
Strategien zur Reduktion von Spätfolgen nach Zweitbestrahlung des zentralen Nervensystems

C. Nieder, N. Andratschke, N. Wiedenmann, M. Molls

Kurzfassung

Hintergrund: Aktuelle Modelle zur Pathogenese der Strahlenmyelopathie lassen den präventiven Einsatz von Wachstumsfaktoren sinnvoll erscheinen. Daher sollte überprüft werden, ob insulin-like growth factor-1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF) die Strahlentoleranz des zervikalen Rückenmarks von Ratten beeinflussen.

Material und Methoden: Das Zervikalmark von erwachsenen Fisher F-344 Ratten wurde mit zwei Einzelfractionen bis insgesamt 30–42 Gy bestrahlt (16 Gy plus 14–26 Gy). Begleitend wurde eine kontinuierliche intrathekale Infusion von bFGF, PDGF, VEGF oder NaCl in die cisterna magna gegeben. In weiteren Experimenten erhielten die Ratten IGF-1 subkutan oder IGF-1 plus Amifostin. Die Tiere wurden bis zur Entwicklung einer Myelopathie oder maximal 12 Monate nachbeobachtet. Post mortem erfolgten histopathologische Untersuchungen.

Resultate: Für alle Wachstumsfaktoren wurden wirksame Dosen identifiziert. Eine Protektion konnte sowohl mit Monotherapien als auch der Kombination IGF-1 plus Amifostin erzielt werden. Hierzu scheint die Anwesenheit der Wachstumsfaktoren zum Zeitpunkt der Bestrahlung erforderlich zu sein.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass kurze Interventionen die strahleninduzierte Neurotoxizität reduzieren können. Die bisherigen Strategien eröffnen Perspektiven zur weiteren Optimierung im Tierversuch und lassen die Hoffnung realistisch erscheinen, dass in absehbarer Zeit nicht mehr ausschließlich auf technische Möglichkeiten und die Berücksichtigung von Fraktionierungsparametern zur Reduktion der Neurotoxizität zurückgegriffen werden muss.

Strategies for reduction of late effects after re-irradiation of the central nervous system

Background: Current models of the pathogenesis of radiation myelopathy provide a rationale for prevention of this complication by application of growth factors. Therefore, we tested whether insulin-like growth factor-1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) influence the radiation tolerance of the cervical spinal cord of rats.

Material and Methods: The cervical spinal cord of adult Fisher F-344 rats was irradiated with two single fractions to cumulative doses of 30–42 Gy (16 Gy plus 14–26 Gy). A continuous intrathecal infusion of bFGF, PDGF, VEGF or saline was administered

concomitant to radiation into the cisterna magna. In additional experiments rats received IGF-1 subcutaneously or IGF-1 plus amifostine. All animals were followed until they developed signs of myelopathy or reached the maximum follow-up of 12 months. Post mortem histopathological examinations of the spinal cord were performed.

Results: We determined effective dose levels for each individual growth factor. Protection was observed with monotherapy as well as combination treatment (IGF-1 plus amifostine). It appears that growth factors have to be present at the time of radiation treatment to achieve such protective effects.

Conclusion: The results suggest that brief therapeutic intervention might reduce radiation-induced neurotoxicity. Our initial findings provide a basis for further optimisation in experimental animal models. They provide realistic hope for future strategies of reducing neurotoxicity which will no longer be restricted to technical advances and use of fractionation parameters exclusively.

Einleitung

Die Strahlentherapie ist seit vielen Jahrzehnten ein integraler Bestandteil multimodaler neuroonkologischer Therapiekonzepte. Sie spielt sowohl in der Primärbehandlung als auch in der Rezidivsituation eine wichtige Rolle und kann je nach zu Grunde liegender Erkrankung mit kurativer Intention (z.B. Medulloblastom, Ependyom, Germinom), zur Prophylaxe eines Befalls des zentralen Nervensystems (ZNS) bei leukämischen Systemerkrankungen oder zur Verbesserung der Lebensqualität (und meist auch Verlängerung des Überlebens) bei derzeit nicht heilbaren Tumoren (z.B. Glioblastom, Hirnmetastasen fortgeschrittener extrakranieller Malignome) erfolgen. In Anbetracht der hohen Rezidivraten einiger ZNS-Tumoren, stellt sich immer wieder auch die Frage nach der Durchführbarkeit von Zweitbestrahlungen. Noch mehr als in der Primärbehandlung wird gerade in diesem Zusammenhang ein sehr sorgfältiges Abwägen der Nutzen-Risiko-Relation unabdingbar, da Zweitbestrahlungen nur selten in kurativer Intention erfolgen und da die Toleranz des gesunden Gewebes bereits reduziert ist [19]. Dadurch kann einerseits ein Kompromiss bei der Wahl des Zielvolumens und der Dosierung erforderlich werden, andererseits ist das Risiko einer strahlenbedingten Neurotoxizität auch bei Berücksichtigung strahlenbiologischer Prinzipien und Einsatz moderner Verfahren der Bestrahlungsplanung und -durchführung nicht immer zu vermeiden. Dieselbe Problematik stellt sich häufig auch bei Patienten mit extrakraniellen Tumoren, deren anatomische Lokalisation eine Mitbestrahlung von Teilen des Gehirns oder Rückenmarks erforderlich machte, und die im späteren Verlauf ein Lokalrezidiv oder einen Zweitumor entwickeln.

