

Aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik  
des Klinikums rechts der Isar  
Technische Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke

**Histopathologische Evaluation der Toxizität des Alpha-Emitter-Immunkonjugats Bi-213-anti-EGFR-mAk an Harnblasen und Nieren von Swiss nu/nu-Mäusen nach intravesikaler Instillation**

Felix Müller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitschi Schmidtke
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger

Die Dissertation wurde am 13.06.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.05.2014 angenommen.

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	6
1.1 Harnblasenkarzinom .....	6
1.1.1 Häufigkeit und Ätiologie.....	6
1.1.2 Histologie, Stadien und Klassifikation .....	6
1.1.3 Diagnose und Therapie .....	7
1.2 Radioimmuntherapie .....	8
1.3 Problemstellung .....	10
2. Literaturübersicht .....	12
2.1 Grundlagen zum Einsatz von Alpha-Strahlern in der Radioimmuntherapie .....	12
2.2 Strahlenpathologie der Harnblase .....	15
2.2.1 Histologischer Aufbau der Harnblase.....	15
2.2.1 Histopathologische Befunde der Harnblase nach Bestrahlung.....	16
2.2.2 Pathogenese der Strahlenwirkungen .....	17
2.3 Strahlenpathologie der Niere.....	19
2.3.1 Histologischer Aufbau der Niere .....	19
2.3.2 Histopathologische Befunde der Niere nach Bestrahlung bzw. Radioimmuntherapie mit Alpha-Emittern .....	19
2.4 Übertritt von intravesikal applizierten Substanzen in den Kreislauf nach transurethraler Resektion .....	21
2.5 Biodistribution von Radioimmunkonjugaten in der Niere nach i.v.- bzw. i.p.-Injektion .....	21
2.6 Biodistribution von Bi-213-anti-EGFR-mAk nach intravesikaler Applikation .....	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	24
3.2 Geräte und Software.....	24
3.3 Tiere zur histologischen Untersuchungen der Toxizität.....	25

3.4 Histologie .....	26
3.4.1 Fixierung, Entwässerung, Einbettung und Schnitt .....	26
3.4.2 Entfernung des Paraffins, Färbung, Einbettung und Begutachtung.....	27
4. Ergebnisse .....	28
4.1 Histopathologische Befunde der Harnblasen.....	28
4.2 Histopathologische Befunde der Nieren .....	34
5. Diskussion .....	39
5.1 Histopathologie der Harnblase nach Bi-213-anti-EGFR-mAk-Instillation.....	39
5.2 Histopathologie der Niere nach Bi-213-anti-EGFR-mAk-Instillation .....	42
5.3 Schlussfolgerungen .....	43
6. Zusammenfassung .....	45
7. Danksagung.....	48
8. Abkürzungsverzeichnis.....	49
9. Abbildungsverzeichnis.....	50
10. Tabellenverzeichnis.....	52
11. Literaturverzeichnis .....	53
12. Lebenslauf.....	58



# **1. Einleitung**

## **1.1 Harnblasenkarzinom**

### **1.1.1 Häufigkeit und Ätiologie**

Das Harnblasenkarzinom ist ein häufiger maligner Tumor: Unter den Männern ist das Blasenkarzinom die vierthäufigste, unter den Frauen die zehnthäufigste Neoplasie. So erkrankten 2006 in Deutschland über 27 000 Menschen an diesem Tumor (Husmann, 2010). Betroffen sind vor allem ältere Patienten - das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 72 Jahren, für Frauen bei 74 Jahren (Husmann, 2010). Ätiologisch spielen in vielen Fällen Toxine eine Rolle. Hierbei ist vor allem der Nikotinkonsum hervorzuheben: Bei Männern werden 48%, bei Frauen 28% der durch ein Harnblasenkarzinom bedingten Todesfälle durch Rauchen verursacht (Treiber and Tumorzentrum, 2008). Neben Tabak stellen aromatische Amine eine weitere ätiologisch bedeutsame Gruppe von Toxinen dar.

### **1.1.2 Histologie, Stadien und Klassifikation**

Mit ungefähr 90% der Fälle ist in Europa und Nordamerika das Urothelkarzinom unter den Harnblasenkarzinomen deutlich dominierend; Plattenepithelkarzinome (5%) und Adenokarzinome (0,5 – 2%) sind demgegenüber weitaus seltener (Schmelz et al., 2006). Blasenkarzinome werden hinsichtlich zweier Kriterien klassifiziert. Erstens hinsichtlich ihrer genetischen Stabilität: Genetisch stabile Tumoren werden als „low grade“ maligne und genetisch instabile Tumoren als „high grade“ maligne bezeichnet, wobei von einem „high grade“ Tumor ein signifikant höheres Ausmaß an Progression zu erwarten ist. Eine besondere Form stellt das Carcinoma in situ dar, das zwar intraepithelial lokalisiert ist, aber einen hohen Malignitätsgrad aufweist. Die zweite Klassifikation bezieht sich auf die Ausbreitung des Tumors. Unterschieden wird das nicht-muskelinvasive, das muskelinvasive und das metastasierte Stadium – wobei sich Therapie und Prognose dieser Stadien unterscheiden. Die Erstdiagnose wird bei 75 – 85% aller Patienten in einem nicht-muskelinvasiven Stadium gestellt, in dem der Tumor also definitionsgemäß noch auf Mukosa oder Submukosa beschränkt ist – dies entspricht den Stadien pTis (Carcinoma in situ) pTa (nicht-invasiver, papillärer Tumor) oder pT1 (Tumor infiltriert die Basalmembran) (Babjuk et al., 2011). Wird die Diagnose erst in späteren Stadien gestellt, hat der

Tumor bereits die Muskelschicht der Blase (T2), das perivesikale Fettgewebe (T3) oder umliegende Organe (T4) infiltriert.

### **1.1.3 Diagnose und Therapie**

Den Goldstandard für die Diagnose des Blasenkarzinoms stellt die Zystoskopie dar. Hierbei wird eine Biopsie entnommen, die der definitiven Diagnosesicherung dient und die Frage nach der Infiltrationstiefe klären soll. Als erster therapeutischer Schritt schließt sich der Zystoskopie die transurethrale Resektion (TUR) an, bei der der Tumor möglichst vollständig entfernt wird. Die weitere Behandlungsstrategie ist abhängig vom jeweiligen histologischen Befund (Tumorart, Differenzierung, Infiltrationstiefe) sowie den Ergebnissen der obligaten Staginguntersuchung. Bei lokal-invasiven Karzinomen (T2, T3a, T3b) ohne nachgewiesene Metastasierung ist die radikale Zystektomie die Therapie der Wahl, bei Metastasierung die systemische Chemotherapie. Allerdings ist die Prognose bei einer Fernmetastasierung mit einer Überlebensrate von meist weniger als einem Jahr infaust (Stief et al., 2006).

Nach TUR als dem ersten therapeutischen Schritt bei nicht-muskelinvasiven Stadien kommt es durch abgeschilferte Tumorzellen und verbliebene Tumorreste häufig zu einem Rezidiv bzw. Tumorprogress mit entsprechend schlechterer Prognose, wobei insbesondere bei „high grade“-Tumoren mit ca. 80% das Risiko eines Rezidivs bzw. mit 50-65% das Risiko des Übergangs in ein muskelinvasives Stadium hoch ist (Soloway et al., 2002). Das Rezidiv- und Progressionsrisiko kann durch die intravesikale Instillation von Zytostatika oder Immuntherapeutika gesenkt werden. Verwendet werden hierbei vor allem Chemotherapeutika wie Mitomycin C und Epirubicin oder auch Bacillus Calmette-Guèrin (BCG), wobei die Chemotherapie aufgrund geringerer Nebenwirkungen bevorzugt wird und BCG nur bei Patienten mit high-risk-Tumoren zur Anwendung kommt. Allerdings sind die Erfolge dieser Therapien begrenzt. Während einige Autoren längerfristig keinen Nutzen der intravesikalen Chemotherapie hinsichtlich der Rezidiv- und der Progressionsrate gegenüber der alleinigen TUR feststellen können (Lamm et al., 1995), sehen andere zumindest eine geringgradige Senkung des Rezidivrisikos um 6%, aber ebenfalls keine Verhinderung der Progression (Pawinski et al., 1996). Die Therapie mit BCG ist im Vergleich zur Chemotherapie effektiver, aber auch nebenwirkungsreicher. So wurde bei einem medianen Follow-up von 26 Monaten von einer Senkung der Rezidivrate auf 38,6% und der Progressionsrate auf 7,7% im Vergleich zu 46,4% bzw. 9,4% bei Mitomycin C berichtet (Bohle et al., 2003). Bei den

Nebenwirkungen ist neben Zystitis, Prostatitis und Epididymoorchitis vor allem die seltene, aber schwerwiegende BCG-Sepsis hervorzuheben.

Vor dem Hintergrund dieser unbefriedigenden Ergebnisse scheinen effektivere Ansätze in der Therapie des Harnblasenkarzinoms sehr wünschenswert.

## **1.2 Radioimmuntherapie**

Ein zentrales Problem der onkologischen Therapie besteht darin, dass es sich bei Tumorzellen um körpereigene Zellen handelt, die sich nur geringfügig von den übrigen Zellen des Organismus unterscheiden. Mit verschiedenen Ansätzen wird versucht, Tumorzellen möglichst gezielt abzutöten und so eine Schonung des gesunden Gewebes zu erreichen. Die Radioimmuntherapie (RIT) stellt einen neuen Versuch zur selektiven Eradikation von Tumorzellen dar. Bei der RIT binden Antikörper an Strukturen von Tumorzellen, die idealerweise auf diesen Zellen spezifisch oder zumindest im Vergleich zu nicht entarteten Zellen vermehrt vorkommen. Die Antikörper dienen hierbei als Vehikel, durch das ein Radionuklid am Zielort deponiert und so eine näherungsweise selektive Bestrahlung der Tumorzellen bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes ermöglicht wird.

Im Falle des Harnblasenkarzinoms stellt die Radioimmuntherapie einen vielversprechenden Ansatz dar, um die hohen Rezidivraten nach TUR zu senken. Als Angriffspunkt für einen Antikörper eignet sich der EGF-Rezeptor, da dieser bei bis zu 86% aller Urothelkarzinome überexprimiert wird (Cheng et al., 2002, Rotterud et al., 2005). Rezidive nach TUR sind durch vereinzelte abgeschilferte bzw. verbliebene Karzinomzellen in der Blasenwand bedingt. Für eine effektive Abtötung von einzelnen Tumorzellen bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes bietet sich aufgrund seiner hohen zytotoxischen Potenz bei geringer Reichweite ein Alpha-Emitter an. Obwohl in der Radioimmuntherapie meist Beta-Strahler verwendet wurden, sind auch Alpha-Strahler häufiger eingesetzt worden. Die erste klinische Studie mit einem Alpha-Strahler wurde von Jurcic et al. durchgeführt, wobei ein Alpha-Emitter-Immunkonjugat zur Therapie der myeloischen Leukämie verwendet wurde (Jurcic et al., 2002) - zahlreiche weitere klinische Studien zu anderen Erkrankungen folgten (siehe z.B. Zalutsky et al., 2008, Allen et al., 2005, Andersson et al., 2009). Zur Senkung der Rezidivrate nach TUR des Urothelkarzinoms wurde von der eigenen Arbeitsgruppe ein monoklonaler EGFR-Antikörper mit dem Alpha-Emitter Bi-213 konjugiert und das gewonnene Bi-213-anti-EGFR-mAk-Radioimmunkonjugat im Mausmodell zur intravesikalen Radioimmuntherapie eingesetzt (Pfof et al., 2009)(Abb. 1). Verwendet wurde die humane



Blasenkarzinomzelllinie EJ28, ein stark entdifferenziertes und invasiv wachsendes Urothelkarzinom mit dem histologischen Grad III-IV, das aus einem metastasierten Primärharnblasenkarzinom eines Kaukasiers isoliert wurde und mit  $5 \times 10^5$  EGF-Rezeptoren pro Zelle eine sehr hohe EGFR-Expression aufweist. Zur Simulation des Zustands nach TUR wurde durch Kauterung eine Läsion in der Blasenwand von Swiss nu/nu-Mäusen gesetzt, anschließend erfolgte die Instillation von EJ28-Tumorzellen mit nachfolgender intravesikaler Applikation von Bi-213-anti-EGFR-mAk.

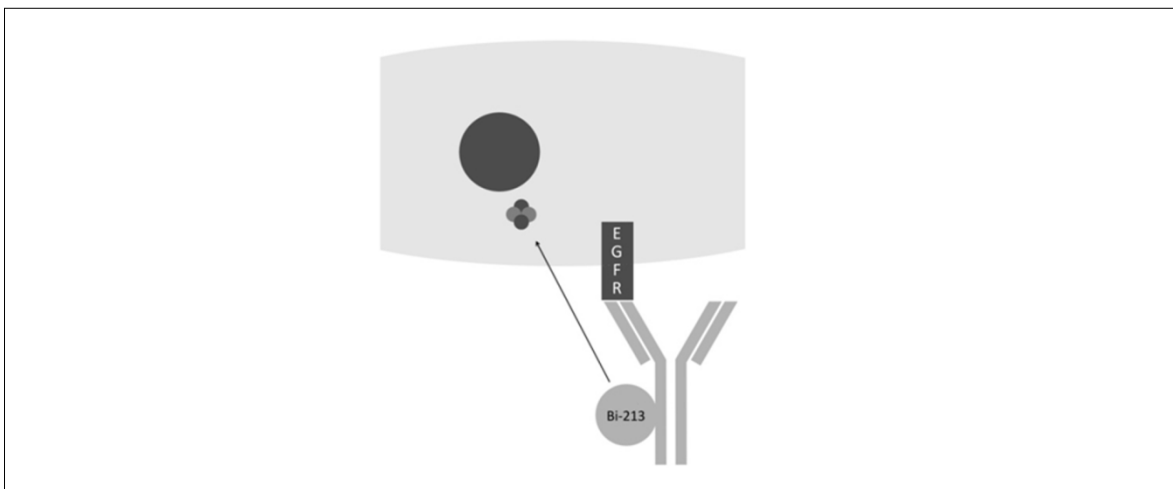


Abb. 1: Schematische Darstellung der Bindung des Radioimmunkonjugats Bi-213-anti-EGFR-mAk an den EGF-Rezeptor auf einer Urothelkarzinomzelle.

In diesem Tiermodell zeigte die Therapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk eine signifikante Verlängerung des Überlebens und war zudem dem Standardchemotherapeutikum Mitomycin C überlegen (Pfof et al., 2009). Die mediane Überlebenszeit der Kontrollgruppe betrug 41 Tage, bei intravesikaler Instillation von 40 µg Mitomycin C eine Stunde nach Tumorzellinstillation erreichten nur 40% der Tiere ein Überleben von mehr als 300 Tagen (Median: 289 Tage), während bei intravesikaler Instillation von 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk eine Stunde nach Tumorzellinstillation 90% der Tiere über 300 Tage überlebten (Median: über 300 Tage).

Neben der therapeutischen Effizienz von Bi-213-anti-EGFR-mAk ist auch eine möglichst geringe Beeinträchtigung der gesunden Harnblasenwand von großer Bedeutung. Eine Voraussetzung hierfür ist die weitgehend selektive Bindung von anti-EGFR-mAk an Urothelkarzinomzellen. Mittels Immunhistochemie, bei der sich die Bindung eines Antikörpers auf einem histologischen Präparat farblich darstellt, wurde bereits demonstriert, dass anti-EGFR-mAk sehr selektiv an xenotransplantierten EJ28-Zellen bindet (Pfof et al., 2009)(Abb. 2) und somit die Therapie mit Bi-

213-anti-EGFR-mAk eine gezielte Bestrahlung der Karzinomzellen bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes verspricht.

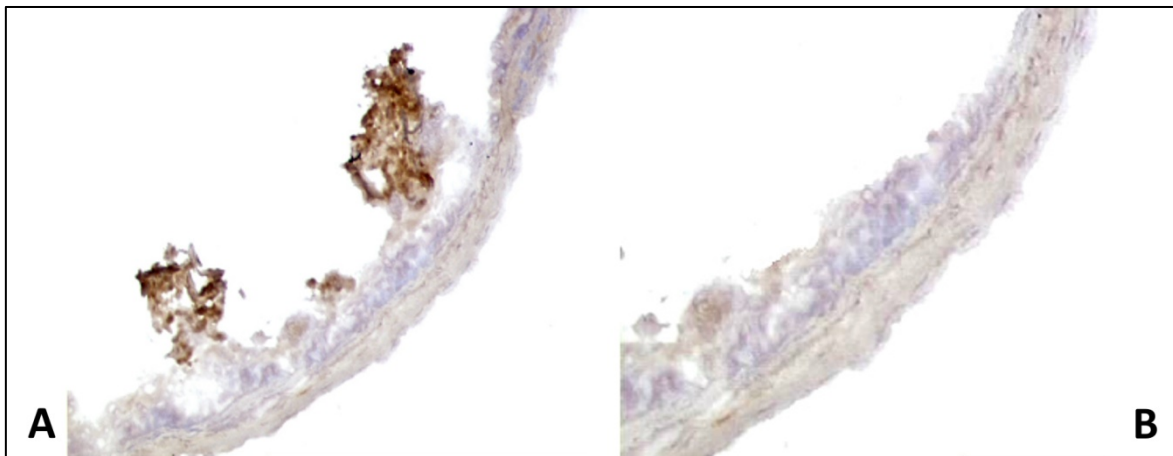


Abb. 2: A: Immunhistochemie und Hämatoxylinfärbung einer murinen Blase mit Urothelkarzinom der Blasenwand nach EJ28-Zell-Instillation. Die Bindung von anti-EGFR-mAk stellt sich bräunlich dar. B: Murine Blase ohne EJ28-Zell-Instillation. Abb. übernommen aus Pfof et al. 2009.

### 1.3 Problemstellung

Die therapeutische Effizienz der intravesikalen Therapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk zur Eradikation verbliebener Urothelkarzinomzellen nach TUR wurde im Tiermodell bereits gezeigt. Die geringe Reichweite des Alpha-Emitters Bi-213 zusammen mit der bevorzugten Bindung des verwendeten monoklonalen Antikörpers an EGFR-überexprimierende Urothelkarzinomzellen verspricht zudem eine Schonung des gesunden Gewebes. Ob und inwieweit es bei dieser Therapie zu strahleninduzierten Schäden an gesundem Gewebe kommt, ist bisher allerdings noch nicht untersucht worden. In dieser Arbeit soll daher die Toxizität der intravesikalen Applikation von Bi-213-anti-EGFR-mAk an Swiss nu/nu-Mäusen mittels Histopathologie untersucht werden.

