 \pm 10
15	676 \pm 28	121 \pm 5	514 \pm 27	114 \pm 6	162 \pm 20	150 \pm 19

Tab. 21: Dicke nach Einzeitbestrahlung (21 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen nach der Bestrahlung

Angegeben ist die absolute und relative Dicke von Gesamtepithel, Germinativschicht, funktioneller Schicht und Keratinschicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahltes Epithel.

Tag	Dicke							
	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%	µm, MW ± SD	%
0	106 ± 6	100 ± 6	25 ± 1	100 ± 4	56 ± 9	100 ± 16	26 ± 1	100 ± 4
1	97 ± 2	92 ± 2	28 ± 4	112 ± 16	44 ± 6	78 ± 11	24 ± 6	92 ± 23
2	128 ± 16	120 ± 15	31 ± 2	124 ± 8	64 ± 14	114 ± 25	33 ± 4	127 ± 15
3	217 ± 17	204 ± 16	35 ± 5	140 ± 20	143 ± 28	255 ± 50	40 ± 10	154 ± 39
4	222 ± 22	209 ± 21	41 ± 5	164 ± 20	115 ± 9	205 ± 16	66 ± 12	254 ± 46
5	160 ± 8	151 ± 8	38 ± 8	152 ± 32	56 ± 5	100 ± 9	66 ± 14	254 ± 54
6	95 ± 23	89 ± 22	20 ± 7	80 ± 28	37 ± 3	66 ± 5	40 ± 13	154 ± 50
7	47 ± 12	44 ± 11	13 ± 4	52 ± 16	19 ± 2	34 ± 4	22 ± 2	85 ± 8
8	29 ± 16	27 ± 15	17 ± 4	60 ± 14	24 ± 2	43 ± 4	15 ± 6	58 ± 23
9	74 ± 16	70 ± 15	18 ± 6	72 ± 24	19 ± 5	34 ± 9	17 ± 14	65 ± 54
10	105 ± 8	99 ± 8	35 ± 6	140 ± 17	53 ± 7	95 ± 13	17 ± 4	65 ± 15
11	105 ± 10	99 ± 9	47 ± 9	188 ± 19	49 ± 11	88 ± 20	9 ± 3	35 ± 12
12	98 ± 25	92 ± 23	18 ± 10	72 ± 40	54 ± 2	96 ± 4	26 ± 18	100 ± 69
13	101 ± 3	95 ± 3	15 ± 5	60 ± 20	50 ± 4	89 ± 7	36 ± 6	138 ± 23
14	91 ± 8	85 ± 7	12 ± 1	48 ± 4	53 ± 4	95 ± 7	26 ± 5	100 ± 19
15	113 ± 23	107 ± 22	26 ± 13	104 ± 52	58 ± 3	103 ± 5	29 ± 8	112 ± 31

Tab. 22: Zellvolumen nach Einzeitbestrahlung (21 Gy) und Palifermin-Applikation (5 mg/kg/Tag s.c.) an drei Tagen nach der Bestrahlung

Angegeben ist das relative Zellvolumen der Germinativschicht bis 15 Tage nach Einzeitbestrahlung. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte (MW ± SD) von jeweils drei Mäusen. Tag 0: unbestrahltes Epithel.

Tag	Relatives Zellvolumen % MW ± SD
0	100 ± 0
1	94 ± 5
2	147 ± 12
3	183 ± 52
4	339 ± 76
5	612 ± 184
6	211 ± 136
7	128 ± 80
8	148 ± 105
9	159 ± 77
10	119 ± 23
11	161 ± 46
12	62 ± 37
13	60 ± 15
14	43 ± 8
15	96 ± 49

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Dörr für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die jederzeit gewährte schnelle Hilfe und die umfangreiche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus des Universitätsklinikums Dresden danke ich für die Erlaubnis zur Nutzung der Einrichtungen. Für die fachliche Beratung und technische Unterstützung danke ich allen Mitarbeitern des Labors.

Den Mitarbeitern der AG Normalgewebe der „Experimentellen Strahlenbiologie“, insbesondere Frau Dr. K. Spekl und Frau Dr. M. Schmidt gilt mein Dank für die kollegiale Unterstützung und gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit. Für ihre freundliche Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate sei Frau M. Oelsner und Frau L. Stolz-Kieslich herzlich gedankt.

Bei der Firma AMGEN Inc. (Thousand Oaks, CA, USA) bedanke ich mich für die Bereitstellung des Keratinozyten-Wachstumsfaktors (Palifermin).

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht und mich bei Allem jederzeit unterstützt hat.