Neben strahlenbiologischen (Fraktionierung) und physikalisch-technischen Möglichkeiten (z.B. Volumen- und Dosisreduktion durch stereotaktische und intensitätsmodulierte Bestrahlung) zur Reduktion chronischer Strahlenspätfolgen existieren derzeit keine klinisch verfügbaren wirksamen Präventionsstrategien, z.B. auf pharmakologischer Basis. Eine der wichtigsten Spätfolgen ist die Radionekrose des Gehirns oder Rückenmarks, wobei letztere das am häufigsten benutzte experimentelle Modell darstellt. Nach heutigen Vorstellungen entsteht die Strahlenmyelopathie als Folge komplexer und dynamischer Interaktionen zwischen unterschiedlichen parenchymalen Zellpopulationen und Gefäßendothelzellen innerhalb des Rückenmarks [18, 36]. Die Latenzzeit, die der klinischen Manifestation von Schäden vorangeht, wird als aktive

Phase angesehen, während der Zytokine und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in der inter- und intrazellulären Kommunikation spielen [10], wenngleich die einzelnen Schritte auf zellulärer und molekularer Ebene noch nicht vollständig bekannt sind. Als früh auftretendes Ereignis lassen sich bereits in den ersten Stunden nach Bestrahlung Apoptosevorgänge beobachten [6, 14]. Im zervikalen Rückenmark von Ratten traten die apoptotischen Prozesse innerhalb von 24 h nach Bestrahlung in mehreren Zellpopulationen (unter Bevorzugung der Oligodendrozyten) in dosisabhängiger Weise auf [14]. Aktuelle Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass im ZNS von Mäusen nach Bestrahlung eine dosis- und zeitabhängige Apoptose von Endothelzellen auftritt [24]. Neben apoptotischen und mitotischen (oder reproduktiven) Zelluntergängen spielen auch die reduzierte proliferative Kapazität von Progenitorzellen und Alterationen im Mikromilieu, durch die die Entwicklung von Progenitorzellen fehlreguliert wird, eine Rolle (Unterbrechung der mikrovaskulären Angiogenese, Aktivierung von Mikroglia) [17].

Zusätzlich zu dem Absterben von Zellen treten noch eine große Anzahl von nicht-letalen Veränderungen in der Genexpression und in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sowie weitere funktionelle Veränderungen in praktisch allen bisher untersuchten Zelltypen innerhalb des ZNS auf [26]. Anscheinend entwickelt sich in der langdauernden Latenzphase bis zur Manifestation einer Nekrose auf der Basis interzellulärer Interaktionen und einer Störung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke ein persistierender und progredienter oxidativer Stress [36]. Da die Myelinmembran für oxidative Schäden besonders anfällig ist, könnte so das bevorzugte Auftreten strahleninduzierter Schäden in der weißen Substanz erklärt werden. Weil die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen ansteigt, würde ein solches Modell auch die spezifische Rolle des Gefäßschadens berücksichtigen [36].

Da die Pathogenese chronischer Strahlenspätfolgen in den letzten Jahren zunehmend besser charakterisiert werden konnte, eröffnen sich völlig neue rationale Therapieansätze, die von uns im Tiermodell überprüft wurden. Basierend auf den pathogenetischen Überlegungen wurde postuliert, dass therapeutische Interventionen in der Frühphase die Progression der pathologischen Veränderungen, die zu einer Strahlenmyelopathie führen, beeinflussen könnten [20]. Zunächst wurden verschiedene Ansätze mit bioreduktiven Pharmaka und Wachstumsfaktoren, die wegen ihrer anti-apoptotischen Effekte, der Stimulation von Progenitorzellen und der Induktion einer Neoangiogenese ausgewählt wurden, bei nicht-vorbestrahlten Tieren eingesetzt. Schließlich wurde die wirksamste Strategie in einem Zweitbestrahlungsexperiment getestet, das analog zur klinischen Situation vorbestrahlter Patienten mit extrakraniellen rückenmarksnahen Tumoren gestaltet wurde.

Da zum Verständnis der biologischen Grundlagen der durchgeführten Experimente unabdingbar, sollen zunächst einige Basisinformationen über die wichtigsten untersuchten Wachstumsfaktoren zusammengefasst werden. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) kann sowohl autokrine als auch parakrine und endokrine Wirkmechanismen aufweisen [5]. Es bindet an den IGF-1- und den Insulinrezeptor. Ähnlich wie andere Wachstumsfaktorrezeptoren, ist der aktivierte IGF-1-Rezeptor ein Heterodimer mit intrazytoplasmatischer Tyrosinkinaseaktivität, der mit verschiedenen sekundären Signalübertragungswegen assoziiert werden konnte. Dazu gehört auch die Mediation anti-apoptotischer Effekte über eine Inhibition der Caspase-3-Aktivität [5, 23]. IGF-1 ist wahrscheinlich während mehrerer Stadien ein wichtiger Regulator der Oligodendrozy-

tenentwicklung. Es passiert die intakte Blut-Hirnschranke als Folge eines aktiven Transports durch Endothelzellen, die, wie oligodendrogliale Progenitorzellen und Oligodendrozyten, IGF-1 Rezeptoren besitzen [16, 33] und führt z.B. auch zu einer Reduktion der Permeabilität der Blut-Hirnschranke [37].