Bei der externen Strahlentherapie pelviner Tumoren wie dem Prostata-, Rektum-, und Cervixkarzinom sind unerwünschte Effekte auf die Blase von großer klinischer Bedeutung. Während sich die akuten Nebenwirkungen meist nach einigen Monaten zurückbilden, können andere Nebenwirkungen wie z.B. Dysurie, Veränderung der Miktionsfrequenz, Harndrang, Inkontinenz, Hämaturie, Fisteln, Nekrosen und Obstruktion über lange Zeiträume bestehen bleiben (Viswanathan et al., 2010). Neben einer Strahlenbelastung der Harnblase bei intravesikaler Applikation eines Alpha-Emitter-Radioimmunkonjugats sind auch potentielle

Schäden an den Nieren zu berücksichtigen. Da über den Ureter eine Verbindung zwischen Blase und Niere besteht, ist bei der Maus aufgrund des im Verhältnis zum Blasenvolumen relativ großen Instillationsvolumens eine Strahlenbelastung durch den Aufstieg des Radioimmunkonjugats bei der intravesikaler Applikation von Bi-213-anti-EGFR-mAk denkbar. Hingegen wird sowohl bei der Maus als auch beim Menschen durch die transurethrale Resektion eine Läsion der Blasenwand und somit ein Anschluss an die Blutzirkulation geschaffen, wodurch es zu einem Übertritt des Radioimmunkonjugats in den Kreislauf kommen könnte. Bei einer Verteilung von Bi-213-anti-EGFR-mAk in der Zirkulation ist eine Anreicherung in der Niere zu erwarten, da sich sowohl Bi-213, das sich vom Antikörper gelöst hat, als auch Antikörperfragmente bevorzugt in der Niere ablagern (Jaggi et al., 2005, Miederer et al., 2004, Flynn et al., 2003, Behr et al., 1997, Beck et al., 2007) und die Niere das potentiell dosislimitierende Organ in der Radioimmuntherapie darstellt (Cybulla et al., 2001, Behr et al., 1997, Song et al., 2007). Vor diesem Hintergrund wurde neben der Harnblase als direkt strahlenexponierte Struktur die Niere als potentiell dosislimitierendes Organ bei intravesikaler Applikation von Bi-213-anti-EGFR-mAk zur Untersuchung ausgewählt.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Grundlagen zum Einsatz von Alpha-Strahlern in der Radioimmuntherapie

Ionisierende Strahlung wird in direkt (Alpha- und Betastrahlung) und indirekt ionisierende Strahlung (Röntgen-, Gamma- und Neutronenstrahlung) unterteilt. Während es bei direkt ionisierender Strahlung aufgrund des Ladungscharakters unmittelbar zu Ionisationen kommt, erzeugt indirekt ionisierende Strahlung bei Wechselwirkung mit der Materie zunächst geladene Teilchen, die dann die weitere Wirkung vermitteln. Ein weiterer Unterschied zwischen den verschiedenen Strahlungsarten besteht im Hinblick auf die Ionisationsdichte, d.h. der Anzahl der Ionisationen entlang des Weges der Strahlung, wobei hier prinzipiell zwischen locker und dicht ionisierender Strahlung unterschieden werden kann. Die Ionisationsdichte lässt sich messtechnisch nur schwer erfassen, weshalb stattdessen der lineare Energietransfer (LET) verwendet wird. Der LET beschreibt den Grad der Energieabgabe eines ionisierenden Teilchens pro Längeneinheit und stellt damit ein indirektes Maß für die Ionisationsdichte dar.

Die hier relevante Alpha-Strahlung emittiert einen zweifach positiv geladenen Heliumkern, bestehend aus zwei Protonen und zwei Neutronen. Bedingt durch die große Masse des Heliumkerns zeichnet sich Alpha-Strahlung durch einen hohen linearen Energietransfer von ca.  $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$  aus. In diesem Zusammenhang erklärt sich auch die geringe Reichweite von Alpha-Partikeln, die im Gewebe bei ungefähr  $50 - 100 \mu\text{m}$  liegt (McDevitt et al., 1998). Insgesamt wird von Alpha-Strahlung also auf einem kurzen Weg sehr viel Energie abgegeben – es handelt es sich damit um dicht ionisierende Strahlung, entsprechend ist der LET eines Alpha-Strahlers gegenüber Beta-Strahlung bis zu 400mal höher (McDevitt et al., 1998). Durchquert ein Alpha-Teilchen eine Zelle, ist somit auch die Wahrscheinlichkeit der Schädigung von kritischen Strukturen - vor allem des Zellkerns – höher als bei allen anderen Strahlenqualitäten. Alpha-Partikel führen hierbei besonders häufig zu DNS-Doppelstrangbrüchen (Abb. 3), da bei Alpha-Strahlung der Abstand zwischen zwei Ionisationsereignissen ziemlich genau dem Abstand zwischen den DNS-Strängen ( $2 \text{ nm}$ ) entspricht. Entsprechend beträgt das Verhältnis von Einzel- zu Doppelstrangbrüchen bei Alpha-Emittern 6:1, bei Röntgenstrahlung hingegen 25:1 (Barendsen, 1962). Doppelstrangbrüche sind für die Reparaturmechanismen der Zelle nur schwer zu beherrschen, daher sind nur einige wenige Alpha-Partikel notwendig, um eine Zelle abzutöten - wobei sich die Schätzungen in einem Bereich zwischen einem und 20 Partikeln bewegen (Bird et al., 1980, Lloyd et al., 1979, Todd et al., 1985, Raju et al., 1991, Munro, 1970).

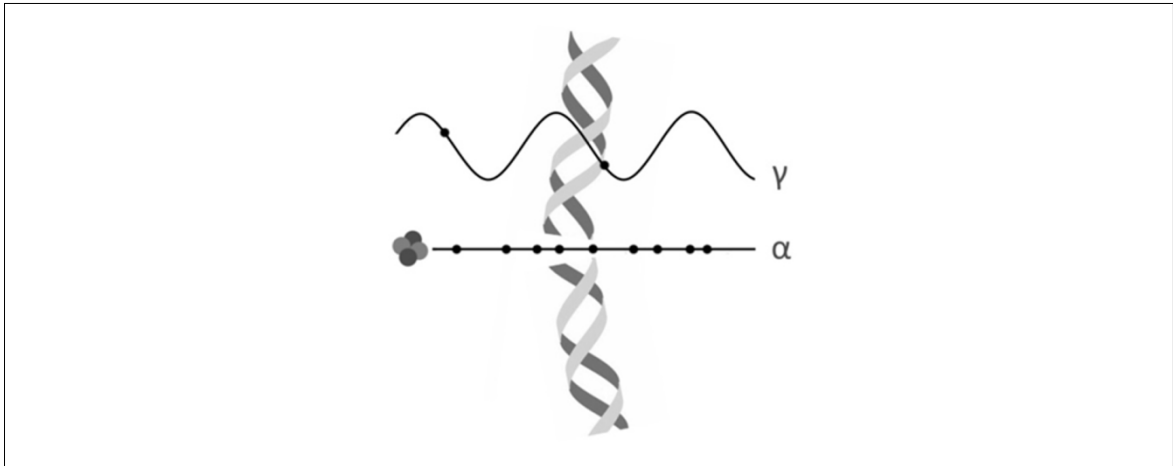


Abb. 3: Schematische Darstellung eines durch Alpha-Strahlung induzierten DNS-Doppelstrangbruchs im Vergleich mit Gamma-Strahlung.

Der hohe lineare Energietransfer zusammen mit den eingeschränkten Fähigkeiten der Zelle, von Alpha-Partikeln gesetzte DNS-Schäden zu reparieren, erklärt die große zytotoxische Wirkung von Alpha-Strahlung. Neben der effektiven Abtötung von Tumorzellen verspricht die geringe Reichweite von Alpha-Strahlern in der Radioimmuntherapie auch eine Schonung des gesunden Gewebes. Andererseits wird hier auch die Limitierung der RIT mit Alpha-Strahlern deutlich: Aufgrund der geringen Eindringtiefe ist sie nicht geeignet, größere Verbände von Tumorzellen abzutöten. So weisen auch Pfof et al. darauf hin, dass die vergleichsweise schlechten Ergebnisse der Alpha-Radioimmuntherapie des Harnblasenkarzinoms bei einer Therapie, die erst 14 Tage nach Zellinstillation begonnen wurde, auf die zu große Tumormasse zurückzuführen ist – wobei eine fraktionierte Therapie in diesen Fällen wahrscheinlich bessere Ergebnisse erbringen würde (Pfof et al., 2009).

Ungefähr 100 Radionuklide sind bekannt, die bei ihrem Zerfall einen oder mehrere Alpha-Partikel abgeben. Aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie der Verfügbarkeit sind jedoch nur wenige Alpha-Emitter für die Radioimmuntherapie nutzbar (Seidl and Senekowitsch-Schmidtke, 2008). Der von der eigenen Arbeitsgruppe ausgewählte Alpha-Strahler Bi-213 ist ein Zerfallsprodukt von Actinium-225 (Abb. 4). Bi-213 hat eine kurze Halbwertszeit von 45,6 min, weshalb eine rasche Kopplung an den Antikörper erforderlich ist, aber auch eine Reduktion der Strahlenbelastung des Patienten möglich ist.

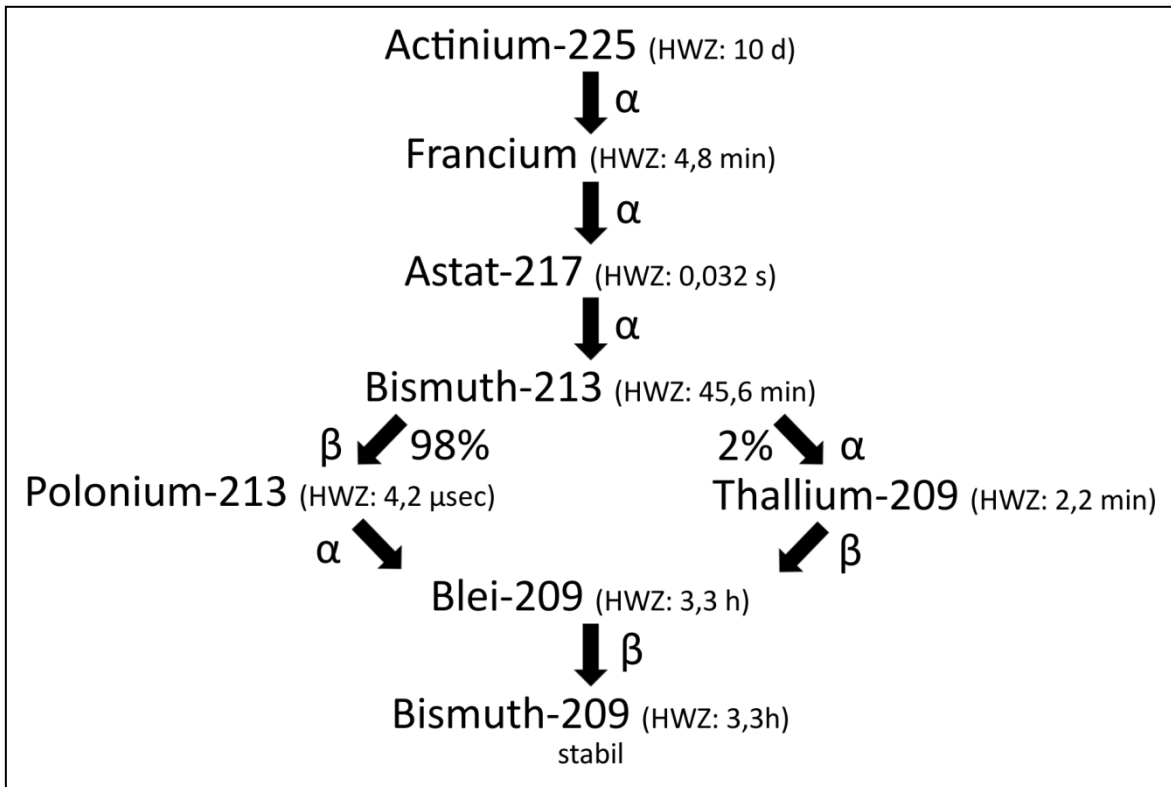


Abb. 4: Zerfallsschema von Actinium-225.

Beim Zerfall von Bi-213 beträgt der Dosisanteil der Strahlung mit niedrigem LET weniger als 1% (Kennel et al., 1999). Mit 98% wird der überwiegende Teil von Bi-213 unter Beta-Zerfall in Polonium-213 umgewandelt, das wiederum mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von 4,2  $\mu\text{sec}$  unter Abgabe von Alpha-Partikeln zu Blei-209 zerfällt. Somit ist Polonium-213 der eigentliche Alpha-Emitter, trotzdem wird Bi-213 aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von Polonium-213 als Alpha-Strahler bezeichnet. Die restlichen 2% des Bi-213 werden durch Aussendung eines Alpha-Partikels zu Thallium-209 umgewandelt, mit einer Halbwertszeit von 2,2 min entsteht dann unter Beta-Zerfall ebenfalls Blei-209.

## 2.2 Strahlenpathologie der Harnblase

### 2.2.1 Histologischer Aufbau der Harnblase

Die Harnblase ist mit einem Übergangsepithel, dem Urothel, ausgekleidet, dessen Höhe bei zunehmender Füllung der Blase abnimmt. Man unterscheidet kubische Basalzellen mit einem Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$ , die direkt auf der Basalmembran aufsitzen und eine einreihige Zellschicht bilden, außerdem Intermediärzellen mit einem Durchmesser von 10-25  $\mu\text{m}$ , die im Querschnitt eine bis mehrere Lagen bilden sowie vielgestaltige Deckzellen mit einem Durchmesser von 25-250  $\mu\text{m}$  (Apodaca, 2004). Besonders am gedehnten Urothel überspannen die Deckzellen in charakteristischer Weise die unteren Zelllagen, wobei eine dieser Zellen bis zu 20 Intermediärzellen abdecken kann.

Die Zellen des Urothels zeigen von der Basalschicht ausgehend eine zunehmende Differenzierung. Der Zellersatz geht vor allem von der Basalzellschicht aus, wobei jedoch alle Zellen bis hin zur apikalen Schicht zur Mitose fähig sind. Die Basalzellen weisen einen diploiden, die Deckzellen einen polyploiden Chromosomensatz auf, wobei letztere manchmal binukleär sind. Der Zellumsatz des Urothels ist unter physiologischen Bedingungen relativ langsam (Farsund, 1975) und wird mit einer Generationszeit von ungefähr 240 Tagen angegeben (Schreiber et al., 1969).

Neben dem Sammeln und Speichern des Urins ist es eine wichtige Funktion der Blase, die Zusammensetzung des Urins aufrecht zu erhalten, d.h. einen Austausch von Stoffen zwischen Urin und den naheliegenden Blutgefäßen zu verhindern. Das Urothel zeichnet sich hierbei durch eine ausgeprägte Undurchlässigkeit aus; strukturell wird diese Barriere durch die Deckzellen selbst, eine luminal auf den Deckzellen gelegene Schicht aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen sowie durch die Verbindung der Deckzellen mittels tight junctions gebildet. Die Intaktheit der urothelialen Barriere ist eine wichtige Voraussetzung für den Schutz vor schädigenden Bestandteilen des Urins sowie vor Infektionen.

Unter dem Urothel liegt die Lamina propria, die zahlreiche Blutgefäße sowie Nervenfasern enthält. Als dritte Schicht folgt die aus glatter Muskulatur bestehende Tunica muscularis und als äußerste Wandschicht die Tunica serosa.

Während das Urothel des Menschen aus fünf bis sieben Zelllagen aufgebaut ist, finden sich bei der Maus zwei bis vier Zellreihen- bzw. -schichten (Gude et al., 1982). Sowohl die Dicke des Urothels, als auch der darunterliegenden Schichten, ist abhängig von der Dehnung der Blase durch Urin, aber auch durch histologische Fixiermittel (Maronpot et al., 1999). Daher kann das

murine Urothel, das normalerweise zwei bis vier Zellreihen aufweist, in der Histologie dicker erscheinen, ohne dass dem eine pathologische Bedeutung zukommen würde.

### **2.2.1 Histopathologische Befunde der Harnblase nach Bestrahlung**

Die Auswirkungen von Alpha-Strahlung auf die Harnblase sind bisher weder beim Menschen noch im Tiermodell untersucht worden. Zur externen Bestrahlung mit anderen Strahlenqualitäten finden sich jedoch mehrere Studien. Einige wichtige Befunde, die an humanen Blasen (Antonakopoulos et al., 1984, Gowing, 1960) bzw. an den Blasen von Mäusen (Jaal and Dörr, 2010, Stewart et al., 1991), Ratten (Antonakopoulos et al., 1982, Vale et al., 1993) und Hunden (Kinsella et al., 1988, Hueper et al., 1942) erhoben wurden, sind im Folgenden kurz zusammengefasst.

Ein bis sieben Monate post expositionem (p.e.) war ein initialer Verlust von Urothelzellen ein häufig anzutreffender Befund (Jaal and Dörr, 2010, Antonakopoulos et al., 1982, Stewart et al., 1991, Kinsella et al., 1988, Gowing, 1960, Hueper et al., 1942). Nach sechs bis zwölf Monaten ging das Urothel oft in eine hyperplastische Phase über (Jaal and Dörr, 2010, Stewart et al., 1991, Antonakopoulos et al., 1982, Gowing, 1960, Hueper et al., 1942). Ein Verlust bzw. eine Degenerierung von Deckzellen wurde in einer Zeit ab neun Monaten beschrieben (Stewart et al., 1991, Antonakopoulos et al., 1982). Als weitere Befunde am Urothel fanden sich Vakuolisierung (Stewart et al., 1991, Hueper et al., 1942), Pyknose (Hueper et al., 1942) und verdickte und/oder mehrschichtige Basallaminae (Antonakopoulos et al., 1984, Antonakopoulos et al., 1982).

Sehr detailliert wurden die strahleninduzierten Veränderungen des Urothels von Antonakopoulos et al. beschrieben (Antonakopoulos et al., 1982). Strahlenschäden waren zunächst in der Basalzellschicht nachweisbar, nach einem Monat fanden sich hier intrazelluläre Veränderungen, binukleäre Basalzellen, Nekrosen und eingewanderte Makrophagen. Im dritten Monat hatten sich die intrazellulären Veränderungen auf die Intermediär- und Deckzellschicht ausgebreitet. Nach sechs Monaten wurden milde Atypien u.a. in Form von Zellkernveränderungen und mehrschichtigen Basalzellen sichtbar. Als einzige Autoren berichten Antonakopoulos et al. von multifokalen Neoplasien, die nach 20 Monaten in mehr als der Hälfte der Fälle auftraten.

Fibrose ist eine weitere, von verschiedensten Autoren beschriebene, Pathologie nach Bestrahlung der Blase, wobei das Auftreten in einem Zeitraum zwischen drei und 12 Monaten lag (Stewart et al., 1991, Vale et al., 1993, Kinsella et al., 1988, Antonakopoulos et al., 1982, Gowing, 1960,



Hueper et al., 1942) und teilweise eine Betonung der fibrotischen Veränderungen um Gefäße, Nerven und glatte Muskulatur bestand (Antonakopoulos et al., 1984). Als weiterer häufiger Befund wurden mit einem Auftreten zwischen einem und 12 Monaten p.e. entzündliche Infiltrate beschrieben (Vale et al., 1993, Kinsella et al., 1988, Stewart et al., 1991, Antonakopoulos et al., 1984, Gowing, 1960, Hueper et al., 1942). Insofern näher auf die Zusammensetzung eingegangen wird, handelte es sich um heterogene Infiltrate aus Granulozyten (Vale et al., 1993, Stewart et al., 1991, Antonakopoulos et al., 1984) und Plasmazellen (Vale et al., 1993) bzw. Makrophagen (Antonakopoulos et al., 1984).