Fibroblast growth factor (FGF)-Rezeptoren kommen in Kapillaren im Mäusegehirn vor. bFGF induzierte die Reparatur von Strahlenschäden in Endothelzellen aus Rinderaorta [8] und verhinderte eine strahleninduzierte Apoptose von Endothelzellen [13]. Pena et al. konnten nachweisen, dass drei i.v. Injektionen von bFGF 5 min vor, unmittelbar nach und 1 h nach Bestrahlung bei Mäusen (50 Gy Ganzkörperexposition) eine signifikante Reduktion apoptotischer Zellen im ZNS bewirkten [24]. Dieser Effekt betraf sowohl Endothel- als auch Gliazellen. Auch bei Dosen von 1–20 Gy wurde eine etwa 50%-ige Reduktion gefunden. In katheter-geschädigten Rattencarotiden steigerte bFGF signifikant die Replikationsrate von Endothelzellen und stimulierte das Wachstum dieser Zellen auf die geschädigte Gefäßoberfläche [15]. Positive Effekte wurden in verschiedenen Tiermodellen auch nach Gabe von bFGF bei ischämischen Hirninfarkten [11, 34] oder nach spinalem Kontusionstrauma [35] gesehen.

VEGF, ein zunächst als endothelzell-spezifisch beschriebenes Mitogen, ist ein Polypeptid-Dimer, das in vier verschiedenen Formen vorkommt (121, 165, 189 oder 206 Aminosäuren enthaltend) und eine etwa 20%-ige Homologität zu PDGF aufweist [25]. Es regelt während der Embryonalentwicklung das Wachstum und die Differenzierung des Endothels in verschiedenen Organsystemen (*de novo* Vaskulogenese aus Angioblasten) und spielt auch später eine entscheidende Rolle bei allen angiogenetischen Prozessen einschließlich des Wachstums von Tumoren. Hypoxie induziert eine starke VEGF-Produktion. Bisher wurden drei Tyrosinkinase-Rezeptoren für VEGF beschrieben: *flt-1*, *flk-1* und *flt-4*. Die Gabe von VEGF₁₆₅ (häufigste Form) führte in Tiermodellen zu Blutflussverbesserungen in ischämischen Extremitäten und Myokardinfarktarealen sowie zu einer Reduktion des Infarktolumens nach temporärem Verschluss der A. cerebri media [9]. Bei Erwachsenen findet unter normalen Umständen praktisch keine zerebrale Angiogenese statt und nur der Plexus choroideus und Zellen in der Area postrema und im Zerebellum produzieren niedrige Spiegel von VEGF oder VEGF-Rezeptor mRNA. Nach Abschluss der Angiogenese wird die VEGF-Rezeptor mRNA in kortikalen Blutgefäßen herunterreguliert [27]. Obwohl normalerweise weder der *flk-1* noch der *flt-1* Rezeptor in Endothelzellen Erwachsener nachweisbar sind, führte eine einwöchige intrazerebrale VEGF-Gabe (0,01 µg) bei erwachsenen Ratten zu einem deutlichen angiogenetischen Effekt, der durch die Gabe VEGF-neutralisierender Antikörper wieder aufgehoben wurde. Mittlerweile konnten auch für neurale Zellen proliferations- und überlebensfördernde Eigenschaften von VEGF nachgewiesen werden [29]. Ein weiterer wichtiger Effekt von VEGF ist die antiapoptotische Wirkung, die z.B. als Protektion vor strahleninduziertem Zelltod in hämatopoetischen Stammzellen und als Protektion vor Tumornekrosefaktor (TNF)- α -induziertem Zelltod in Endothelzellen größerer Gefäße nachgewiesen wurde [32]. Auch in menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen verhinderte VEGF₁₆₅ die ceramid- und nährstoffmangelinduzierte Apoptose durch Aktivierung von mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK) und Hemmung von stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) [7].

Material und Methoden

Tierhaltung

In den Experimenten wurden erwachsene weibliche Fisher F-344 Ratten (Alter 12 Wochen, Gewicht 160–190 Gramm), die von Sasco Inc., Wilmington, MA, USA, bezogen wurden, eingesetzt. Die Tiere wurden in konventionellen Unterbringungsräumen für Nagetiere in der Abteilung für Veterinärmedizin und -chirurgie des M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA, beherbergt (drei Ratten pro Käfig, Zugang zu Wasser und konventioneller Nahrung *ad libitum*). Diese Einrichtungen sind von der zuständigen Behörde, der American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care, genehmigt und werden in Übereinstimmung mit den gültigen Regeln und Standards des United States Department of Agriculture, des Department of Health and Human Services und der National Institutes of Health geführt. Die beschriebenen Experimente wurden nach einem Protokoll, das vom Institutional Animal Care and Use Committee genehmigt wurde, durchgeführt.

Bestrahlungstechnik

Eine ausführliche Beschreibung der Bestrahlungstechnik wurde bereits publiziert [2, 21]. Die Bestrahlung erfolgte über ein ventrales Stehfeld mittels eines Telekobaltgeräts (Dosisleistung ca. 0,5 Gy/min, Fokus-Haut-Abstand 70 cm). Das zervikale Rückenmark wurde mit einer Hautfeldlänge von 1,5 cm bestrahlt, dosiert wurde auf eine Tiefe von 1,3 cm, in der nach den Ergebnissen seitlicher Röntgenaufnahmen bei den hier verwendeten Ratten das Rückenmark liegt. Zur Bestrahlung wurde ein spezieller Metallkollimator benutzt, der es erlaubte den erwähnten Rückenmarksabschnitt bei acht auf dem Rücken liegenden Ratten gleichzeitig zu bestrahlen und dabei die Applikation einer signifikanten Dosis außerhalb des gewünschten Bestrahlungsfelds zu verhindern. Die Dosis betrug 16 Gy am ersten Bestrahlungstag und 14–26 Gy am zweiten Bestrahlungstag. Die Tiere wurden mit einer ebenfalls bereits detailliert beschriebenen Methode (Halothan-Inhalation) anästhesiert [1].

Applikation der Wachstumsfaktoren

Da weder publizierte noch eigene Vorerfahrungen zu den erforderlichen Dosen der Wachstumsfaktoren vorlagen, erfolgten zunächst Dosisfindungsstudien. Ein mögliches Spektrum von Dosen wurde auf der Basis der in der Einleitung erwähnten Studien zu Ischämie-Modellen und verschiedenen ZNS-Schadensmodellen ausgewählt. In den Dosisfindungsstudien erfolgte die Bestrahlung auf dem Niveau der ED₁₀₀ (16 Gy plus 20 Gy), um erste Anhaltspunkte für die Effektivität mit kleinen Gruppen von Versuchstieren zu erhalten. In Ermangelung von Daten zur Penetration in das ZNS wurden PDGF, bFGF und VEGF intrathekal appliziert.

Für die intrathekale Infusion von PDGF, bFGF, VEGF oder NaCl erfolgte eine Inzision über dem Occiput und der Nackenregion, die subkutan stumpf bis zum Rücken erweitert wurde, um eine osmotische Pumpe aufzunehmen. Dann wurde ein Bohrloch in der Schädelkalotte angelegt. Durch dieses Bohrloch wurde eine Metallkanüle von etwa 6 mm Länge in die cisterna magna eingeführt. Ein Polyethylenkatheter verband die Kanüle mit der Pumpe Modell Alzet 2ML1 (Alza Corp., Palo Alto, CA, USA), die ein Fassungsvermögen von 2 ml aufweist. Vor der Implantation wurden die Pumpen gemäß

den Empfehlungen des Herstellers für 24 h bei 37 °C in einer sterilen NaCl-Lösung inkubiert. Kanüle und Pumpe wurden nach Ende der Behandlung explantiert. Als bioaktive Substanz wurde Amifostin intrathekal injiziert, das in früheren Experimenten eine gewisse ZNS-Protektion erkennen ließ [30]. Jeweils neun Ratten erhielten 33 oder 36 Gy (Intervall 24 h) und 30–60 min vor jeder Fraktion 0,3 mg Amifostin (WR2721). Frühere Biodistributionsdaten zeigten, dass die höchsten Konzentrationen von WR2721 im Hirnstamm und im zervikalen Rückenmark gemessen wurden [31]. IGF-1 wurde einmal täglich subkutan injiziert, da es die Blut-Hirnschranke passiert und von anderen Autoren bezüglich der Pharmakokinetik gut untersucht wurde.

Nachbeobachtung und Statistik

Nach der Therapie wurden die Ratten dreimal wöchentlich auf neurologische Auffälligkeiten untersucht. Das Auftreten von Paresen innerhalb von 12 Monaten nach der letzten Bestrahlung wurde als Endpunkt der Studie festgelegt. Tiere, die solche Symptome zeigten, unter schweren interkurrenten Erkrankungen, wie z.B. Tumoren, litten oder die maximale Nachbeobachtungszeit von 12 Monaten erreicht hatten, wurden am Folgetag in einer CO₂-Kammer euthanasiert und für histopathologische Untersuchungen präpariert. Hierzu wurden Kopf, HWS und BWS *en bloc* entnommen, direkt in Formalin fixiert und nachfolgend dekalzifiziert. Dann wurden HE-Färbungen der Präparate angefertigt, die von einem Veterinärpathologen ausgewertet wurden, um das Vorliegen einer Myelopathie histologisch zu bestätigen.

Die Dosis-Effekt-Kurven in den gezeigten Abbildungen wurden durch eine Probit-Regressionsanalyse ermittelt. Hierfür wurde der Anteil an Tieren, die eine histologisch verifizierte Myelopathie entwickelt hatten, ins Verhältnis zur Anzahl an Tieren in der jeweiligen Dosisgruppe gesetzt. Ratten, die aus anderen Gründen bis zum Zeitpunkt des letzten Auftretens eines Myelopathiefalles verstarben, wurden hierbei nicht berücksichtigt. Interkurrente Todesfälle wurden in die aktuarische Auswertung nach der Kaplan-Meier Methode eingeschlossen. Der Startpunkt aller Berechnungen war das Datum der letzten Bestrahlung, der Endpunkt das Todesdatum. Zum Vergleich der Überlebenskurven diente der log-rank-Test.

Ergebnisse

Dosisfindungsstudien der Wachstumsfaktoren

Tabelle 1 zeigt exemplarisch die Dosisfindungsstudie für IGF-1. Auch für die anderen Wachstumsfaktoren konnten Dosen ermittelt werden, die die Entstehung einer Myelopathie beeinflussten. Generell lagen diese Dosen niedriger als erwartet. Bei hohen Dosen von VEGF und PDGF konnte interessanterweise eine Verkürzung der Latenzzeit bis zum Auftreten einer Myelopathie beobachtet werden.