Veränderungen der Muskulatur traten zwischen einem und 12 Monaten p.e. auf, wobei die Tunica muscularis als degeneriert (Vale et al., 1993, Antonakopoulos et al., 1984, Antonakopoulos et al., 1982) und verdickt (Stewart et al., 1991) bzw. ödematös (Antonakopoulos et al., 1984, Antonakopoulos et al., 1982) beschrieben wurde. In manchen Fällen wird die Lokalisation eines vorhandenen Ödems in der Blasenwand nicht ganz deutlich (Gowing, 1960, Stewart et al., 1991, Hueper et al., 1942).

Seltener treten veränderte Fibroblasten (Antonakopoulos et al., 1984, Gowing, 1960) und Ulzera (Stewart et al., 1991, Gowing, 1960, Hueper et al., 1942) auf.

An den Gefäßen werden multiple Veränderungen beschrieben; es fanden sich zerstörte (Antonakopoulos et al., 1984), hyperplastische (Antonakopoulos et al., 1982) oder ödematöse (Antonakopoulos et al., 1982) Endothelzellen, dilatierte Kapillaren (Gowing, 1960, Kinsella et al., 1988), perivaskuläre Fibrose (Gowing, 1960, Antonakopoulos et al., 1982) und intravasale Koagulation (Antonakopoulos et al., 1984). Aufgrund des Ödems bzw. der Fibrose kam es in einigen Fällen auch zu einer Einengung des Gefäßlumens (Gowing, 1960, Antonakopoulos et al., 1982).

### **2.2.2 Pathogenese der Strahlenwirkungen**

Welche Schäden in der Pathogenese der Strahlenwirkungen der Harnblase als primär anzusehen sind, ist nach wie vor umstritten. Von manchen Autoren werden Gefäßschäden als kausale (Teil-) Ursache für Läsionen an der Tunica muscularis angesehen. Antonakopoulos et al. weisen darauf hin, dass nahe an Blutgefäßen liegende Muskelzellen in ihren Untersuchungen geringere Läsionen aufweisen als weiter peripher gelegene Zellen und daher die perivaskuläre Fibrose, die Veränderungen der Basallamina und des Endothels mit nachfolgender Ischämie neben einem direkten Strahlenschaden als (mit-)verursachend anzusehen sind (Antonakopoulos et al., 1984,

Antonakopoulos et al., 1982). Andere Autoren sehen in diesem Mechanismus auch eine mögliche Erklärung für den Verlust von Urothelzellen (Stewart, 1991). Neben den Gefäßen ist die Degeneration von Axonen ein weiterer Erklärungsansatz für die beobachteten muskulären Veränderungen (Vale et al., 1993).

Auch die Urothelhyperplasie ist Gegenstand der Diskussion. Neben Strahlung können auch chemische und mechanische Schädigungen des Urothels zu einer beschleunigten urothelialen Proliferation führen, allerdings kommt es bei Strahlenschäden erst nach Monaten zu einer forcierten Hyperplasie, während z.B. bei Cyclophosphamid schon nach einer Woche eine gesteigerte Proliferation auftritt (Stewart, 1986). Zur Pathogenese der Urothelhyperplasie stellt Stewart Vermutungen an: Wenn man davon ausgehe, dass das Absterben von Zellen der Stimulus für die kompensatorische Proliferation ist und dass gleichzeitig die meisten bestrahlten Zellen erst absterben, wenn sie in die Mitose eintreten, erkläre sich daraus vor dem Hintergrund des langsamen Zellumsatzes des Urothels das späte Einsetzen der Hyperplasie. Antonakopoulos et al. sehen das späte Auftreten von Strahlenschäden ebenfalls durch den geringen Zellumsatz bedingt und betrachten die Hyperplasie als eine Reaktion auf das Absterben von Urothelzellen (Antonakopoulos et al., 1982). Jaal und Dörr kritisieren an dieser Argumentation, dass die beschleunigte Proliferation erst einsetzt, wenn das Urothel bereits wieder hergestellt ist (Jaal and Dörr, 2010). Unter Verweis auf Buttyan et al. (Buttyan et al., 2003) vermuten die Autoren, dass aus strahlenbedingten Schäden von Blutgefäßen eine Hypoxie des Urothels resultiert, die dann einen Stimulus zur Proliferation darstellt.

Die Bedeutung der histologischen Befunde für die klinischen Symptome nach Bestrahlung der Harnblase ist ebenfalls noch nicht abschließend geklärt. So könnte die Ursache für die klinisch gut bekannte erhöhte Miktionsfrequenz in der Fibrose mit nachfolgender reduzierter Blasenkapazität, im Epithelverlust mit Freilegung der darunter liegenden Schichten, nachfolgender Infektion und Zystitis oder der Schädigung von Neuronen zu suchen sein (Stewart et al., 1991, Stewart, 1986, Stewart, 1991, Vale et al., 1993).

## **2.3 Strahlenpathologie der Niere**

### **2.3.1 Histologischer Aufbau der Niere**

Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, bestehend aus Nierenkörperchen und den Tubuli, bei denen proximaler (mit Pars convoluta und Pars recta), intermediärer, distaler Tubulus und Verbindungstubulus unterschieden wird. Die Verbindungstubuli drainieren in die Sammelrohre, die wiederum in die Nierenpapillen münden. Sammelrohre finden sich vor allem im Nierenmark, der Kortex wird histologisch von Tubuli dominiert. Das Nierenkörperchen wird weiter untergliedert in den Glomerulus, ein Kapillarkonvolut, das sich in die Kapsel einstülpt, und die Bowman-Kapsel. Die Bowman-Kapsel besteht aus einem viszeralem und einem parietalem Blatt, die den Bowman-Raum begrenzen. Zwischen den Glomeruluskapillaren findet sich das Mesangium, ein Bindegewebe mit Mesangiumzellen und Matrix. Noch zu den distalen Tubuli gehört die Macula densa, eine kleine Gruppe dicht gelagerter Zellen an der Kontaktstelle der Arteriola afferens mit dem Glomerulus. Zwischen den Nierentubuli und den Sammelrohren liegt das renale Interstitium, das sich aus Fibroblasten, Kollagen und Proteoglykanen zusammensetzt und in der Medulla stärker ausgeprägt ist als im Kortex.

Als Besonderheit bei der Maus weist das parietale Blatt der Bowman-Kapsel bei den meisten Mäusestämmen geschlechtliche Variationen auf – bei männlichen Tieren finden sich kubische, bei weiblichen flache Zellen (Maronpot et al., 1999). Außerdem ist bei der Maus sowohl die Zahl, als auch das Volumen der Glomeruli relativ gering ausgeprägt (Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory. and Green, 1966).

### **2.3.2 Histopathologische Befunde der Niere nach Bestrahlung bzw. Radioimmuntherapie mit Alpha-Emittern**

Der Zellumsatz der Niere ist im Allgemeinen langsam, wodurch sich ein Strahlenschaden häufig erst nach Monaten oder Jahren zeigt. Durch externe Strahlung verursachte Schäden der Niere sind ein durch zahlreiche Studien gut untersuchtes Gebiet, wobei unterschiedlichste Tierarten und Strahlendosen verwendet wurden. Bei Mäusen, Ratten und Hunden wurden u.a. folgende (Spät-)Schäden beschrieben: Tubulusatrophie (Jordan et al., 1978, Glatstein et al., 1977, Mostofi et al., 1964, Madrazo and Churg, 1976), Fibrose (Glatstein et al., 1977, Mostofi et al., 1964, Madrazo and

Churg, 1976) verdickte Basalmembran der Glomeruli (Jordan et al., 1978, Mostofi et al., 1964, Madrazo and Churg, 1976) bzw. der Tubuli (Madrazo and Churg, 1976), abgeflachte Parietalzellen der Bowman-Kapsel (Jordan et al., 1978, Glatstein et al., 1977), verdickte Gefäßwände (Glatstein et al., 1977, Mostofi et al., 1964), vergrößerte Zellkerne und Hyperchromasie der Tubuluszellen (Jordan et al., 1978) bzw. der Glomeruluszellen (Glatstein et al., 1977), Hyalinisierung bzw. Sklerosierung der Glomeruli (Jordan et al., 1978) sowie Entzündung der Glomeruli (Madrazo and Churg, 1976).

Im Gegensatz zur Harnblase wurden jedoch bereits mehrere Untersuchungen zur Wirkung von (antikörpergekoppelten) Alpha-Emittern auf die Niere durchgeführt. Der Alpha-Emitter erreicht bei den dabei durchgeführten i.v.- bzw. i.p.-Injektionen die Niere über den Kreislauf, potentielle Unterschiede in der Strahlenwirkung ergeben sich daher nicht nur aus der geringeren Reichweite und dem hohen LET der Emitter sondern auch aus der Verteilung innerhalb der Niere (siehe 2.4.2). Die verwendeten Radioimmunkonjugate, Tiermodelle, Applikationsart und Aktivitäten der in dieser Arbeit besprochenen Studien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit besprochenen histologischen Studien zur Wirkung von Alpha-Emitter-Immunkonjugaten auf die Niere

<i>Autoren</i>	<i>Radioimmun- konjugat</i>	<i>Tiermodell</i>	<i>Applikation</i>	<i>Aktivität (MBq)</i>
Beck et al.	Bi-213-d9MAb	Maus	i.p.	7,4 bzw. 22,2
Jaggi et al.	Ac <sup>225</sup> -HuM195	Maus	i.v.	0,01295
Miederer et al.	Ac <sup>225</sup> -HuM195	Affe	i.v.	0,028 bzw. 0,377/kg
Song et al.	Bi-213-PAI2	Maus	i.p.	≈ 7,0 – 14,75

In einem Zeitraum von 20 bis 40 Wochen p.e. kam es zu Hyalinisierung und Sklerose der Glomeruli (Jaggi et al., 2005, Beck et al., 2007) sowie zu einer Dilatation des Bowman-Raums (Jaggi et al., 2005). Ebenfalls in diesem Zeitraum wurden zahlreiche Befunde an den Tubuli beschrieben: Atrophie, Lyse bzw. Nekrose des Tubulusepithels (Jaggi et al., 2005, Beck et al., 2007, Song et al., 2007), intraluminale Zylinder (Jaggi et al., 2005, Song et al., 2007), Tubulusepithelzellen mit prominenten Kernen, Pyknose, Karyorrhesis, Schwellung, Vakuolen, verdickte Basalmembranen

und Kollaps (Jaggi et al., 2005) oder Dilatation (Song et al., 2007) der Tubuli. Im Interstitium kam es zu Vernarbung (Jaggi et al., 2005, Beck et al., 2007), Fibrose (Jaggi et al., 2005) und entzündlichem Infiltrat in Form von Lymphozyten (Jaggi et al., 2005) und neutrophilen Granulozyten (Song et al., 2007); ohne Bezug auf einen bestimmten Zeitraum berichten auch Miederer et al. über vereinzelte Aggregate mononukleärer Zellen (Miederer et al., 2004).

## **2.4 Übertritt von intravesikal applizierten Substanzen in den Kreislauf nach transurethraler Resektion**

Bei der intravesikalen Radioimmuntherapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk könnte eine Schädigung der Nieren bedingt sein durch einen Aufstieg des Radioimmunkonjugats über die Ureteren oder durch einen Übertritt in den Kreislauf durch die bei TUR geschaffene Läsion. Ein Aufstieg von Bi-213-anti-EGFR-mAk über die Ureteren sollte sich leicht durch die Wahl eines geeigneten Instillationsvolumens vermeiden lassen, potentielle Nebenwirkungen, die durch einen Übertritt des Radioimmunkonjugats in das Blut bedingt sein könnten, sind hingegen abhängig vom Ausmaß des Übertritts von Bi-213-anti-EGFR-mAk aus der Blase in den Kreislauf. Studien zum Übertritt der intravesikal applizierten Chemotherapeutika Epirubicin bzw. Mitomycin C nach TUR beim Menschen zeigen jedoch, dass es lediglich in geringem Maß zu einem Übertritt dieser Substanzen in den Kreislauf kommt. Bei Instillation von 20 bzw. 50 mg Epirubicin direkt nach TUR waren nach 30 min die maximalen mittleren Blutkonzentrationen erreicht, die mit <2,5 bzw. 5,0 ng/ml sehr gering ausfielen (Tsushima et al., 1998). Bei intravesikaler Instillation von 40 mg Mitomycin C zu verschiedenen Zeitpunkten beginnend 14 Tage nach TUR und einer Einwirkungszeit von 30 bzw. 60 min fand sich eine Resorption von <1% der verabreichten Dosis in die Blutzirkulation (van Helsing et al., 1988).

## **2.5 Biodistribution von Radioimmunkonjugaten in der Niere nach i.v.- bzw. i.p.- Injektion**

Antikörperfragmente werden in den Glomeruli bis zu einem Molekulargewicht von 25 kDa frei filtriert, mit zunehmendem Gewicht kommt es zu einer Abnahme bis schließlich bei ≈75 kDa kaum noch Filtration stattfindet. Allerdings ist zu beachten, dass bei entsprechender Konformation auch Antikörper mit einem höheren Gewicht den Filter passieren können (Bohrer et al., 1979). Neben

dem Filtrationsdruck ist ein weiterer die Filtration beeinflussender Faktor die negative Ladung der glomerulären Basalmembran, wodurch negativ geladene Proteine in geringerem Umfang als positiv geladene filtrierte werden. Die Reabsorption der Proteine findet vor allem im proximalen Tubulus statt, wo sie über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Das entstandene Endosom fusioniert mit einem Lysosom, in dem das Protein schließlich enzymatisch abgebaut und die entstandenen Aminosäuren in das Blut abgegeben werden (Sumpio and Hayslett, 1985). Radiometall-Aminosäuren-Chelatkomplexe werden ebenfalls über diesen Mechanismus in die Tubuluszellen aufgenommen, dann aber im Lysosom zurück gehalten, da in diesem Fall eine Bindung an lysosomale Proteine und somit eine Akkumulation in den Zellen des proximalen Tubulus stattfindet (Lambert et al., 2004).

Entsprechend diesen Überlegungen zeigt sich im Fall von kleinen radiomarkierten Antikörperfragmenten eine schnelle renale Clearance, wohingegen intakte radiomarkierte Antikörper länger in der Zirkulation verbleiben (Behr et al., 1997, Flynn et al., 2003). Betrachtet man die Niere unter dosimetrischen Gesichtspunkten, findet sich bei Fragmenten eine höhere Aktivität in der Nierenrinde verglichen mit dem Nierenmark, bei größeren Antikörpern (Gewicht > 100 kDa) ist die in der Niere gemessene Aktivität hingegen vor allem auf die Antikörper im Blut zurückzuführen (Flynn et al., 2003, Behr et al., 1997). Die Inhomogenität dieser Verteilung dürfte im Fall von Alpha-Strahlern aufgrund der hohen Energie, die diese Radionuklide auf kurzer Strecke deponieren, von noch größerer Bedeutung sein.

Bei Applikation von Bi-213-anti-EGFR-mAK ist neben der Verteilung von antikörpergebundenem Bi-213 im Organismus auch die Verteilung von freiem, d.h. vom Antikörper gelöstem, Bismuth zu berücksichtigen. Hierbei unterscheidet sich Bi-213 hinsichtlich seines Verteilungs- und Stoffwechselverhaltens nicht wesentlich von den anderen Isotopen des Bismuths. Entsprechend ist davon auszugehen, dass es bei einer systemischen Applikation von Bi-213 zu einer quantitativ dominierenden Anreicherung in den Nieren und hierbei vor allem der Nierenrinde kommt, wie bereits für Bi<sup>206</sup> beschrieben (Russ et al., 1975, Zidenberg-Cherr et al., 1987).

In einer Studie zur Verteilung von Bi-213-anti-EGFR-mAk sowie freiem Bi-213 nach i.p.-Injektion zeigt sich übereinstimmend mit diesen Überlegungen und früheren empirischen Befunden bei Gabe von Bi-213-anti-EGFR-mAk sowie freiem Bi-213 eine Anreicherung in der Nierenrinde und dem äußeren Nierenmark (Pfof, 2009). In einer weiteren Studie mit i.p.-Injektion von Bi-213-d9MAb bzw. freiem Bi-213 zeigte sich ebenfalls eine Anreicherung in der Nierenrinde und dem äußeren Nierenmark, wobei die Verteilung für Bi-213-d9MAb und Bi-213 wiederum gleich war

(Beck et al., 2007). Beide Autoren schließen hieraus, dass auch die Anreicherung bei Gabe des Bi-213-Immunkonjugats auf freies Bi-213, das sich vom Antikörper gelöst hat, zurückzuführen ist.

## **2.6 Biodistribution von Bi-213-anti-EGFR-mAk nach intravesikaler Applikation**

Die Biodistribution von Bi-213-anti-EGFR-mAk in Swiss nu/nu-Mäusen nach i.v.-Injektion sowie intravesikaler Instillation wurde bereits untersucht (Pfof, 2009, Pfof et al., 2009). Bei der i.v.-Injektion von 2,96 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk fand sich 45 min nach Applikation an tumortragenden Mäusen im Blut 32,3% und in der Niere 8,4% inj. Akt./g. (andere Organe in % inj. Akt./g: Herz 9,2, Lunge 11,5, Leber 11,6, Milz 4,9). Demgegenüber war die gemessene Aktivität in der Niere bei intravesikaler Instillation schon deutlich niedriger: Bei 6,66 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk betrug sie an ungekauterten Tieren 0,29% (45 min) bzw. 0,16% (90 min) inj. Akt./g (in Herz, Lunge, Leber, Milz und Darm zu beiden Zeitpunkten <0,1 % inj. Akt./g). In einem anderen Versuchsansatz mit 1,85 MBq instillierter Aktivität an ungekauterten Tieren und Messung nach 90 min fand sich in der Blase ein prozentualer Anteil von 8,2% und in der Niere von 1,5% inj. Akt./g (andere Organe in % inj. Akt./g: Blut 0,9, Herz 0,4 Lunge 0,4, Leber 0,6, Milz 0,2). Bei intravesikaler Instillation von 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk wurde an gekauterten Tieren nach 90 min in der Blase ein prozentualer Anteil von 6,8% und in der Niere von 2,7% inj. Akt./g gemessen (andere Organe in % inj. Akt./g.: Blut 8,3, Herz 1,6, Lunge 2,6, Leber 3,3, Milz 1,7).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bei i.v.-Applikation von Bi-213-anti-EGFR-mAk der Großteil des Radioimmunkonjugats in der Zirkulation verbleibt und es in den restlichen Organen zu einer recht homogenen Verteilung kommt, ohne dass eine herausragende Anreicherung in der Niere stattfinden würde. Prinzipiell zeigt die intravesikale Instillation bei ungekauterten Tieren eine sehr gute Retention des Radioimmunkonjugats in der Blase mit nur einem minimalen Aktivitätsanteil in den anderen Organen, wobei hier die Niere mit 0,29% bzw. 1,5 % inj. Akt./g führend ist. Dies wird von Pfof durch den bei Instillation aufgebauten intravesikalen Druck mit nachfolgendem Aufstieg von Bi-213-anti-EGFR-mAk über den Ureter in die Niere erklärt. Die Kauterung der Blase führt im Gegensatz zu Blasen ohne Läsion zu einem Anstieg der gemessenen Aktivität in allen untersuchten Organen. Der durch die Kauterung geschaffene Anschluss an die Blutzirkulation mit nachfolgendem Übertritt des Radioimmunkonjugats in die Zirkulation erklärt diese Zunahme. Allerdings ist bei gleicher instillierter Aktivität von 1,85 MBq und gleichem Messzeitpunkt von 90 min nach Applikation in der Niere nur ein moderater Anstieg von 1,5% (ungekautert) auf 2,7% (gekautert) inj. Akt./g zu verzeichnen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Eosin	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut 99,8%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Ethanol 70%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Formalin 4%	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Menzel-Gläser Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Saures Hämalaun nach Mayer	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Wässrige Eosin-Dinatriumlösung 1%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar
Xylol	Merck, Darmstadt

#### 3.2 Geräte und Software

Axiocam HRc	Carl Zeiss Micorimaging, Jena
Axiomager.A2	Carl Zeiss, Göttingen
Axiovision 40 V 4.8.0.0	Carl Zeiss Microimaging, Jena
GIMP 2.6.11	GNU
Microm HM335E	Thermo Scientific, Walldorf
Paraffin Embedding System Dispenser Unit TBS88	Medite, Burgdorf
Shandon Excelsior ES	Thermo Scientific, Walldorf
Shandon Hyperclean 1 Abzug	Thermo Scientific, Walldorf
Tissue Cool Plate COP20	Medite, Burgdorf
Tissue Flotation Bath TFB 35	Medite, Burgdorf
Trockenöfen UL 30 und B30	Memmert, Schwabach



### 3.3 Tiere zur histologischen Untersuchungen der Toxizität

Verwendet wurden Blasen und Nieren von Swiss nu/nu-Mäusen (n=19; Charles River, Frankreich) aus den Vorstudien von Pfohl et al. (Pfohl et al., 2009) sowie Fazel und Rötzer (bisher unveröffentlichte Daten). Die Einstellung der Tiere erfolgte mindestens zwei Wochen vor Beginn der Versuche. Die sechs bis acht Wochen alten Tiere wurden in IVC-Käfigen auf Altromin Faser-Einstreu in Gruppen zu je fünf Tieren bei 26°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die nutritive Versorgung erfolgte ad-libitum mit dem Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser. Eine Reinigung und Desinfektion der Käfige wurde zweimal wöchentlich durchgeführt.

Die Tiere erhielten zur Narkose durch i.p.-Injektion eine Kombination aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl sowie zur Stabilisierung des Kreislaufs und zur Schmerzprophylaxe s.c. 200 µl eines Infusionsgemisches aus Ringer-Lactat Glucose 5% und Carprofen. Nach Eintreten des Toleranzstadiums wurde unter Verwendung eines Gleitgel (Vidisc®, Dr. Mann Pharma) ein 26-gauge Venenverweilkatheter (DuPont) ohne Nadel in die Urethra eingeführt und dann der Urin abgelassen. Bei den Tieren der Gruppen A bis einschließlich D wurde anschließend ein Metalldraht bis zur Blasenwand vorgeschoben und für 2 s bei 7 Watt eine monopolare Koagulation (Erbotom T 71 D; Erbe) durchgeführt, um so den Zustand nach TUR zu simulieren. Anschließend erfolgte die Applikation von EJ28-Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen in 100 µl RPMI-Medium unter Berücksichtigung des Totraumvolumens von Spritze und Katheter), die für zwei Stunden intravesikal belassen wurden. Nach ein bzw. sieben Tagen wurden verschiedene Aktivitäten Bi-213-anti-EGFR-mAk in 100 µl PBS intravesikal instilliert und für jeweils 90 min in der Blase belassen. Bei den Tieren der Gruppen E und F erfolgte die intravesikale Gabe von Bi-213-anti-EGFR-mAk ohne vorherige Koagulation der Blasenwand sowie ohne Instillation von EJ28-Zellen. Die Tiere wurden nach folgenden Schemata behandelt: Einmalig mit 0,925 MBq (n=5; 3 Tiere mit / 2 ohne EJ28-Zellen), zweimalig mit 0,925 MBq (n=10; je 5 Tiere mit/ohne EJ28 Zellen), zweimalig mit 1,85 MBq (n=2; Tiere ohne EJ28-Zellen) oder zweimalig mit 3,7 MBq (n=2; Tiere ohne EJ28-Zellen) (siehe Tab. 2). 300 Tage nach Therapie wurden alle Tiere mittels CO<sub>2</sub>-Gabe betäubt und durch Durchtrennung der Aorta entblutet. Blasen und Nieren wurden nach Entbluten der Tiere entnommen und in Formalin fixiert.

Tabelle 2: Übersicht über applizierte Aktivität, Tumorstillation und Kauterung der Blasen der in dieser Arbeit untersuchten Swiss nu/nu-Mäuse (n=19)

<i>Gruppe</i>	<i>Aktivität (MBq)</i>	<i>Instillation von EJ28-Zellen</i>	<i>Applikationsschema</i>	<i>Kauterung</i>	<i>n</i>
A	0,925	nein	-	ja	1
					2
B	0,925	ja	7. Tag nach Tumorstillation	ja	1
					2
					3
C	2 x 0,925	nein	Erneute Gabe nach 7 Tagen	ja	1
					2
					3
					4
					5
D	2 x 0,925	ja	1. und 7. Tag nach Tumorstillation	ja	1
					2
					3
					4
					5
E	2 x 1,85	nein	Erneute Gabe nach 7 Tagen	nein	1
					2
F	2 x 3,70	nein	Erneute Gabe nach 7 Tagen	nein	1
					2

### 3.4 Histologie

#### 3.4.1 Fixierung, Entwässerung, Einbettung und Schnitt

Die durch Immersionsfixierung in Formalin behandelten Organe wurden mit Hilfe eines Shandon Excelsior ES (Thermo Scientific) entwässert und, sofern erforderlich, in einem Trockenofen B30 (Mettler) gelagert und dann mit einem Paraffin Embedding System Dispenser Unit TBS88 (Mettler) in Paraffin eingebettet. Mit einem Microm HM335E (Thermo Scientific) wurden die Paraffinblöcke bis zum jeweiligen Organ angeschnitten, dann auf einer Tissue Cool Plate COP20 (Mettler) gekühlt und anschließend mit einer Dicke von 4 µm geschnitten. Die Schnitte wurden in einem Tissue Flotation Bath TFB 35 (Mettler) in 42 °C warmes Wasser eingebracht und dort für

einige Minuten belassen, um das vollständige Entfalten der Schnitte zu gewährleisten. Für jedes Organ wurden dann mindestens neun Schnitte selektiert, auf Superfrost-plus-Objektträger (Menzel) aufgezoogen und zum Trocknen beiseite gelegt.

### **3.4.2 Entfernung des Paraffins, Färbung, Einbettung und Begutachtung**

Um ein besseres Anhaften der Schnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden die Präparate anschließend für 10 min bei 60°C in einem UL 30 (Mettler) inkubiert. Für je drei Minuten wurden die Schnitte dann unter einem Hyperclean 1 (Thermo Scientific) dreimal in Xylol eingebracht, um das Paraffin zu entfernen. Darauf folgte von Hand die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach dem Schema: 100% Ethanol für 2 x 3 min, 90% Ethanol für 2 x 3 min, 80% Ethanol für 2 x 3 min, 70% Ethanol für 3 min, 50% Ethanol für 3 min, destilliertes H<sub>2</sub>O für 5 min, Hämalaun für 4 min, fließendes H<sub>2</sub>O für 10 min, Eosin für 30 s, 70% Ethanol für 10 s, 90% Ethanol für 2 min, 100% Ethanol für 2 min und Xylol für 10 min. Nicht vorhandene Ethanolverdünnungen wurden mit Leitungswasser hergestellt. Die Einbettung der gefärbten Schnitte erfolgte mit Kaisers Glyceringelatine (Merck). Die Präparate wurden dann unter einem AxioImager A2 (Zeiss) systematisch begutachtet. Von jedem Organ wurden jeweils mehrere Präparate aus verschiedenen Schnittebenen analysiert. Die Durchmusterung der Organe erfolgte komplett, d.h. alle anatomischen Schichten bzw. Strukturen wurden in die Untersuchung einbezogen. Nach dieser Analyse wurden repräsentative Organe bzw. Ausschnitte dieser Organe fotografiert (AxioCam HRc, AxioImager.A2, Axiovision 40 V 4.8.0.0; Carl Zeiss) und, soweit erforderlich, in Kontrast und Helligkeit angepasst.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Histopathologische Befunde der Harnblasen

Nach intravesikaler Instillation von 0,925 bzw. 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk zeigte das Urothel 300 Tage nach Exposition durchgehend einen regelhaften Aufbau mit unauffälligen, meist in zwei bis drei Lagen angeordneten Zellen (Abb. 5). In einem Teil der Fälle war das Urothel verdickt und in Falten aufgeworfen – diese Befunde sind aber nicht im Sinne einer Hyperplasie zu deuten, sondern durch eine geringere Dehnung des Organs bei der Fixierung zu erklären (Abb. 10).

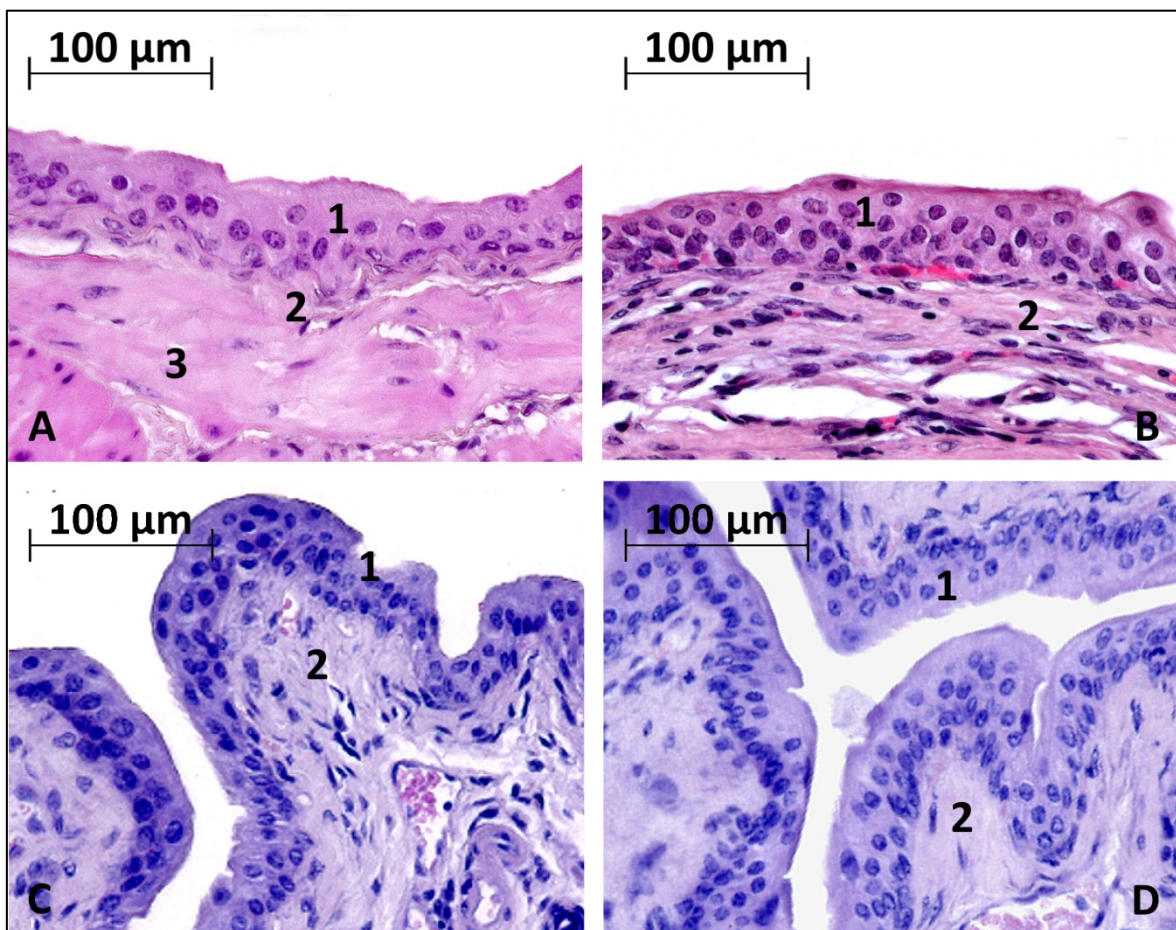


Abb. 5: Detailansicht von unauffälligem Urothel von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 (A,B), 2 x 1,85 (C) und 2 x 3,7 (D) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Lamina propria, 3: Tunica muscularis.

Bei höheren Aktivitäten von 2 x 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk fanden sich bei einem Tier fokale Veränderungen in Form von vergrößerten Kernen, Hyperchromasie und irregulären Kernmembranen (Abb. 6). Zudem waren in diesem Fall vesikuläre Strukturen unklarer Natur innerhalb des Urothels sichtbar.

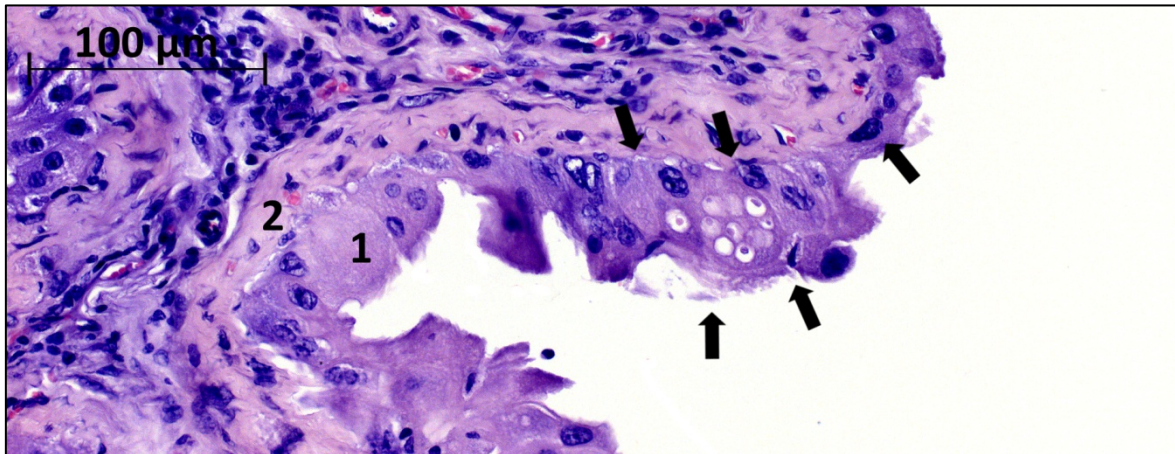


Abb. 6: Detailansicht der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Lamina propria. Pfeile: Fokale Veränderungen in Form von vergrößerten Kernen, Hyperchromasie und irregulären Kernmembranen, außerdem vesikuläre Strukturen unklarer Natur innerhalb des Urothels.

Die Zellen der Lamina propria, der Tunica muscularis, ebenso wie die der Adventitia und Gefäße zeigten durchgehend in allen untersuchten Organen (n=19) keine Auffälligkeiten (Abb. 7). Ebenso präsentierten sich die bindegewebigen Anteile regelrecht.

In keiner der untersuchten Harnblasen, einschließlich der Blasen mit vorangegangener intravesikaler Instillation von EJ28-Zellen (n=8), konnten primäre oder sekundäre Karzinomzellen nachgewiesen werden.

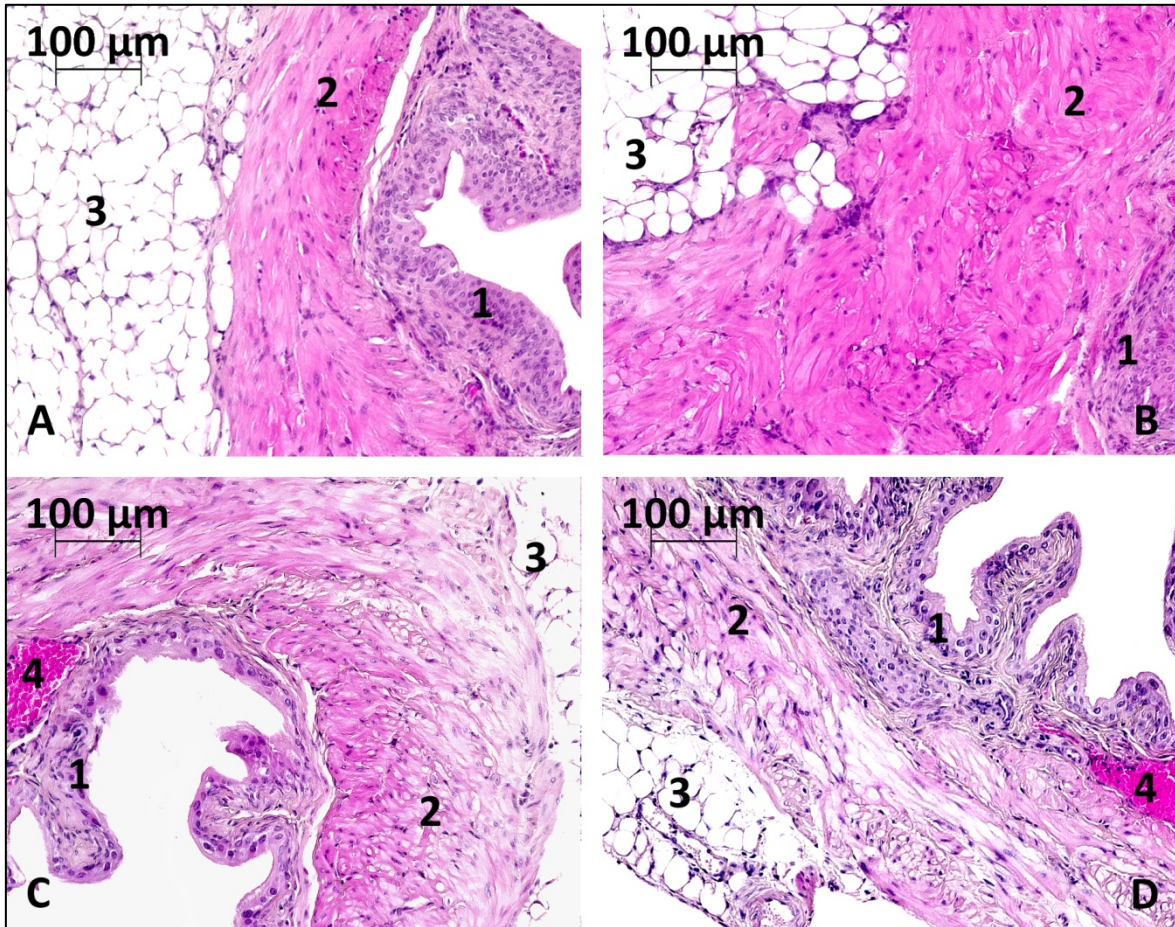


Abb. 7: Unauffällige Detailansichten der Harnblasenwand von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 (A,B,D) bzw. 0,925 (C) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Tunica muscularis, 3: Fettgewebe, 4: Gefäß

In der Lamina propria wie auch der Tunica muscularis waren in 15 Fällen ( $\approx 79\%$  aller untersuchten Harnblasen) entzündliche Infiltrate in Form von nodulären Ansammlungen von Lympho-, in einem Fall auch Histiozyten sichtbar (Abb. 8). Das entzündliche Infiltrat hatte in allen untersuchten Organen dasselbe, uniforme Erscheinungsbild. In keinem der Fälle war eine Destruktion des Organs festzustellen.