Dosis-Effekt-Beziehungen der Wachstumsfaktoren

Nach Festlegung der geeigneten Dosis wurde eine größere Anzahl von Tieren mit dieser Dosis des jeweiligen Wachstumsfaktors behandelt, wobei unterschiedliche Bestrahlungsdosen zum Einsatz kamen (16 Gy plus 14–26 Gy), um die ED₅₀ für den Protektionsansatz zu bestimmen. Parallel wurden entweder intrathekal oder subkutan mit

Tab. 1: Dosisfindungsstudie für die tägliche subkutane Injektion von IGF-1 bei Bestrahlung des zervikalen Rückenmarks mit 16 Gy plus 20 Gy (Intervall zwischen den Bestrahlungen 24 h, Beginn der Injektionen 24 h vor der ersten Bestrahlung).

IGF-1 Dosis	Mediane Latenz	Myelopathie-Inzidenz
NaCl Kontrolle	143 Tage	100%
700 µg	183 Tage	100%
200 µg	341 Tage	56%
50 µg	nicht erreicht	21%
10 µg	nicht erreicht	25%
1 µg	176 Tage	67%

NaCl-behandelte Kontrolltiere mit 16 Gy plus 14–20 Gy bestrahlt. Für diese Kontrollgruppen lag die ED₅₀ sehr konstant bei jeweils 16 Gy plus 18 Gy (95% Konfidenzintervall 17,3–18,4 Gy). Die Dosis-Effektkurve für PDGF ergab eine ED₅₀ von 16 Gy plus 19,6 Gy (95% Konfidenzintervall 18,7–20,5 Gy, $p = 0,001$). Der Dosis-Modifikationsfaktor liegt im Bereich von 1,1. Ähnliche Ergebnisse deuten sich auch für die anderen Wachstumsfaktoren an, deren Untersuchung über den gesamten Dosisbereich jedoch noch nicht abgeschlossen ist.

Verzögerte Behandlung mit Wachstumsfaktoren

Um die Strategie der Neoangiogenese in der durch eine chronisch-progrediente Ischämie charakterisierten Latenzphase zu untersuchen, erfolgten Experimente mit VEGF, bFGF und PDGF. Die Dosen entsprachen den von anderen Autoren für das ZNS mitgeteilten [11, 15, 24, 29]. Die intrathekale Applikation erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach 8–16 Wochen nach der zweiten Bestrahlung. Die Infusionsdauer betrug jeweils zwei Wochen mit Implantation einer frisch gefüllten Pumpe nach der Hälfte der Zeit, um einer Inaktivierung der Wachstumsfaktoren durch die lange Verweilzeit in der körperwarmen Umgebung entgegenzuwirken. Eine längere Behandlung mit weiteren operativen Eingriffen erschien aus Toxizitätsgründen nicht vertretbar. In keinem dieser Experimente ließ sich eine signifikante Protektion nachweisen.

Amifostin intrathekal

Bei einer Dosis von 0,3 mg pro Injektion waren in den eigenen Gruppen keine erkennbaren Toxizitäten zu beobachten. Für beide Bestrahlungsdosen bestand eine signifikante Verlängerung der medianen Latenzzeit. Letztere betrug in der 36-Gy Gruppe 159 Tage (Spanne 147–162 Tage, +11% im Vergleich zu NaCl, $p = 0,03$) und in der 33-Gy Gruppe 187 Tage (Spanne 159–198 Tage, $p = 0,05$), ohne dass jedoch die Inzidenz abnahm. Somit war keine echte Protektion zu verifizieren, wie sie in den erwähnten früheren Experimenten [30] berichtet worden war.

Zweitbestrahlung und Kombinationstherapie mit IGF-1 und Amifostin

Auf Grund der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen wurde in diesem Experiment eine Kombination von Amifostin und IGF-1 appliziert. Hierfür kam ein an klinische Situationen angelehntes Design zum Einsatz, bei dem eine Erstbestrahlung (Einzeitbestrahlung mit 16 Gy, die nicht zu fassbaren Schäden führt und 75% der ED_{50} entspricht) von einer Zweitbestrahlung mit 17–25 Gy (Einzeitbestrahlung nach einem Intervall von 21 Wochen, in dem ca. 35% Erholung ablaufen) gefolgt wurde. Eine Kontrollgruppe von 31 Tieren erhielt 30–60 min vor der Zweitbestrahlung eine intrathekale NaCl-Injektion, während die Behandlungsgruppe von 59 Tieren einmalig 0,3 mg Amifostin erhielt. Zusätzlich erhielten diese 59 Ratten alle 24 h 700 μ g IGF-1 subkutan, beginnend 24 h vor und endend 48 h nach der Zweitbestrahlung. Die Nachbeobachtungszeit betrug 12 Monate ab der Zweitbestrahlung. Zum Zeitpunkt dieses Experiments war noch nicht bekannt, dass bei nicht-vorbestrahlten Tieren eine niedrigere IGF-1 Dosis noch wirksamer sein würde. Die Dosis-Effektkurven sind in Abbildung 1 dargestellt. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch signifikant, wobei sich ein Anstieg der ED_{50} um zirka 30% ergab. Der flache Verlauf der Kurve in der Behandlungsgruppe und das weite obere Konfidenzintervall resultieren aus der Tatsache, dass der gewählte Dosisbereich nicht ganz ausreichte, um Myelopathieraten über 75% zu erzeugen. Letztlich war der protektive Effekt ausgeprägter als erwartet, wodurch diese Artefakte der statistischen Analyse entstanden. Auch in der aktuarischen Darstellung (Abb. 2), die nicht mit diesem Problem behaftet ist, ergibt sich ein deutlicher Vorteil für die Behandlungsgruppe, deren Risiko einer Myelopathie um mehr als 50% reduziert war.