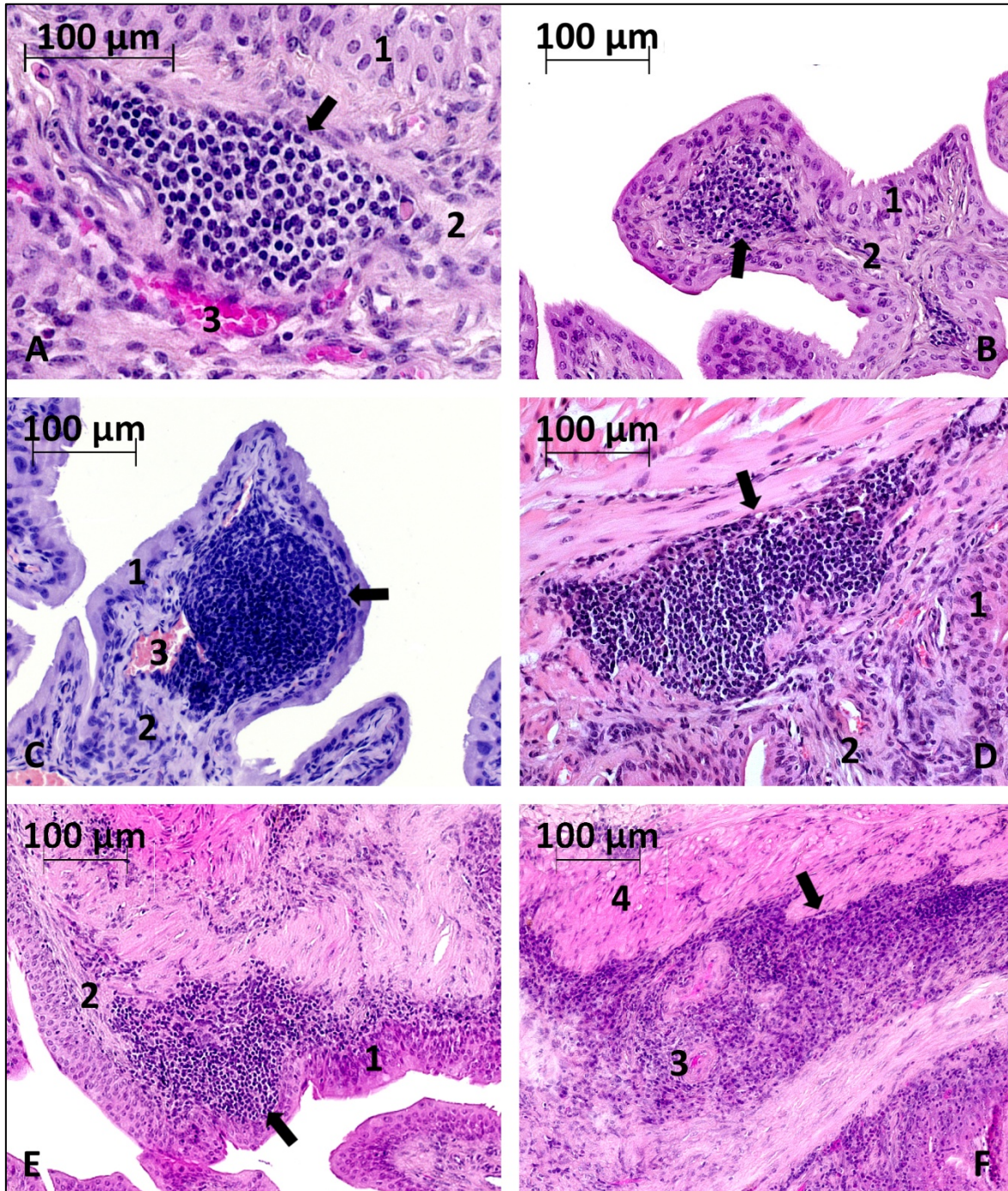


Abb. 8: Harnblasen von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 (A,B,D,E,F) bzw. 2 x 1,85 (C) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Lamina propria, 3: Gefäß, 4: Tunica muscularis. Pfeile: Noduläre Infiltrate von Lymphozyten (A,B,C,D,E), teilweise auch Histiocyten (F) in der Lamina propria bzw. Tunica muscularis.

Mit n=11 ( $\approx 58\%$  aller untersuchten Organe) wurden die Entzündung in den meisten Fällen als geringgradig klassifiziert, lediglich in n=4 ( $\approx 21\%$  aller untersuchten Organe) lag eine ausgeprägtere Entzündung vor, die aber immer noch als mittelgradig klassifiziert wurde. Die Abb. 9 und 10

zeigen Übersichtsaufnahme zweier repräsentativer Organe und sollen einen Eindruck der quantitativen Ausprägung der jeweiligen Entzündungsgrade vermitteln. Abb. 9 zeigt die Übersichtsaufnahme der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. Innerhalb der Lamina propria finden sich vereinzelt diskrete noduläre Ansammlungen von Lymphozyten (Pfeile). Die Entzündung wurde als geringgradig klassifiziert.

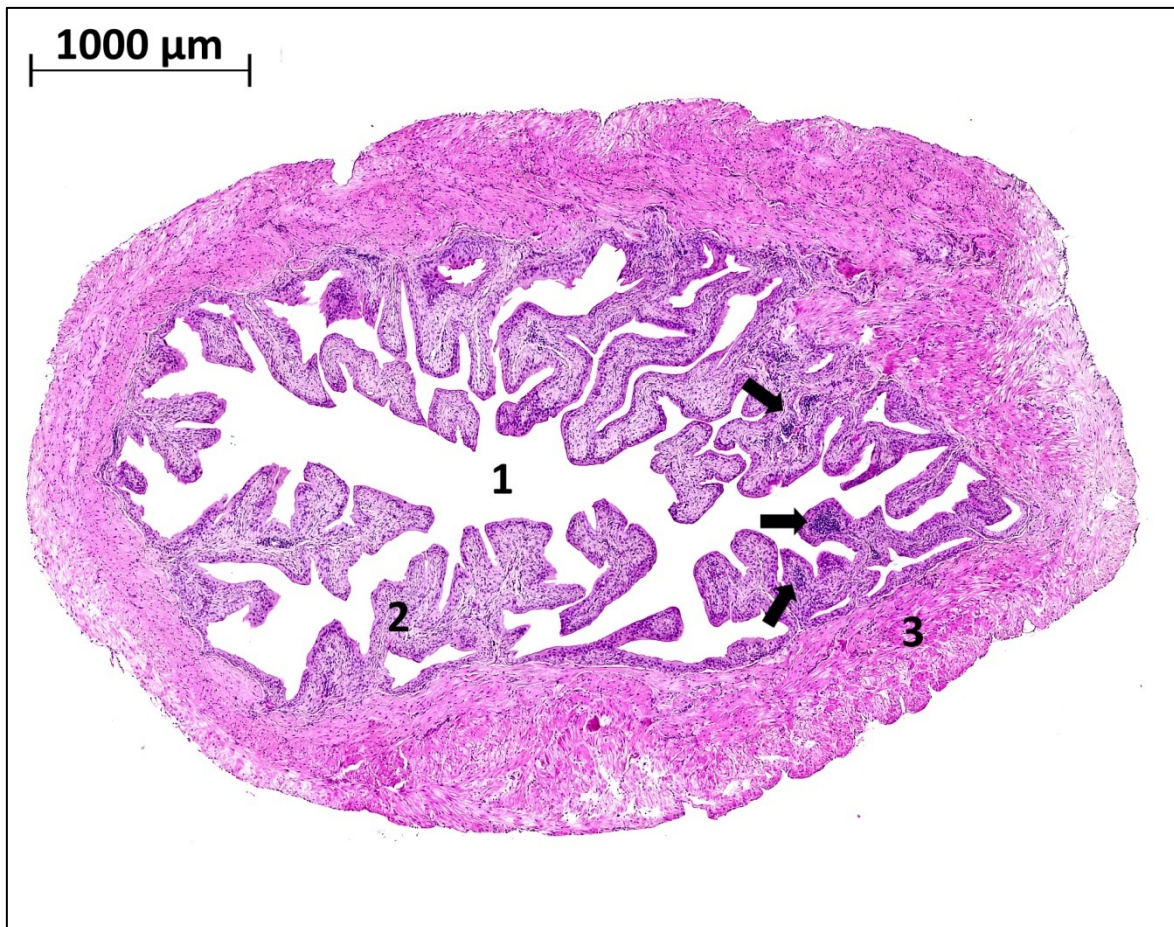


Abb. 9: Übersicht der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Lumen, 2 : Urothel und Lamina propria, 3 : Tunica muscularis. Pfeile: Lymphozytäres Infiltrat. Die Entzündung wurde als geringgradig klassifiziert.



Abb. 10 zeigt die Übersichtsaufnahme der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. Innerhalb der Lamina propria sowie der Tunica muscularis sind wiederum noduläre, teilweise aber auch konfluierende Ansammlungen von Lymphozyten sichtbar (Pfeile). Die Entzündung wurde als mittelgradig klassifiziert. Bedingt durch die geringe Dehnung des Organs erscheint das Urothel teilweise verdickt – ein Befund der nicht im Sinne einer Hyperplasie zu deuten ist.

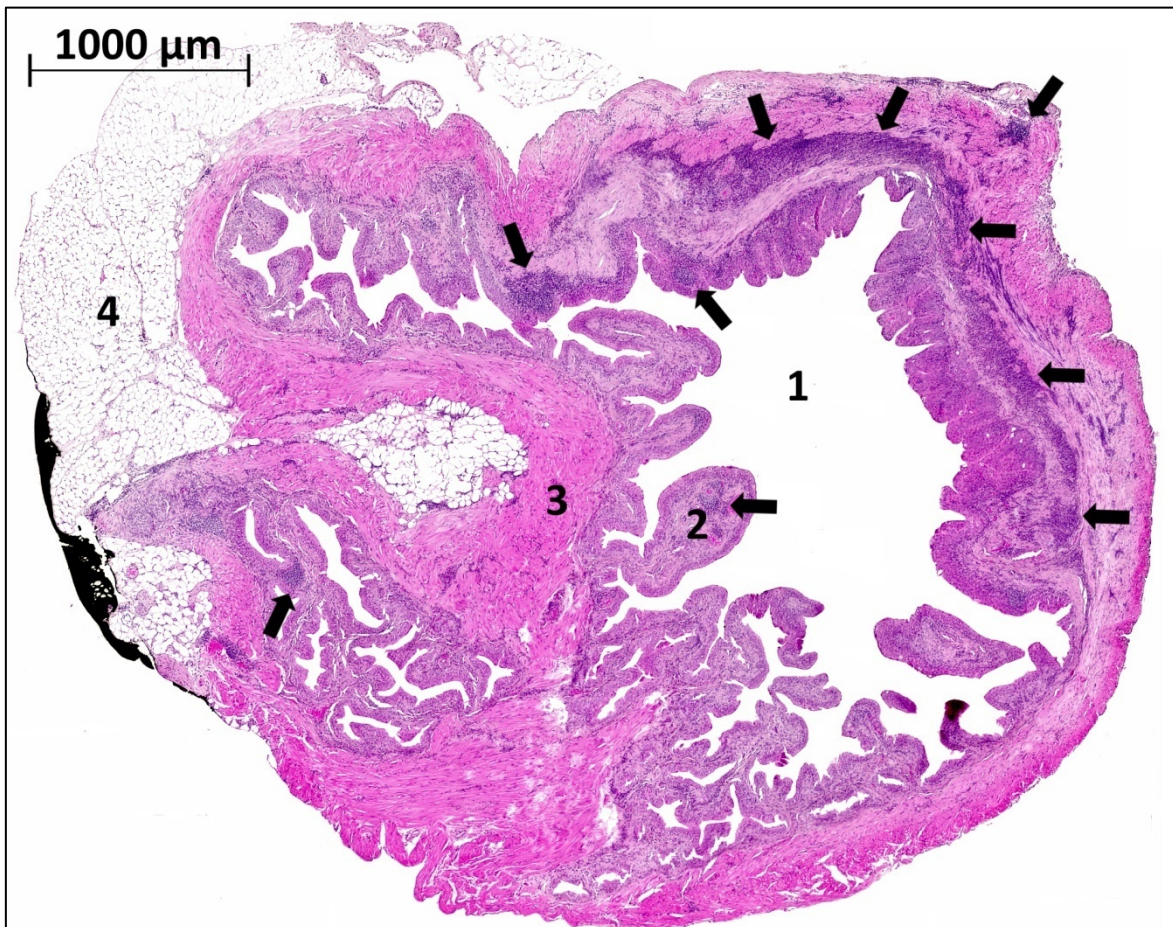


Abb. 10: Übersicht der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Lumen, 2: Urothel und Lamina propria, 3: Tunica muscularis, 4 Fettgewebe. Pfeile: Lymphozytäres, teils histiozytäres Infiltrat. Die Entzündung wurde als mittelgradig klassifiziert. Teilweise erscheint das Urothel verdickt – dieser Befund ist nicht im Sinne einer Hyperplasie zu interpretieren, sondern durch die geringe Dehnung bei der Fixierung zu erklären.

## 4.2 Histopathologische Befunde der Nieren

Nierenkörperchen, Tubuli und Sammelrohre, ebenso wie die Gefäße und die bindegewebigen Anteilen zeigten in allen untersuchten Organen (n=35) keinerlei pathologische Veränderungen (Abb. 11, 12). Bei der histologischen Interpretation ist zu beachten, dass sich bei der Maus, wie bereits oben erwähnt, sowohl Zahl als auch Volumen der Glomeruli gering ausgeprägt sind.

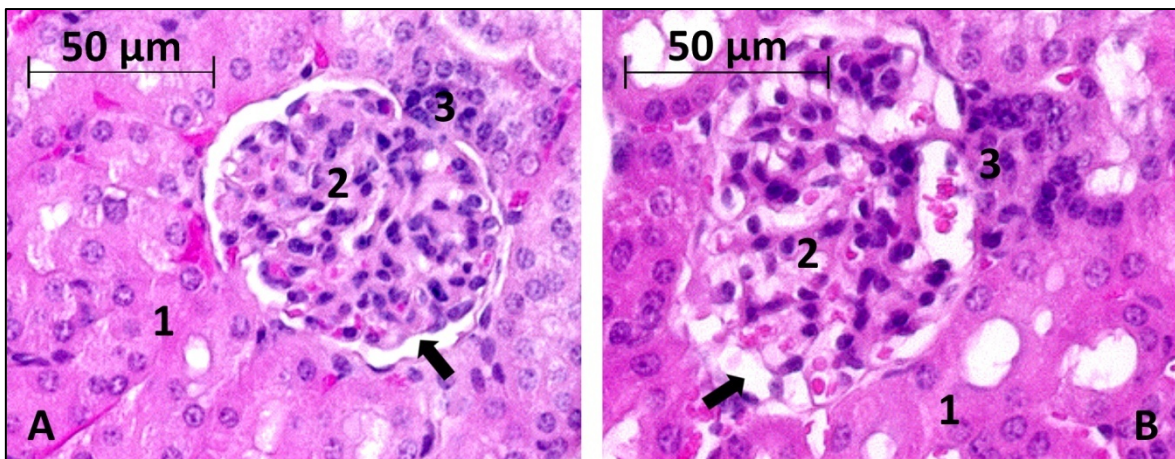


Abb. 11: Detailansicht unauffälliger Glomeruli von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 (A) bzw 2 x 0,925 (B) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Tubuli, 2: Glomerulum, 3: Macula densa. Pfeil: Bowman-Raum

Auch in einem Teil der Nieren fand sich ein entzündliches Infiltrat, das mikroskopisch dem bereits in den Harnblasen beschriebenen Befund im Sinne einer Ansammlung von Lymphozyten entsprach (Abb. 13). Ganz überwiegend fand sich eine Lokalisation dieser Infiltrate im Nierenkortex, spezifisch war zudem eine bevorzugt perivaskuläre Lokalisation der Infiltrate.

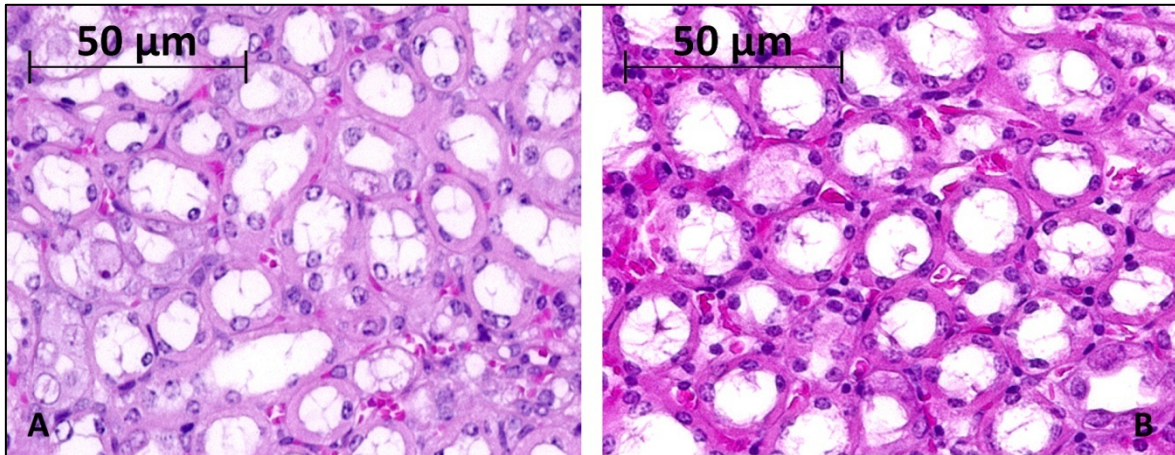


Abb. 12: Detailansicht unauffälliger Tubuli von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 (A) bzw 2 x 0,925 (B) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk.