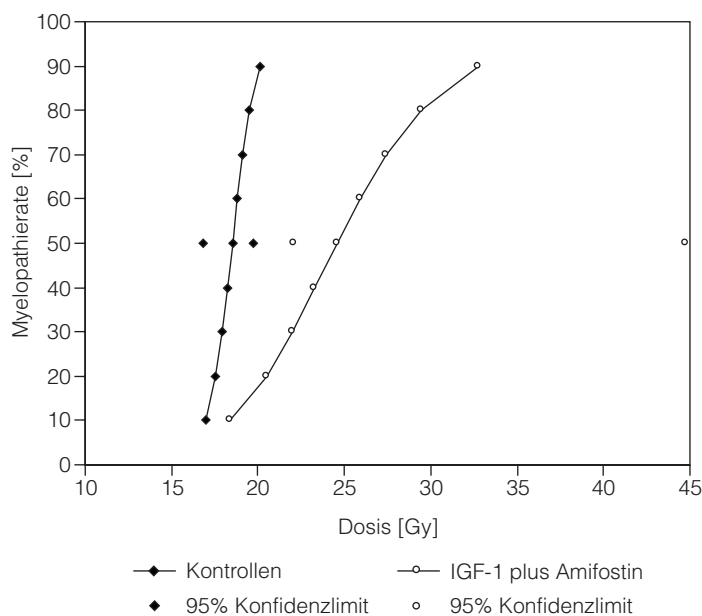


Abb. 1: Dosis-Effekt-Kurve der NaCl-Kontrollgruppe (◆) versus IGF-1 700 μ g subkutan plus Amifostin 0,3 mg intrathekal (◊) begleitend zur Zweitbestrahlung.

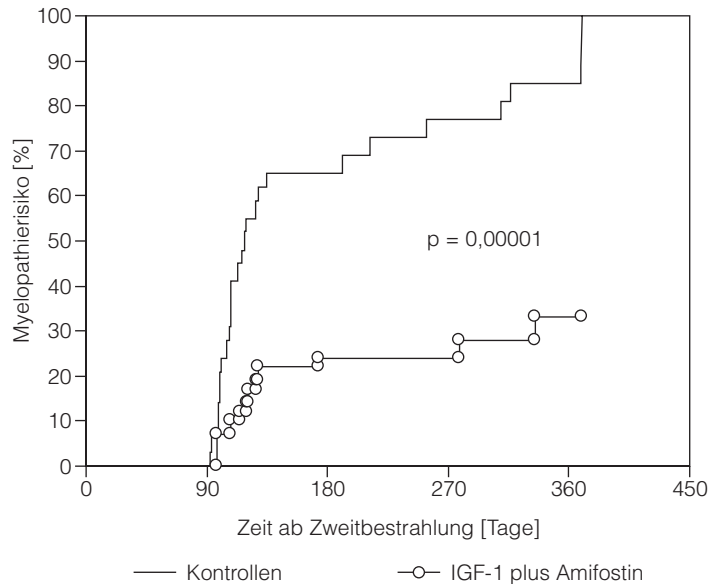


Abb. 2: Kaplan-Meier-Schätzer der Myelopathiewahrscheinlichkeit (IGF-1 700 µg subkutan plus Amifostin 0,3 mg intrathekal versus NaCl begleitend zur Zweitbestrahlung).

In allen Gruppen (NaCl, verschiedene Wachstumsfaktoren, Zweitbestrahlung) entwickelte die Mehrzahl der Ratten bei einer Nachbeobachtungszeit von 8–12 Monaten strahleninduzierte Tumoren (Sarkome, Gliome, Mammakarzinome). In der aktuarischen Auswertung war die Tumorzinzidenz unabhängig von der Behandlungsgruppe.

Diskussion

Ziel der Tierversuche war es, eine bisher nicht untersuchte Strategie zur Prävention strahleninduzierter Myelopathien mittels Gabe von Wachstumsfaktoren zu evaluieren. In Relation zu den zahlreichen Studien über die Strahlensensibilität des Rückenmarks von Ratten in der Weltliteratur waren ED_{50} , Latenzzeit und Histologie der Kontrolltiere gut mit den anderen Ergebnissen vergleichbar [2, 12, 28]. Auch das Phänomen der strahleninduzierten Tumorentstehung trat in der vorbeschriebenen Größenordnung auf. Die Applikation der Wachstumsfaktoren begann meist 24 h vor der ersten Bestrahlung und wurde bis 48 h nach der zweiten Bestrahlung kontinuierlich fortgesetzt, um ihre positiven Effekte auf die Reparatur potenziell letaler und subletaler Schäden sowie die Apoptose auszunutzen. Die Dosen basierten auf verschiedenen publizierten Tiermodellen [11, 15, 34, 35, 37]. Stellt man die Abläufe nach Bestrahlung eines Gewebes in einem sehr vereinfachten Schema dar, so kann davon ausgegangen werden, dass ein bestimmter Prozentsatz der Zellen dieses Gewebes durch eine Bestrahlung mit einer gegebenen Dosis absterben wird. Unter der Voraussetzung einer vergleichbaren intrinsischen Strahlensensibilität hängt dieser Prozentsatz u.a. vom Proliferationsstatus ab. Nach einer Bestrahlung kommt es normalerweise in vielen Zelltypen zu einer p53-induzierten Arretierung des Zellzyklus (G1-Arrest), in der z.B. die Reparatur strahlenindu-