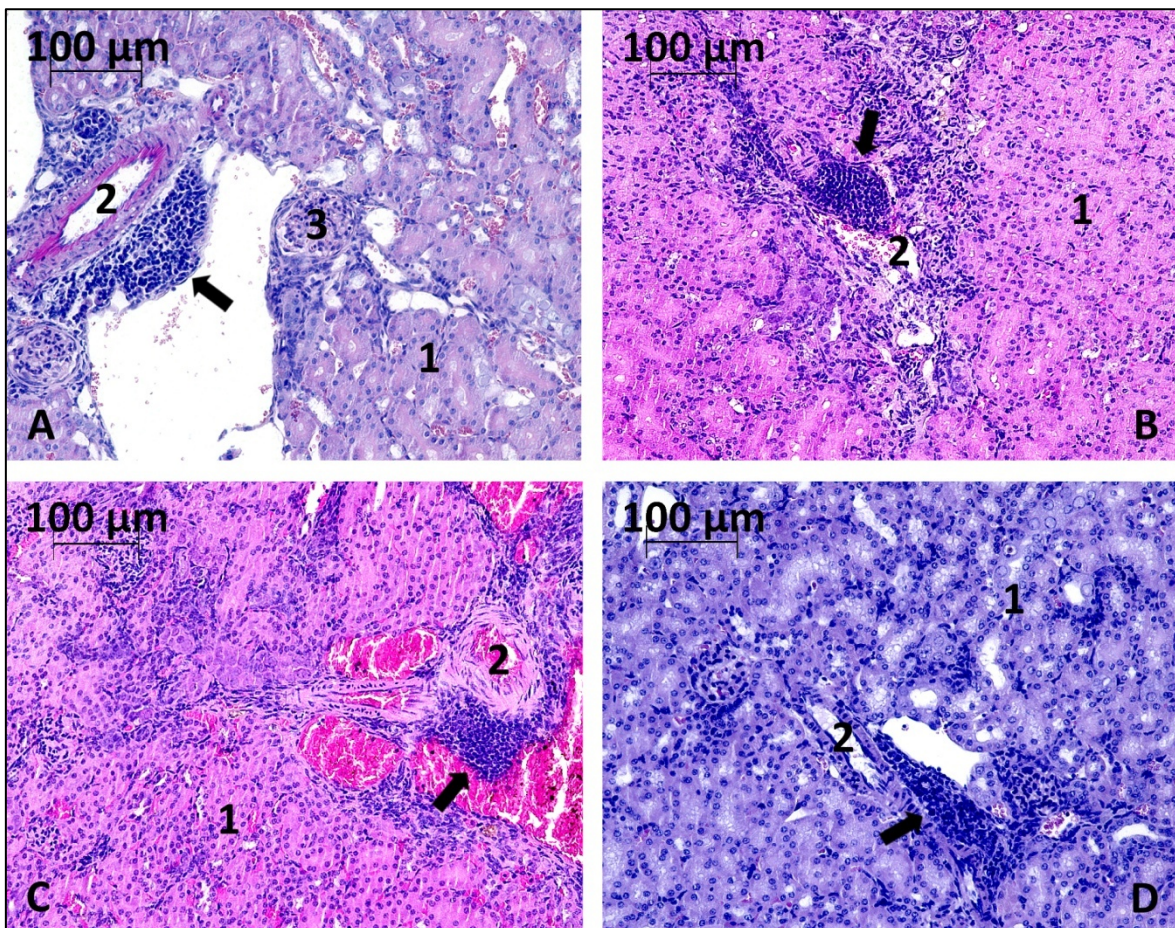


Abb. 13: Detailansicht der Nieren von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 (B), 2 x 0,925 (A, C) und 2 x 3,7 (D) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Kortex, 2: Gefäß, 3: Glomerulum, Pfeil: Lymphozytäres Infiltrat mit perivaskulärer Lokalisation.

Insgesamt wurde in n=20 Organen ( $\approx$ 57% aller untersuchten Organe) eine Entzündung beobachtet, die in n=19 ( $\approx$ 54% aller untersuchten Organe) als geringgradig und nur in einem Fall als mittelgradig klassifiziert wurde. Abb. 14 und 15 zeigen Übersichtsaufnahmen zweier repräsentativer Nieren von Swiss nu/nu-Mäusen nach intravesikaler Instillation von 0,925 (Abb. 14) bzw. 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk und sollen wiederum einen Eindruck des quantitativen Ausmaßes der Entzündung vermitteln. Auf beiden Abbildungen sind innerhalb des Nierenkortex sehr diskrete noduläre Ansammlungen von Lymphozyten (Pfeile) sichtbar. In beiden Fällen wurde die Entzündung als geringgradig klassifiziert.

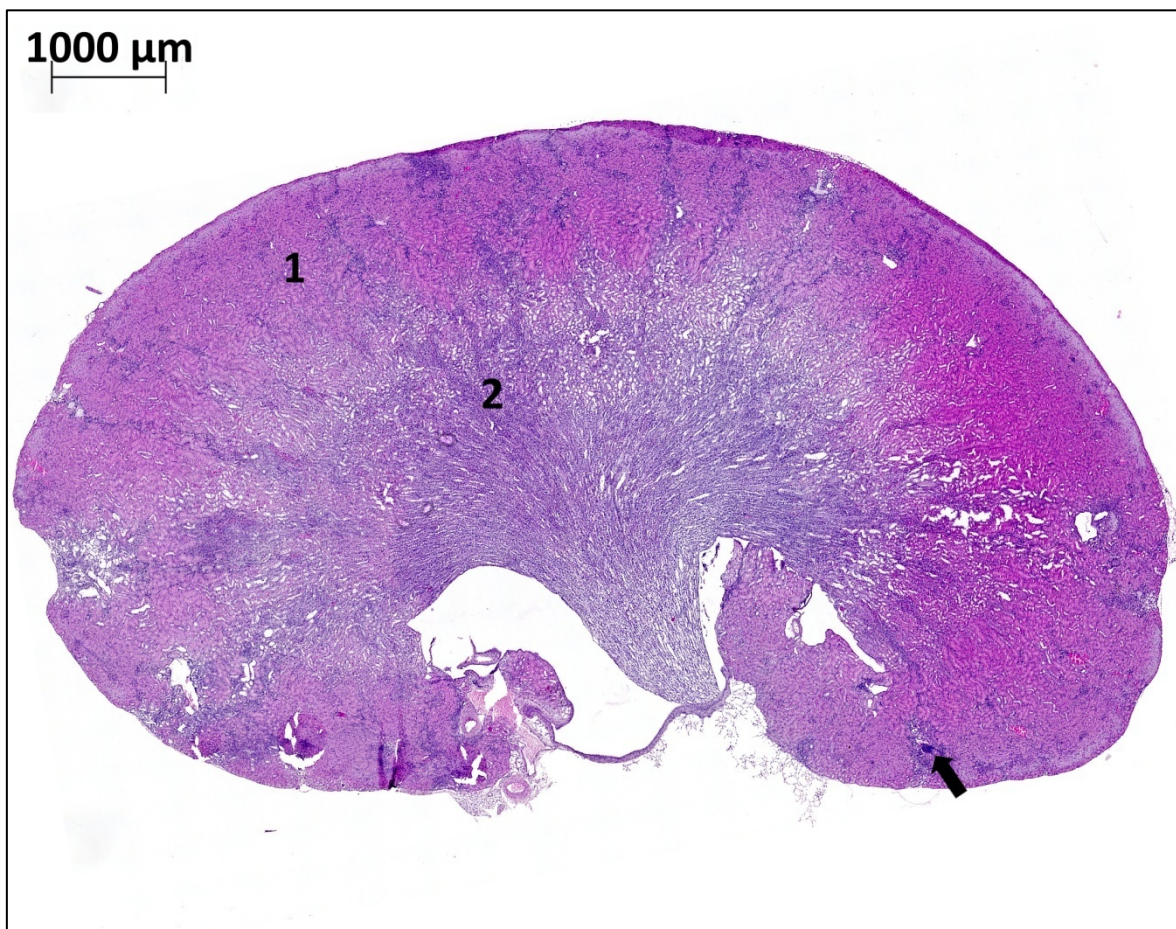


Abb. 14: Übersicht der Niere einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Kortex, 2: Medulla, Pfeil: Lymphozytäres Infiltrat. Die Entzündung wurde als geringgradig klassifiziert.



Abb. 15: Übersicht der Niere einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Kortex, 2: Medulla, Pfeile: Lymphozytäre Infiltrate. Die Entzündung wurde als geringgradig klassifiziert.

Auch bei den untersuchten Nieren hatte die Entzündung zu keiner erkennbaren Destruktion der Organe geführt. Abgesehen von den bereits beschriebenen Befunden konnten in keiner der untersuchten Nieren weitere Auffälligkeiten festgestellt werden.

Die Befunde hinsichtlich des beobachteten entzündlichen Infiltrats in Blasen und Nieren der in dieser Arbeit untersuchten Tiere sind in Tabelle 3 aufgeschlüsselt nach Applikationsschema, Tumorstillation und Kauterung der Blasenwand zusammengefasst.

Tabelle 3: Verteilung und Ausprägung der entzündlichen Infiltrate aller in dieser Arbeit untersuchten Tiere

Gruppe	Aktivität (MBq)	Instillation von EJ28-Zellen	Applikationsschema	Kauterung	n	Entzündliches Infiltrat in der Blase	Entzündliches Infiltrat in der Niere
A	0,925	nein	-	ja	1	-	-
					2	+	+
B	0,925	ja	7. Tag nach Tumorinstillation	ja	1	-	+
					2	++	+
					3	+	+
C	2 x 0,925	nein	Erneute Gabe nach 7 Tagen	ja	1	-	-
					2	+	-
					3	++	-
					4	+	+
					5	++	+
D	2 x 0,925	ja	1. und 7. Tag nach Tumorinstillation	ja	1	+	+
					2	+	+
					3	++	-
					4	+	+
					5	-	-
E	2 x 1,85	nein	Erneute Gabe nach 7 Tagen	nein	1	+	+
					2	+	+
F	2 x 3,70	nein	Erneute Gabe nach 7 Tagen	nein	1	+	+
					2	+	++

- = keine Entzündung + = geringgradige Entzündung , ++ = mittelgradige Entzündung, n.u. = nicht untersucht

## 5. Diskussion

### 5.1 Histopathologie der Harnblase nach Bi-213-anti-EGFR-mAk-Instillation

Der Alpha-Emitter Bi-213 ist hoch zytotoxisch, weist jedoch nur eine geringe Reichweite von 50 – 100 µm, entsprechend ungefähr drei bis vier Zelldurchmessern, auf. Zur Eradikation verbliebener Karzinomzellen nach TUR wird Bi-213-anti-EGFR-mAk intravesikal appliziert, die Wirkung des Alpha-Emitters auf die Blasenwand erfolgt somit vom Lumen her. Sofern es zu strahleninduzierten Veränderungen der Blase kommen sollte, wären somit aufgrund der geringen Reichweite von Bi-213 Veränderungen der direkt an das Lumen grenzenden Strukturen, insbesondere des Urothels, zu erwarten, während eine direkte Schädigung tiefer gelegener Schichten nicht wahrscheinlich ist. Tatsächlich zeigte sich in keinem der untersuchten Organe eine pathologische Veränderung der Zellen der Lamina propria oder der Tunica muscularis, einschließlich der Gefäße. Diese Beobachtung ist auch insofern von Bedeutung, als Gefäßschäden oft als (teil-)ursächlich für weitere sekundäre Veränderungen der Blase nach Bestrahlung, wie etwa dem Untergang von Muskel- und Urothelzellen, angesehen werden (Antonakopoulos et al., 1984, Antonakopoulos et al., 1982, Stewart et al., 1991, Stewart, 1991).

Aber auch das Urothel als direkt strahlenexponierte Struktur zeigte sich, mit Ausnahme einer Harnblase nach intravesikaler Instillation von 2 x 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk, in allen Fällen intakt. Strahlenschäden zeigen sich am Urothel aufgrund des langsamen Zellumsatzes mit einer Generationszeit von ungefähr 240 Tagen (Schreiber et al., 1969) im Allgemeinen erst spät. Die Entnahme der Organe dieser Studie erfolgte 300 Tage p.e., sodass sich eine eventuelle Schädigung des Urothels bereits manifestiert haben sollte.

Die in einem Fall bei einer instillierten Aktivität von 2 x 1,85 MBq erhobenen histologischen Befunde umfassen atypische Zellen mit vergrößerten Kernen, Hyperchromasie und irregulären Kernmembranen (Abb. 6). Da bisher keine Studien zur Auswirkung von Alpha-Strahlern auf das Urothel durchgeführt wurden, können nur andere Strahlenqualitäten zum Vergleich herangezogen werden – die in entsprechenden Publikationen beschriebenen Veränderungen des Urothels stehen jedoch in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden (Fajardo and Berthrong, 1978, Lopez-Beltran et al., 2002, Antonakopoulos et al., 1982). Unklar ist, wieso diese Veränderungen des Urothels bei 2 x 1,85 MBq, nicht aber bei 2 x 3,7 MBq zu beobachten waren. Eventuell sind hierfür leichte Abweichungen bei der Applikation

verantwortlich zu machen, die zu einer lokalen Anreicherung des Immunkonjugates innerhalb der Blase geführt haben könnten. Aufgrund der spezifischen Bindung von Bi-213-anti-EGFR-mAk an den EGF-Rezeptor ist jedoch insgesamt eine Schädigung von gesundem Urothel nicht zu erwarten. Bei den ebenfalls in diesem einen Fall bei 2 x 1,85 MBq beobachteten vesikulären Strukturen innerhalb des Urothels könnte es sich um Keimeinschlüsse handeln, möglicherweise aber auch um Veränderungen, die beim murinen Urothel als Reaktion auf verschiedene Noxen auftreten können und als Vakuolenbildung mit eosinophilen Einschlüssen beschrieben wurden (Frith, 1979)(Abb. 16).

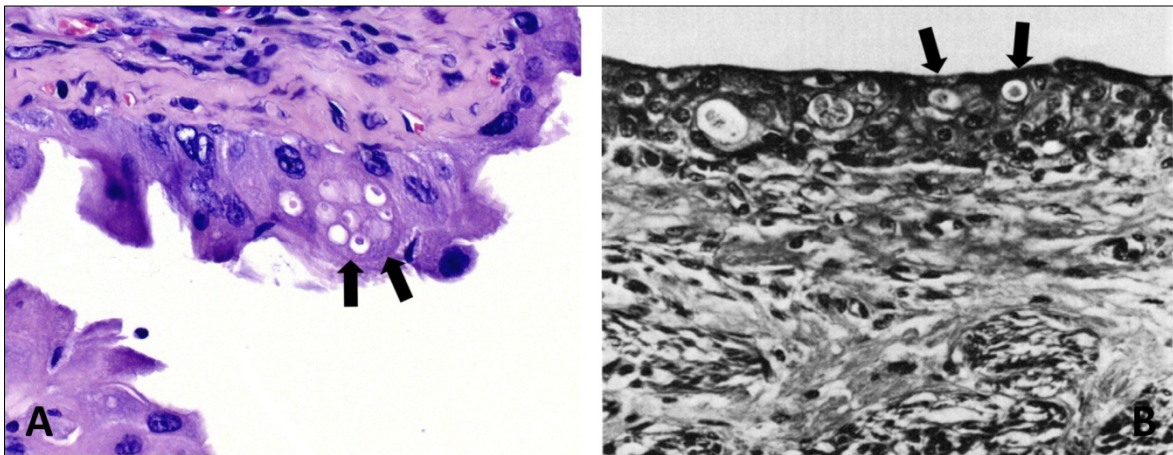


Abb. 16: A: Urothel einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. Pfeile: Vesikuläre Strukturen unklarer Natur innerhalb des Urothel. B: Analoge Veränderungen des murinen Urothels wurden als Reaktion auf Kanzerogene oder andere Noxen beschrieben. Abb. B übernommen aus Frith, 1979.

Neben diesen Veränderungen fand sich als einziger weiterer Befund in n=15 ( $\approx$ 79% aller untersuchten Organe) ein noduläres Infiltrat bestehend aus Lympho-, in einem Fall auch teilweise Histozyten. Naturgemäß handelt es sich hierbei um sehr unspezifische Befunde und bezüglich Ätiologie und Pathogenese können somit verschiedene Spekulationen angestellt werden. Wenn den beobachteten Infiltraten eine Infektion zugrunde liegen sollte, würde es sich dem mikroskopischen Erscheinungsbild nach um eine chronische Infektion handeln, die im Gegensatz zur neutrophil dominierten akuten Zystitis mit einem Infiltrat aus mononukleären Zellen einhergeht (Frith, 1979). Die Immundefizienz der verwendeten Swiss nu/nu-Mäuse würde hierbei einen zusätzlich begünstigenden Faktor darstellen (Hopkins et al., 1993). Eine Aszension der Infektion könnte auch die in einem Teil der untersuchten Nieren beobachteten entzündlichen Infiltrate erklären. Ätiologisch ist neben einer Infektion im Rahmen der Tierhaltung natürlich auch



an eine Verursachung durch Bi-213-anti-EGFR-mAk zu denken. Als ein möglicher Mechanismus wäre hier beispielsweise an eine subzelluläre Schädigung der physiologisch wichtigen Urothelbarriere mit konsekutiver Zystitis zu denken.

Gegen eine infektiöse Ursache spricht allerdings, dass an keiner der untersuchten Harnblasen, wie auch der Nieren, eine Destruktion des Organs festgestellt werden konnte, die bei einer chronischen Infektion, insbesondere bei bestehender Immundefizienz, zu erwarten wäre.

Über Entzündungen der Blase wurde bereits für andere Strahlenqualitäten berichtet und auch hier wurde eine Schädigung des Urothels als potentieller Mechanismus angeführt (Stewart et al., 1991). Insofern näher auf die zelluläre Zusammensetzung des Infiltrates eingegangen wird, werden bei der Ratte (Vale et al., 1993), der Maus (Stewart et al., 1991) und beim Menschen (Antonakopoulos et al., 1984) in einem Zeitraum von sechs bis 12 Monaten p.e., bzw. zu unterschiedlichsten Zeitpunkten (Antonakopoulos et al., 1984) heterogene Infiltrate aus Granulozyten (Vale et al., 1993, Stewart et al., 1991, Antonakopoulos et al., 1984) und Plasmazellen (Vale et al., 1993) bzw. Makrophagen (Antonakopoulos et al., 1984) beschrieben. Somit entsprechen diese Befunde nicht der Zusammensetzung der hier beobachteten, homogenen lymphozytären Infiltrate.

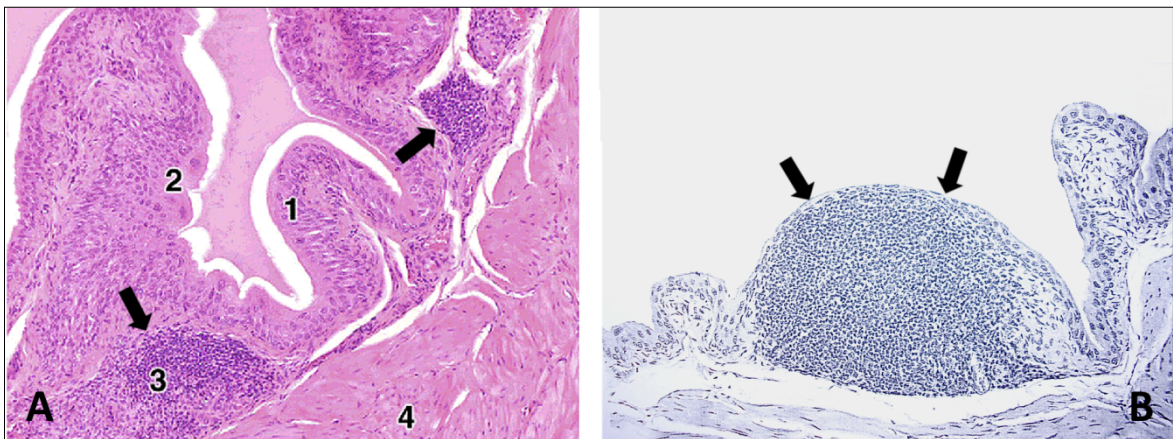


Abb. 17: Murine Blasen mit nodulären lymphozytären Infiltraten (Pfeile) als Normalbefund. Abb. übernommen aus Hedrich and Bullock, 2004 (A) bzw. Maronpot et al. 1999 (B).

Andererseits werden entzündliche Infiltrate, vor allem bei älteren Mäusen, als häufig anzutreffender Normalbefund angesehen (Maronpot et al., 1999, Hedrich and Bullock, 2004, Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory. and Green, 1966, Frith, 1979). Histologisch wurden diese Infiltrate als noduläre Ansammlung von gleichförmigen Lymphozyten beschrieben (Maronpot et

al., 1999, Hedrich and Bullock, 2004)(Abb. 17); das histologische Erscheinungsbild entspricht somit exakt den Beobachtungen dieser Studie. Allerdings scheinen bisher keine Daten über die Prävalenz dieser Befunde erhoben worden zu sein – somit ist auch unklar, ob die Häufigkeit in anderen Mauspopulationen der Prävalenz der Veränderungen in dieser Arbeit entspricht.

## **5.2 Histopathologie der Niere nach Bi-213-anti-EGFR-mAk-Instillation**

Zu einer Schädigung der Niere bei der intravesikalen Therapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk könnte es zum einen durch einen applikationsbedingten Aufstieg des Konjugats über den Ureter, zum anderen durch einen Übertritt des Radioimmunkonjugats in das Blut über die bei der Kauterung bzw. TUR geschaffene Läsion kommen. Während bei einem Aufstieg von Bi-213-anti-EGFR-mAk über die Ureter intakte Radioimmunkonjugate die Niere erreichen und so potentiell ubiquitäre Läsionen erzeugen können, spielt bei sich im Kreislauf befindenden Konjugaten v.a. vom Immunkomplex abgelöstes Bismuth (Pfof, 2009, Beck et al., 2007) eine Rolle, da das Molekulargewicht von anti-EGFR mit 180 kDa deutlich über der Filtrationsgrenze von  $\approx 75$  kDa liegt. In diesem Fall wäre vor allem eine Schädigung der Nierenrinde zu erwarten, da freies Bismuth sich hier bevorzugt ablagert (Russ et al., 1975, Zidenberg-Cherr et al., 1987). Allerdings haben Untersuchungen zur Biodistribution von intravesikal instilliertem Bi-213-anti-EGFR-mAk gezeigt, dass 90 min nach intravesikaler Applikation von 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk sowohl bei intakter (1,5% inj. Akt./g) als auch bei gekauterter (2,7% inj. Akt./g) Blasenwand nur eine sehr moderate Anreicherung in der Niere zu erwarten ist (Pfof et al., 2009, Pfof, 2009).

Im Gegensatz zur Harnblase können im Fall der Niere spezifische Studien zu Nebenwirkungen der i.v.- bzw. i.p-applizierten Radioimmuntherapie mit Alpha-Strahlern einschließlich Bi-213 vergleichend herangezogen werden. Die in einem Zeitraum von 20 bis 40 Wochen p.e. beobachteten Veränderungen umfassen Hyalinisierung und Sklerose der Glomeruli (Jaggi et al., 2005, Beck et al., 2007), Dilatation des Bowman-Raums (Jaggi et al., 2005), Atrophie, Lyse bzw. Nekrose des Tubulusepithels (Jaggi et al., 2005, Beck et al., 2007, Song et al., 2007), intraluminale Zylinder (Jaggi et al., 2005, Song et al., 2007), Tubulusepithelzellen mit prominenten Kernen, Pyknose, Karyorrhesis, Schwellung, Vakuolen, verdickte Basalmembran und Kollaps (Jaggi et al., 2005), Dilatation der Tubuli (Song et al., 2007), Narbenbildung (Jaggi et al., 2005, Beck et al., 2007) und Fibrose (Jaggi et al., 2005). Keine dieser Veränderungen - auch nicht bei Aktivitäten oberhalb des therapeutischen Bereichs - wurde in dieser Studie beobachtet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Retention des Radioimmunkonjugats in der intakten Blase exzellent ist und es

auch bei Kauterung der Blasenwand nur zu einem moderaten Anstieg der Aktivität in der Niere kommt (Pfof, 2009, Pfof et al., 2009). Entsprechend waren bei intravesikaler Gabe geringere Schädigungen als bei i.v.- bzw. i.p.-Applikation zu erwarten. Als einzige Auffälligkeit zeigte sich in dieser Arbeit analog zu den Harnblasen auch bei den Nieren ein homogenes lymphozytäres Infiltrat, das in den Nieren bevorzugt perivaskulär lokalisiert war. Die Ausprägung war diskret, entsprechend wurde das inflammatorische Infiltrat in n=19 (entsprechend ca. 54% aller untersuchten Organe) als geringgradig und nur in einem Fall als mittelgradig klassifiziert. Neben den oben aufgeführten Befunden wurden nach i.v.- bzw. i.p.-Applikation eines Alpha-Emitters-Immunkonjugats bei der Maus (Jaggi et al., 2005) bzw. beim Affen (Miederer et al., 2004) auch entzündliche, noduläre Infiltrate aus perivaskulär lokalisierten Lymphozyten (Jaggi et al., 2005) bzw. mononukleären Zellen (Miederer et al., 2004) beobachtet, die den Befunden dieser Arbeit entsprechen könnten. Jedoch werden analog zur Harnblase auch bei der murinen Niere lymphozytäre Infiltrate als Normalbefunde ohne pathologische Bedeutung beschrieben, wobei sich auch hier bevorzugt eine perivaskuläre Lokalisation findet. (Maronpot et al., 1999). Die Häufigkeit dieser Infiltrate in der murinen Niere wird mit 25% angegeben (Maronpot et al., 1999) – wohingegen die Prävalenz in dieser Studie bei 57% lag. Allerdings sind keine spezifischen Daten zur Prävalenz bei Nacktmäusen verfügbar.

### **5.3 Schlussfolgerungen**

Bei der intravesikalen Therapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk sollte gesundes Urothel aufgrund der spezifischen Bindung dieses Radioimmunkonjugats an den EGF-Rezeptor nicht oder nur sehr gering beeinträchtigt werden. In dieser Studie wurden Auffälligkeiten des Urothels nur in einem Fall bei einer applizierten Aktivität von  $2 \times 1,85$  MBq beobachtet. Diese Veränderungen sind gut durch die Wirkung eines Alpha-Emitters zu erklären, können jedoch unter praktischen Gesichtspunkten vernachlässigt werden, da bereits (fraktionierte) Gaben von 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk sehr effizient sind und höhere Aktivitäten keinen weiteren therapeutischen Vorteil mit sich bringen.

Als einziger weiterer Befund wurden sowohl in Harnblasen als auch in Nieren (noduläre) lymphozytäre Infiltrate beobachtet. Das Auftreten entzündlicher Infiltrate nach Strahlenexposition ist sowohl für die Blase, als auch für die Niere beschrieben, jedoch wurden bisher nur im Fall der Niere die Wirkungen von Alpha-Emittern untersucht. Für die Harnblase wurden bei externer Bestrahlung mit anderen Strahlenqualitäten granulozytäre (Vale et al., 1993,

Stewart et al., 1991, Antonakopoulos et al., 1984), oder gemischte Infiltrate aus Granulozyten und Plasmazellen (Vale et al., 1993) bzw. Makrophagen (Antonakopoulos et al., 1984) beschrieben, die somit nicht den homogenen lymphozytären Infiltraten dieser Studie entsprechen. Allerdings ist unklar, inwiefern sich die Ergebnisse bei anderen Strahlenqualitäten auf den Alpha-Emitter Bi-213 (z.B. aufgrund des höheren LET, der geringeren Reichweite sowie der abweichenden Applikationsform) übertragen lassen. Die nach i.v.- bzw. i.p.-Applikation von Alpha-Emitter-Immunkonjugaten in zwei Studien an den Nieren aufgetretenen nodulären lymphozytären bzw. mononukleären (Jaggi et al., 2005, Miederer et al., 2004) Infiltrate könnten hingegen den Befunden dieser Arbeit entsprechen.

Allerdings treten entzündliche Infiltrate sowohl in der murinen Harnblase als auch in der murinen Niere nicht selten als Normalbefund ohne pathologische Bedeutung auf (Maronpot et al., 1999, Hedrich and Bullock, 2004, Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory. and Green, 1966, Frith, 1979). Histologisch wurden dieses Infiltrate in der Blase als noduläre (Maronpot et al., 1999, Hedrich and Bullock, 2004) bzw. in der Niere als perivaskuläre (Maronpot et al., 1999) Ansammlung von gleichförmigen Lymphozyten beschrieben und entsprechen somit sehr genau den Beobachtungen dieser Studie. Für die murine Harnblase scheinen keine Daten zur Prävalenz dieser Befunde verfügbar zu sein. Bei der murinen Niere wird die Häufigkeit mit 25% angegeben (Maronpot et al., 1999) wohingegen sich in dieser Studie in 57% entsprechende Veränderungen fanden. Möglich ist, dass sich bei Swiss nu/nu-Mäusen eine entsprechend höhere Prävalenz findet, so lange allerdings kein direkter Vergleich mit einer Kontrollgruppe von unbehandelten Swiss nu/nu-Mäusen erfolgt ist, bleibt eine ätiologische Einordnung spekulativ.

Festgehalten werden kann jedoch, dass die entzündlichen Infiltrate in Harnblase und Niere in den meisten Fällen gering-, nur in einigen Fällen mittel- in keinem aber hochgradig ausgeprägt und es in keinem Fall zu einer Destruktion des betroffenen Organs gekommen war. Sogar wenn diese Infiltrate also durch die intravesikale Gabe von Bi-213-anti-EGFR-mAk bedingt sein sollten, ginge diese Therapie immer noch mit geringen Schädigungen einher. Zusätzlich hierzu konnten bei keinem der Tiere mit vorangegangener Instillation von EJ28-Zellen (n=8) Karzinomzellen nachgewiesen werden. Dieser Befund unterstreicht die Effektivität der intravesikalen Therapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk zur Eradikation von Urothelkarzinomzellen in vivo bei allenfalls geringer Toxizität.

## 6. Zusammenfassung

In der überwiegenden Zahl der Fälle wird das Urothelkarzinom in einem nicht-muskelinvasiven Stadium diagnostiziert. Die Standardbehandlung besteht in diesem Stadium aus transurethraler Resektion (TUR) und, um verbliebene maligne Zellen abzutöten, nachfolgender intravesikaler Chemotherapie. Trotzdem kommt es innerhalb eines medianen Follow-up von 26 Monaten in ca. 45% zu einem Rezidiv. Die intravesikale Radioimmuntherapie (RIT) mit Bi-213-anti-EGFR-mAk ist ein neuer Ansatz, um diese hohe Rezidivrate nach TUR zu senken. Es wurde bereits gezeigt, dass die intravesikale Therapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk bei Swiss nu/nu-Mäusen das Überleben nach Instillation von EJ28-Urothelkarzinomzellen signifikant verlängert und dem Standardchemotherapeutikum Mitomycin C überlegen ist. EGFR wird in bis zu 86% aller Urothelkarzinome überexprimiert, wodurch eine weitgehend selektive Bindung von Bi-213-anti-EGFR-mAk an die Karzinomzellen bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Urothels gewährleistet wird. Der Alpha-Emitter Bi-213 eradiziert aufgrund der hohen zytotoxischen Potenz bei einer geringen Reichweite von 50-100 µm gezielt Karzinomzellen.

Das Ziel dieser Studie war die histopathologische Evaluation der Toxizität von intravesikal instilliertem Bi-213-anti-EGFR-mAk an Harnblasen und Nieren von Swiss nu/nu-Mäusen. Während die Harnblase bei der intravesikalen RIT das direkt strahlenexponierte Organ darstellt, könnte eine Schädigung der Niere bedingt sein durch einen Aufstieg von Bi-213-anti-EGFR-mAk über die Ureteren oder durch einen Übertritt des Konjugats in das Blut durch die bei TUR geschaffene Läsion der Blasenwand, die hier mittels Kauterung simuliert wurde. Bei einer Verteilung von Bi-213-anti-EGFR-mAk im Kreislauf ist eine Anreicherung in der Niere zu erwarten, da sich sowohl Antikörperfragmente als auch freies Bi-213 bevorzugt in der Niere ablagern.

Untersucht wurden Tiere mit bzw. ohne vorherige Instillation von EJ28-Urothelkarzinomzellen, die wie folgt mit Bi-213-anti-EGFR-mAk behandelt wurden: Einmalig mit 0,925 MBq (n=5; 3 Tiere mit / 2 ohne EJ28 Zellen), zweimalig mit 0,925 MBq (n=10; je 5 Tiere mit/ohne EJ28 Zellen), zweimalig mit 1,85 MBq (n=2; Tiere ohne EJ28 Zellen) oder zweimalig mit 3,7 MBq (n=2; Tiere ohne EJ28). Die Organe wurden 300 Tage nach Instillation von Bi-213-anti-EGFR-mAk entnommen, für die Histologie aufgearbeitet, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert.

Bei applizierten Aktivitäten von 0,925 bzw. 2 x 0,925 MBq zeigten sich keine Veränderungen des Urothels. Lediglich bei 2 x 1,85 MBq wurden in einem Fall fokale Veränderungen in Form von atypischen Zellen, vergrößerten Kernen, Hyperchromasie und irregulären Kernmembranen

beobachtet. Diese Veränderungen stimmen gut mit Befunden überein, die bei anderen Strahlenqualitäten am Urothel beobachtet wurden, können jedoch unter praktischen Gesichtspunkten vernachlässigt werden, da bereits (fraktionierte) Gaben von 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk sehr effizient sind und höhere Aktivitäten keinen weiteren therapeutischen Vorteil mit sich bringen. In Blasen und Nieren wurde als einziger weiterer Befund ein noduläres Infiltrat aus Lympho-, in einem Fall auch Histiozyten beobachtet. An den Harnblasen war die Entzündung meist geringgradig (11/19), seltener mittelgradig (4/19) ausgeprägt.

An den Nieren zeigte sich lediglich in einem Fall eine mittelgradige, beim Rest der betroffenen Organe eine geringgradige (19/35) Entzündung. Eine chronische, ascendierende Zystitis könnte sowohl die Infiltrate in den Blasen als auch den Nieren erklären, allerdings wäre in diesem Fall eine Destruktion der Organe zu erwarten, die jedoch in keinem Fall beobachtet wurde. Nach externer Bestrahlung der Harnblase mit anderen Strahlenqualitäten ist das Auftreten von Entzündungszellen ein bekannter Befund. Die zelluläre Zusammensetzung dieser Infiltrate entspricht jedoch nicht den homogenen lymphozytären Infiltraten, die in dieser Studie beobachtet wurden. In der Niere wurde nach i.v.- bzw. i.p.-Applikation von Alpha-Emitter-Immunkonjugaten das Auftreten von entzündlichen Infiltraten beschrieben, deren histologisches Erscheinungsbild gut mit den Befunden in dieser Arbeit übereinstimmt. Andererseits finden sich noduläre Ansammlungen von Lymphozyten sowohl in der murinen Blase als auch der Niere nicht selten als Normalbefund ohne pathologische Bedeutung. Für die murine Blase sind bisher keine Daten zur Prävalenz dieser Befunde verfügbar, bei der murinen Niere wird die Häufigkeit mit 25% angegeben, wohingegen die Prävalenz in dieser Studie bei 57% lag. Möglicherweise sind diese Befunde bei Nacktmäusen entsprechend häufiger zu finden, spezifische Daten hierzu sind jedoch nicht verfügbar. Ohne einen direkten Vergleich mit einer Kontrollgruppe von unbehandelten Swiss nu/nu-Mäusen bleibt eine ätiologische Einordnung der beobachteten entzündlichen Infiltrate in Blasen und Nieren letztlich spekulativ und ein Zusammenhang mit der intravesikalen Applikation von Bi-213-anti-EGFR-mAk kann nicht definitiv ausgeschlossen werden. Festgehalten werden kann jedoch, dass die entzündlichen Infiltrate in Harnblasen und Nieren in den meisten Fällen gering-, nur in einigen Fällen mittel- in keinem Fall aber hochgradig ausgeprägt und es nie zu einer Destruktion des betroffenen Organs gekommen war. Auch wenn diese Infiltrate also durch die intravesikale Gabe von Bi-213-anti-EGFR-mAk bedingt sein sollten, würde diese Therapie lediglich mit geringen Schädigungen einhergehen. Darüber hinaus konnten bei keinem der Tiere mit vorangegangener Instillation von EJ28-Zellen (n=8) Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieser Befund unterstreicht nochmals die Effektivität der intravesikalen Therapie mit Bi-213-anti-EGFR-mAk zur Eradikation von Urothelkarzinomzellen in vivo bei allenfalls geringer Toxizität.



## **7. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Reingard Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas und die sehr freundliche und liebenswürdige Betreuung. Außerdem danke ich meiner gesamten Arbeitsgruppe für die nette Aufnahme, die außergewöhnlich gute Stimmung und insbesondere Frau Annette Frank, Frau Christina Lesti und Herr Dr. Christof Seidl für die immer sehr freundliche und geduldige Hilfe. Herrn PD Dr. Gregor Weirich danke ich für die Unterstützung bei der Befundung der Präparate. Den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Klinikums Rechts der Isar danke ich für die Möglichkeit, an ihren Geräten arbeiten zu können. Frau Dr. Sarah Longhi vom Deutschen Herzzentrum München danke ich für die vielen Ratschläge und die sehr nette Unterstützung beim Mikroskopieren.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

% inj. Akt./g	Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe
µm	Mikrometer
µsec	Mikrosekunden
BCG	Bacillus Calmette-Guèrin
Bi-213	Bismuth-213
d	Tage
Da	Dalton
EGFR	Epidermal growth factor-Rezeptor
h	Stunden
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
keV	Kilo-Elektronenvolt
LET	Linearer Energietransfer
mAk	Monoklonaler Antikörper
MBq	Megabecquerel
min	Minuten
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.e.	post expositionem
s	Sekunden
TUR	Transurethrale Resektion
Z.n.	Zustand nach

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Bindung des Radioimmunkonjugats Bi-213-anti-EGFR-mAk an den EGF-Rezeptor auf einer Urothelkarzinomzelle.

Abb. 2: A: Immunhistochemie und Hämatoxylinfärbung einer murinen Blase mit Urothelkarzinom der Blasenwand nach EJ28-Zell-Instillation. Die Bindung von anti-EGFR-mAk stellt sich bräunlich dar. B: Murine Blase ohne EJ28-Zell-Instillation. Abb. übernommen aus Pfof et al. 2009.

Abb. 3: Schematische Darstellung eines durch Alpha-Strahlung induzierten DNS-Doppelstrangbruchs im Vergleich mit Gamma-Strahlung.

Abb. 4: Zerfallsschema von Actinium-225. Abb. übernommen aus Pfof 2009.

Abb. 5: Detailansicht von unauffälligem Urothel von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 (A,B), 2 x 1,85 (C) und 2 x 3,7 (D) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Lamina propria, 3: Tunica muscularis

Abb. 6: Detailansicht der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Lamina propria. Pfeile: Fokale Veränderungen in Form von vergrößerten Kernen, Hyperchromasie und irregulären Kernmembranen, außerdem vesikuläre Strukturen unklarer Natur innerhalb des Urothels.

Abb. 7: Unauffällige Detailansichten der Harnblasenwand von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 (A,B,D) bzw. 0,925 (C) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Tunica muscularis, 3: Fettgewebe, 4: Gefäß

Abb. 8: Harnblasen von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 (A,B,D,E,F) bzw. 2 x 1,85 (C) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Urothel, 2: Lamina propria, 3: Gefäß, 4: Tunica muscularis. Pfeile: Noduläre Infiltrate von Lymphozyten (A,B,C,D,E), teilweise auch Histiocyten (F) in der Lamina propria bzw. Tunica muscularis.

Abb. 9: Übersicht der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Lumen, 2 : Urothel und Lamina propria, 3 : Tunica muscularis. Pfeile: Lymphozytäres Infiltrat. Die Entzündung wurde als geringgradig klassifiziert.