zierter Läsionen ablaufen kann. Werden in dieser Zeit zellzyklus-aktivierende Signale vermittelt, etwa durch Zugabe von Wachstumsfaktoren wie PDGF oder VEGF, kommt es zur Apoptose geschädigter Zellen. Dadurch wäre die beobachtete kürzere Latenzzeit bei hochdosierter Gabe dieser Faktoren erklärbar. Aus Abbildung 1 ergeben sich Hinweise, dass mit einer richtig dosierten Monotherapie ein dosismodifizierender Faktor von 1,1 erreicht werden kann. Die Ergebnisse können als indirekte Bestätigung unserer These, dass therapeutische Interventionen in der Frühphase das Entstehen der pathologischen Veränderungen, die später zur Nekrose führen, verhindern bzw. aufhalten können, gesehen werden. Verglichen mit einer Monotherapie sind durch die Kombinationstherapie im Rahmen der Zweitbestrahlung anscheinend weitere Verbesserungen möglich. Dies erscheint generell ein wichtiger Hinweis für das Gebiet der Radioprotektion von Normalgeweben zu sein.

Weitere Daten von strahlentherapeutischem Interesse wurden von Okunieff et al. publiziert [22]. In diesen Experimenten erhielten Mäuse eine Ganzkörperbestrahlung und entweder bFGF oder VEGF zur Protektion der Dünndarmkrypten. Beide Wachstumsfaktoren erhöhten die Zahl überlebender Zellen 3,5 Tage nach Applikation von 14 Gy signifikant. Die $LD_{50/6}$ als Maß für Todesfälle infolge eines gastro-intestinalen Syndroms stieg in allen mit Wachstumsfaktoren behandelten Gruppen signifikant um 6–13% an, wobei der ausgeprägteste Effekt mit 6 µg bFGF appliziert 24 h vor Bestrahlung erzielt wurde. In allen Gruppen fand sich eine signifikante Abnahme apoptotischer Vorgänge [22].

Von Ding et al. wurde untersucht, ob experimentelle Tumoren (zwei Sarkome und ein Plattenepithelkarzinom: Rif-1, KHT und SCC-VII), die Mäusen intramuskulär implantiert wurden, durch eine bFGF-Gabe schneller wachsen und schlechter auf eine Strahlentherapie ansprechen [3]. Es wurden zwei Injektionen von 3 µg FGF-2 i.v. entweder nach der Tumorimplantation oder 24 h bzw. 4 h vor der Einzeitbestrahlung der Tumoren gegeben. Kontrollgruppen erhielten NaCl-Injektionen. Festzuhalten ist, dass sich das Tumorstadium innerhalb von 2 Wochen nach bFGF bzw. NaCl-Gabe zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Die Verteilung der Tumorzellen im Zellzyklus und die S-Phase Fraktion sowie die strahleninduzierte Wachstumsverzögerung waren ebenfalls gut vergleichbar. Diese Experimente sind von großem Interesse, da sie das Argument einer negativen Beeinflussung von Tumoren durch Wachstumsfaktoren, die mit dem Ziel der Normalgewebeprotektion appliziert werden, entkräften und im Gegenteil darauf hindeuten, dass sich ein breiteres therapeutisches Fenster durch eine solche Strategie ergeben könnte. Ein elegantes Experiment mit Zellen eines humanen Endometriumkarzinoms (HEC-1-B), die stabil mit dem bFGF-Gen transfiziert wurden, das sich unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-responsiven Promoters befand, zeigte, dass das Wachstum von Tumoren, die bereits in Nacktmäusen etabliert waren, kaum noch von der bFGF-Produktion abhing [4]. Dagegen wuchsen gerade erst inokulierte Tumoren deutlich langsamer, wenn die bFGF-Expression durch orale Tetrazyklingabe ausgeschaltet wurde. Die hier diskutierten Strategien eröffnen Perspektiven zur weiteren Optimierung im Tierversuch und lassen die Hoffnung realistisch erscheinen, dass in absehbarer Zeit nicht mehr ausschließlich auf technische Möglichkeiten und die Berücksichtigung von Fraktionierungsparametern zur Reduktion der iatrogenen Neurotoxizität zurückgegriffen werden muss.

Literatur

- [1] Ang, K.K.; van der Kogel, A.J.; van der Schueren, E.: Inhalation anaesthesia in experimental radiotherapy: a reliable and time-saving system for multifractionation studies in a clinical department. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8 (1982) 145–148
- [2] Ang, K.K.; Jiang, G.L.; Guttenberger, R. et al.: Impact of spinal cord repair kinetics on the practice of altered fractionation schedules. *Radiother. Oncol.* 25 (1992) 287–294
- [3] Ding, I.; Huang, K.; Snyder, M.L. et al.: Tumor growth and radiosensitivity in mice given myeloprotective doses of fibroblast growth factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 1399–1404
- [4] Giavazzi, R.; Giuliani, R.; Coltrini, D. et al.: Modulation of tumor angiogenesis by conditional expression of fibroblast growth factor-2 affects early but not established tumors. *Cancer Res.* 61 (2001) 309–317
- [5] Grothey, A.; Voigt, W.; Schöber, C. et al.: The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125 (1999) 166–173
- [6] Gu, C.; Casaccia-Bonnel, P.; Srinivasan, A.; Chao, M.V.: Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J. Neurosci.* 19 (1999) 3043–3049
- [7] Gupta, K.; Kshirsagar, S.; Li, W.; Gui, L. et al.: VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp. Cell. Res.* 247 (1999) 495–504
- [8] Haimovitz-Friedman, A.; Vlodaysky, I.; Chaudhuri, A. et al.: Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. *Cancer Res.* 51 (1991) 2552–2558
- [9] Hayashi, T.; Abe, K.; Itoyama, Y.: Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18 (1998) 887–895
- [10] Herskind, C.; Bamberg, M.; Rodemann, H.P.: The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* 174 (supl. III) (1998) 12–15
- [11] Jiang, N.; Finklestein, S.P.; Do, T. et al.: Delayed intravenous administration of basic fibroblast growth factor (bFGF) reduces infarct volume in a model of focal cerebral ischemia/reperfusion in the rat. *J. Neurol. Sci.* 139 (1996) 173–179
- [12] Landuyt, W.; Fowler, J.; Ruifrok, A.C. et al.: Kinetics of repair in the spinal cord of the rat. *Radiother. Oncol.* 45 (1997) 55–62
- [13] Langley, R.E.; Bump, E.A.; Quartuccio, S.G. et al.: Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. *Br. J. Cancer* 75 (1997) 666–672
- [14] Li, Y.Q.; Jay, V.; Wong, C.S.: Oligodendrocytes in the adult rat spinal cord undergo radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 56 (1996) 5417–5422

- [15] Lindner, V.; Majack, R.A.; Reidy, M.A.: Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. *J. Clin. Invest.* 85 (1990) 2004–2008
- [16] Mc Morris, F.A.; Mozell, R.L.; Carson, M.J.: Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 692 (1993) 321–334
- [17] Monje, M.L.; Mizumatsu, S.; Fike, J.R.; Palmer, T.D.: Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature Med.* 8 (2002) 928–930
- [18] Nieder, C.; Ataman, F.; Price, R.E.; Ang, K.K.: Biologische Präventions- und/oder Therapiemöglichkeiten der Strahlenmyelopathie. *Strahlenther. Onkol.* 175 (1999) 437–443
- [19] Nieder, C.; Milas, L.; Ang, K.K.: Tissue tolerance to reirradiation. *Semin. Radiat. Oncol.* 10 (2000) 200–209
- [20] Nieder, C.; Andratschke, N.; Price, R.E.; Rivera, B.; Ang, K.K.: Innovative prevention strategies for radiation necrosis of the central nervous system. *Anticancer Res.* 22 (2002) 1017–1023
- [21] Nieder, C.; Price, R.E.; Rivera, B.; Andratschke, N.; Ang, K.K.: Experimentelle Daten zum Einsatz von insulin-like growth factor-1 und basic fibroblast growth factor zur Prävention einer Strahlenmyelopathie. *Strahlenther. Onkol.* 178 (2002) 147–152
- [22] Okunieff, P.; Mester, W.; Wang, J. et al.: In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice. *Radiat. Res.* 150 (1998) 204–211
- [23] Parrizas, M.; Saltiel, A.R.; LeRoith, D.: Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 154–161
- [24] Pena, L.A.; Fuks, Z.; Kolesnick, R.N.: Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* 60 (2000) 321–327
- [25] Plate, K.; Warnke, P.C.: Vascular endothelial growth factor. *J. Neuro. Oncol.* 35 (1997) 365–372
- [26] Raju, U.; Gumin, G.J.; Tofilon, P.J.: Radiation-induced transcription factor activation in the rat cerebral cortex. *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (2000) 1045–1053
- [27] Rosenstein, J.M.; Mani, N.; Silverman, W.F. et al.: Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7086–7091
- [28] Ruifrok, A.C.; Stephens, L.C.; van der Kogel, A.J.: Radiation response of the rat cervical spinal cord after irradiation at different ages: tolerance, latency and pathology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29 (1994) 73–79

-
- [29] Sondell, M.; Lundborg, G.; Kanje, M.: Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 19 (1999) 5731–5740
- [30] Spence, A.M.; Krohn, K.A.; Edmondson, S.W.: Radioprotection in rat spinal cord with WR-2721 following cerebral lateral intraventricular injection. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12 (1986) 1479–1482
- [31] Spence, A.M.; Edmondson, S.W.; Krohn, K.A. et al.: Toxicity and biodistribution of the radioprotectors, WR2721, WR77913, and WR3689, in the CNS following intraventricular or intracisternal administration. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12 (1986) 1653–1660
- [32] Spyridopoulos, I.; Brogi, E.; Kearney, M. et al.: Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 291 (1997) 321–330
- [33] Stong, D.B.; Raskin, R.: Effects of multiple subcutaneous doses of rhIGF-1 on total and free IGF-1 levels and blood glucose in humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 692 (1993) 317–320
- [34] Tanaka, R.; Miyasaka, Y.; Yada, K. et al.: Basic fibroblast growth factor increases regional cerebral blood flow and reduces infarct size after experimental ischemia in a rat model. *Stroke* 26 (1995) 2154–2158
- [35] Teng, Y.D.; Mocchetti, I.; Taveira-DaSilva, A.M. et al.: Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury. *J. Neurosci.* 19 (1999) 7037–7047
- [36] Tofilon, P.J.; Fike, J.R.: The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. *Radiat. Res.* 153 (2000) 357–370
- [37] Yao, D.L.; Liu, X.; Hudson, L.D.; Webster, H.D.: Insulin-like growth factor I treatment reduces demyelination and up-regulates gene expression of myelin-related proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 6190–6194