Abb. 10: Übersicht der Harnblase einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Lumen, 2: Urothel und Lamina propria, 3: Tunica muscularis, 4 Fettgewebe. Pfeile: Lymphozytäres, teils histiozytäres Infiltrat. Die Entzündung wurde als mittelgradig klassifiziert. Teilweise erscheint das Urothel verdickt – dieser Befund ist nicht im Sinne einer Hyperplasie zu interpretieren, sondern durch die geringe Dehnung bei der Fixierung zu erklären.

Abb. 11: Detailansicht unauffälliger Glomeruli von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 (A) bzw 2 x 0,925 (B) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Tubuli, 2: Glomerulum, 3: Macula densa. Pfeil: Bowman-Raum

Abb. 12: Detailansicht unauffälliger Tubuli von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 (A) bzw 2 x 0,925 (B) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk

Abb. 13: Detailansicht der Nieren von Swiss nu/nu-Mäusen 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 (B), 2 x 0,925 (A, C) und 2 x 3,7 (D) MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Kortex, 2: Gefäß, 3: Glomerulum, Pfeil: Lymphozytäres Infiltrat mit perivaskulärer Lokalisation.

Abb. 14: Übersicht der Niere einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Kortex, 2: Medulla, Pfeil: Lymphozytäres Infiltrat. Die Entzündung wurde als geringgradig klassifiziert.

Abb. 15: Übersicht der Niere einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 0,925 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. 1: Kortex, 2: Medulla, Pfeile: Lymphozytäre Infiltrate. Die Entzündung wurde als geringgradig klassifiziert.

Abb. 16: A: Urothel einer Swiss nu/nu-Maus 300 Tage nach intravesikaler Instillation von 2 x 1,85 MBq Bi-213-anti-EGFR-mAk. Pfeile: Vesikuläre Strukturen unklarer Natur innerhalb des Urothel. B: Analoge Veränderungen des murinen Urothels wurden als Reaktion auf Kanzerogene oder andere Noxen beschrieben. Abb. B übernommen aus Frith, 1979.

Abb. 17: Murine Blasen mit nodulären lymphozytären Infiltraten (Pfeile) als Normalbefund. Abb. übernommen aus Hedrich and Bullock, 2004 (A) bzw. Maronpot et al. 1999 (B).

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit besprochenen histologischen Studien zur Wirkung von Alpha-Emitter-Immunkonjugaten auf die Niere

Tabelle 2: Übersicht über applizierte Aktivität, Tumorinstillation und Kauterung der Blase in dieser Arbeit untersuchten Swiss nu/nu-Mäuse (n=19)

Tabelle 3: Verteilung und Ausprägung der entzündlichen Infiltrate aller in dieser Arbeit untersuchten Tiere

## 11. Literaturverzeichnis

- ALLEN, B. J., RAJA, C., RIZVI, S., LI, Y., TSUI, W., GRAHAM, P., THOMPSON, J. F., REISFELD, R. A. & KEARSLEY, J. 2005. Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol Ther*, 4, 1318-24.
- ANDERSSON, H., CEDERKRANTZ, E., BACK, T., DIVGI, C., ELGQVIST, J., HIMMELMAN, J., HORVATH, G., JACOBSSON, L., JENSEN, H., LINDEGREN, S., PALM, S. & HULTBORN, R. 2009. Intraperitoneal alpha-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of (211)At-MX35 F(ab')<sub>2</sub>--a phase I study. *J Nucl Med*, 50, 1153-60.
- ANTONAKOPOULOS, G. N., HICKS, R. M. & BERRY, R. J. 1984. The subcellular basis of damage to the human urinary bladder induced by irradiation. *J Pathol*, 143, 103-16.
- ANTONAKOPOULOS, G. N., HICKS, R. M., HAMILTON, E. & BERRY, R. J. 1982. Early and late morphological changes (including carcinoma of the urothelium) induced by irradiation of the rat urinary bladder. *Br J Cancer*, 46, 403-16.
- APODACA, G. 2004. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5, 117-28.
- BABJUK, M., OOSTERLINCK, W., SYLVESTER, R., KAASINEN, E., BOHLE, A., PALOU-REDORTA, J. & ROUPRET, M. 2011. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol*, 59, 997-1008.
- BARENSEN, G. W. 1962. Dose-survival curves of human cells in tissue culture irradiated with alpha-, beta-, 20-kV. x- and 200-kV. x-radiation. *Nature*, 193, 1153-5.
- BECK, R., SEIDL, C., PFOST, B., MORGENSTERN, A., BRUCHERTSEIFER, F., BAUM, H., SCHWAIGER, M. & SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE, R. 2007. 213Bi-radioimmunotherapy defeats early-stage disseminated gastric cancer in nude mice. *Cancer Sci*, 98, 1215-22.
- BEHR, T. M., SHARKEY, R. M., SGOUROS, G., BLUMENTHAL, R. D., DUNN, R. M., KOLBERT, K., GRIFFITHS, G. L., SIEGEL, J. A., BECKER, W. S. & GOLDENBERG, D. M. 1997. Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer*, 80, 2591-610.
- BIRD, R. P., ROHRIG, N., COLVETT, R. D., GEARD, C. R. & MARINO, S. A. 1980. Inactivation of synchronized Chinese Hamster V79 cells with charged-particle track segments. *Radiat Res*, 82, 277-89.
- BOHLE, A., JOCHAM, D. & BOCK, P. R. 2003. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol*, 169, 90-5.

- BOHRER, M. P., DEEN, W. M., ROBERTSON, C. R., TROY, J. L. & BRENNER, B. M. 1979. Influence of molecular configuration on the passage of macromolecules across the glomerular capillary wall. *J Gen Physiol*, 74, 583-93.
- BUTTYAN, R., CHICHESTER, P., STISSER, B., MATSUMOTO, S., GHAFAR, M. A. & LEVIN, R. M. 2003. Acute intravesical infusion of a cobalt solution stimulates a hypoxia response, growth and angiogenesis in the rat bladder. *J Urol*, 169, 2402-6.
- CHENG, J., HUANG, H., ZHANG, Z. T., SHAPIRO, E., PELLICER, A., SUN, T. T. & WU, X. R. 2002. Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumor growth. *Cancer Res*, 62, 4157-63.
- CYBULLA, M., WEINER, S. M. & OTTE, A. 2001. End-stage renal disease after treatment with 90Y-DOTATOC. *Eur J Nucl Med*, 28, 1552-4.
- FAJARDO, L. F. & BERTHRONG, M. 1978. Radiation injury in surgical pathology. Part I. *Am J Surg Pathol*, 2, 159-99.
- FARSUND, T. 1975. Cell kinetics of mouse urinary bladder epithelium. I. Circadian and age variations in cell proliferation and nuclear DNA content. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 18, 35-49.
- FLYNN, A. A., PEDLEY, R. B., GREEN, A. J., DEARLING, J. L., EL-EMIR, E., BOXER, G. M., BODEN, R. & BEGENT, R. H. 2003. The nonuniformity of antibody distribution in the kidney and its influence on dosimetry. *Radiat Res*, 159, 182-9.
- FRITH, C. H. 1979. Morphologic classification of inflammatory, nonspecific, and proliferative lesions of the urinary bladder of mice. *Invest Urol*, 16, 435-44.
- GLATSTEIN, E., FAJARDO, L. F. & BROWN, J. M. 1977. Radiation injury in the mouse kidney--I. Sequential light microscopic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2, 933-43.
- GOWING, N. 1960. III. Pathological changes in the bladder following irradiation *Br J Radiol*, 33, 484-487.
- GUDE, W. D., COSGROVE, G. E. & HIRSCH, G. P. 1982. *Histological atlas of the laboratory mouse*, New York, Plenum.
- HEDRICH, H. J. & BULLOCK, G. R. 2004. *The laboratory mouse*, Amsterdam ; Boston, Elsevier Academic Press.
- HOPKINS, W. J., JAMES, L. J., BALISH, E. & UEHLING, D. T. 1993. Congenital immunodeficiencies in mice increase susceptibility to urinary tract infection. *J Urol*, 149, 922-5.
- HUEPER, W. C., FISHER, C. V., CARVAJAL-FORERO, J. D. & THOMPSON, M. R. 1942. The pathology of experimental roentgen cystitis in dogs. *J Urol*, 47, 156-167.
- HUSMANN, G. 2010. *Krebs in Deutschland 2005/2006 : Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.*, Berlin Saarbrücken, Robert Koch-Inst. GEKID.

- JAAL, J. & DÖRR, W. 2010. Radiation effects on cellularity, proliferation and EGFR expression in mouse bladder urothelium. *Radiat Res*, 173, 479-85.
- JAGGI, J. S., SESHAN, S. V., MCDEVITT, M. R., LAPERLE, K., SGOUROS, G. & SCHEINBERG, D. A. 2005. Renal tubulointerstitial changes after internal irradiation with alpha-particle-emitting actinium daughters. *J Am Soc Nephrol*, 16, 2677-89.
- JORDAN, S. W., KEY, C. R., GOMEZ, L. S., AGNEW, J. & BARTON, S. L. 1978. Late effects of radiation on the mouse kidney. *Exp Mol Pathol*, 29, 115-29.
- JURCIC, J. G., LARSON, S. M., SGOUROS, G., MCDEVITT, M. R., FINN, R. D., DIVGI, C. R., BALLANGRUD, A. M., HAMACHER, K. A., MA, D., HUMM, J. L., BRECHBIEL, M. W., MOLINET, R. & SCHEINBERG, D. A. 2002. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood*, 100, 1233-9.
- KENNEL, S. J., STABIN, M., ROESKE, J. C., FOOTE, L. J., LANKFORD, P. K., TERZAGHI-HOWE, M., PATTERSON, H., BARKENBUS, J., POPP, D. M., BOLL, R. & MIRZADEH, S. 1999. Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroid cultures of tumor cells. *Radiat Res*, 151, 244-56.
- KINSELLA, T. J., SINDELAR, W. F., DELUCA, A. M., BARNES, M., TOCHNER, Z., MIXON, A. & GLATSTEIN, E. 1988. Tolerance of the canine bladder to intraoperative radiation therapy: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 14, 939-46.
- LAMBERT, B., CYBULLA, M., WEINER, S. M., VAN DE WIELE, C., HAM, H., DIERCKX, R. A. & OTTE, A. 2004. Renal toxicity after radionuclide therapy. *Radiat Res*, 161, 607-11.
- LAMM, D. L., RIGGS, D. R., TRAYNELIS, C. L. & NSEYO, U. O. 1995. Apparent failure of current intravesical chemotherapy prophylaxis to influence the long-term course of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 153, 1444-50.
- LLOYD, E. L., GEMMELL, M. A., HENNING, C. B., GEMMELL, D. S. & ZABRANSKY, B. J. 1979. Cell survival following multiple-track alpha particle irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 35, 23-31.
- LOPEZ-BELTRAN, A., LUQUE, R. J., MAZZUCHELLI, R., SCARPELLI, M. & MONTIRONI, R. 2002. Changes produced in the urothelium by traditional and newer therapeutic procedures for bladder cancer. *J Clin Pathol*, 55, 641-7.
- MADRAZO, A. A. & CHURG, J. 1976. Radiation nephritis. Chronic changes following moderate doses of radiation. *Lab Invest*, 34, 283-90.
- MARONPOT, R. R., BOORMAN, G. A. & GAUL, B. W. 1999. *Pathology of the mouse*, Vienna, Il., Cache River Press.
- MCDEVITT, M. R., SGOUROS, G., FINN, R. D., HUMM, J. L., JURCIC, J. G., LARSON, S. M. & SCHEINBERG, D. A. 1998. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med*, 25, 1341-51.
- MIEDERER, M., MCDEVITT, M. R., SGOUROS, G., KRAMER, K., CHEUNG, N. K. & SCHEINBERG, D. A. 2004. Pharmacokinetics, dosimetry, and toxicity of the targetable atomic generator, <sup>225</sup>Ac-HuM195, in nonhuman primates. *J Nucl Med*, 45, 129-37.

- MOSTOFI, F. K., PANI, K. C. & ERICSSON, J. 1964. Effects of Irradiation on Canine Kidney. *Am J Pathol*, 44, 707-25.
- MUNRO, T. R. 1970. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res*, 42, 451-70.
- PAWINSKI, A., SYLVESTER, R., KURTH, K. H., BOUFFIOUX, C., VAN DER MEIJDEN, A., PARMAR, M. K. & BIJNENS, L. 1996. A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer. *J Urol*, 156, 1934-40, discussion 1940-1.
- PFOST, B. 2009. Etablierung des humanen Harnblasenkarzinoms im orthotopen Mausmodell zur Bewertung der intravesikalen Radioimmuntherapie mit einem Wismuth-213 (213Bi) markierten monoklonalen anti-EGFR-Antikörper. *Diss., Technische Universität München*.
- PFOST, B., SEIDL, C., AUTENRIETH, M., SAUR, D., BRUCHERTSEIFER, F., MORGENSTERN, A., SCHWAIGER, M. & SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE, R. 2009. Intravesical alpha-radioimmunotherapy with 213Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J Nucl Med*, 50, 1700-8.
- RAJU, M. R., EISEN, Y., CARPENTER, S. & INKRET, W. C. 1991. Radiobiology of alpha particles. III. Cell inactivation by alpha-particle traversals of the cell nucleus. *Radiat Res*, 128, 204-9.
- ROSCOE B. JACKSON MEMORIAL LABORATORY. & GREEN, E. L. 1966. *Biology of the laboratory mouse*, New York, Blakiston Division, McGraw-Hill.
- ROTTERUD, R., NESLAND, J. M., BERNER, A. & FOSSA, S. D. 2005. Expression of the epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. *BJU Int*, 95, 1344-50.
- RUSS, G. A., BIGLER, R. E., TILBURY, R. S., WOODARD, H. Q. & LAUGHLIN, J. S. 1975. Metabolic studies with radiobismuth. I. Retention and distribution of 206Bi in the normal rat. *Radiat Res*, 63, 443-54.
- SCHMELZ, H. U., SPARWASSER, C., WEIDNER, W. & SCHMELZ SPARWASSER, W. 2006. *Facharztwissen Urologie : differenzierte Diagnostik und Therapie*, Heidelberg, Springer Medizin.
- SCHREIBER, H., OEHLERT, W. & KUGLER, K. 1969. [Regeneration and proliferation kinetics of normal and x-irradiated transitional epithelium in the rat]. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 4, 30-44.
- SEIDL, C. & SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE, R. 2008. Zielgerichtete Radionuklidtherapie mit Alpha-Emittern - Grundlagen, experimentelle und erste klinische Studien. *Der Nuklearmediziner*, 31, 81-92.
- SOLOWAY, M. S., SOFER, M. & VAIDYA, A. 2002. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 167, 1573-83.



- SONG, E. Y., ABBAS RIZVI, S. M., QU, C. F., RAJA, C., BRECHBIEL, M. W., MORGENSTERN, A., APOSTOLIDIS, C. & ALLEN, B. J. 2007. Pharmacokinetics and toxicity of (213)Bi-labeled PAI2 in preclinical targeted alpha therapy for cancer. *Cancer Biol Ther*, 6, 898-904.
- STEWART, F. A. 1986. Mechanism of bladder damage and repair after treatment with radiation and cytostatic drugs. *Br J Cancer Suppl*, 7, 280-91.
- STEWART, F. A. 1991. The Urinary Tract. In: SCHERER E., S. C., TROTT K.-R. (ed.) *Radiopathology of organs and tissues*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer.
- STEWART, F. A., LUNDBECK, F., OUSSOREN, Y. & LUTS, A. 1991. Acute and late radiation damage in mouse bladder: a comparison of urination frequency and cystometry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 21, 1211-9.
- STIEF, C., ZAAK, D., STÖCKLE, M., STUDER, U., KNUECHEL, R., RÖDEL, C., SAUER, R. & RUBBEN, H. 2006. Standards und Perspektiven in der Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms. 90-96.
- SUMPIO, B. E. & HAYSLETT, J. P. 1985. Renal handling of proteins in normal and disease states. *Q J Med*, 57, 611-35.
- TODD, P., WOOD, J. C., WALKER, J. T. & WEISS, S. J. 1985. Lethal, potentially lethal, and nonlethal damage induction by heavy ions in cultured human cells. *Radiat Res Suppl*, 8, S5-12.
- TREIBER, U. & TUMORZENTRUM 2008. *Urogenitale Tumoren : [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]*, München [u.a.], Zuckschwerdt.
- TSUSHIMA, T., MIYAJI, Y., NODA, M., NASU, Y., KUMON, H. & OHMORI, H. 1998. Absorption of epirubicin instilled intravesically immediately after transurethral resection of superficial bladder cancer. *Urol Int*, 60, 161-4.
- VALE, J. A., BOWSER, W. G., LIU, K., TOMLINSON, A., WHITFIELD, H. N. & TROTT, K. R. 1993. Post-irradiation bladder dysfunction: development of a rat model. *Urol Res*, 21, 383-8.
- VAN HELSDINGEN, P. J., RIKKEN, C. H., SLEEBOOM, H. P., DE BRUYN, E. A. & TJADEN, U. R. 1988. Mitomycin C resorption following repeated intravesical instillations using different instillation times. *Urol Int*, 43, 42-6.
- VISWANATHAN, A. N., YORKE, E. D., MARKS, L. B., EIFEL, P. J. & SHIPLEY, W. U. 2010. Radiation dose-volume effects of the urinary bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 76, S116-22.
- ZALUTSKY, M. R., REARDON, D. A., AKABANI, G., COLEMAN, R. E., FRIEDMAN, A. H., FRIEDMAN, H. S., MCLENDON, R. E., WONG, T. Z. & BIGNER, D. D. 2008. Clinical experience with alpha-particle emitting 211At: treatment of recurrent brain tumor patients with 211At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J Nucl Med*, 49, 30-8.
- ZIDENBERG-CHERR, S., PARKS, N. J. & KEEN, C. L. 1987. Tissue and subcellular distribution of bismuth radiotracer in the rat: considerations of cytotoxicity and microdosimetry for bismuth radiopharmaceuticals. *Radiat Res*, 111, 119-29.

## 12. Lebenslauf

Felix Müller

Geb. am 14.04.1981 in Schwäbisch Hall



### Praxis

- Seit 04/2013 Assistenzarzt, Universitäre Psychiatrische Kliniken (UPK), Basel, Schweiz
- 2011-2012 Praktisches Jahr in Nephrologie, Toxikologie, Kardiologie, Gefäßchirurgie, Psychiatrie
- 2009-2012 Doktorand an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München
- 2009-2011 Mitarbeit Universities allied for essential medicines
- 2006-2011 Studentische Beschäftigung auf einer Intensivstation des Deutschen Herzzentrums München
- 2000-2001 Zivildienst in einer Werkstätte für geistig und körperlich behinderte Menschen in Schwäbisch Hall

### Ausbildung

- 11/2012 *Zweites Staatsexamen in Humanmedizin*
- 2008-2012 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
- 2010-2011 Akademie für Psychoanalyse und Psychotherapie München
- 09/2008 *Erstes Staatsexamen in Humanmedizin*
- 2006-2008 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 07/2005 *Bakkalaureat in Philosophie*
- 2002-2005 Studium der Philosophie, Logik und Wissenschaftstheorie an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Hochschule für Philosophie München
- 06/2000 Allgemeine Hochschulreife am Wirtschaftsgymnasium Schwäbisch Hall