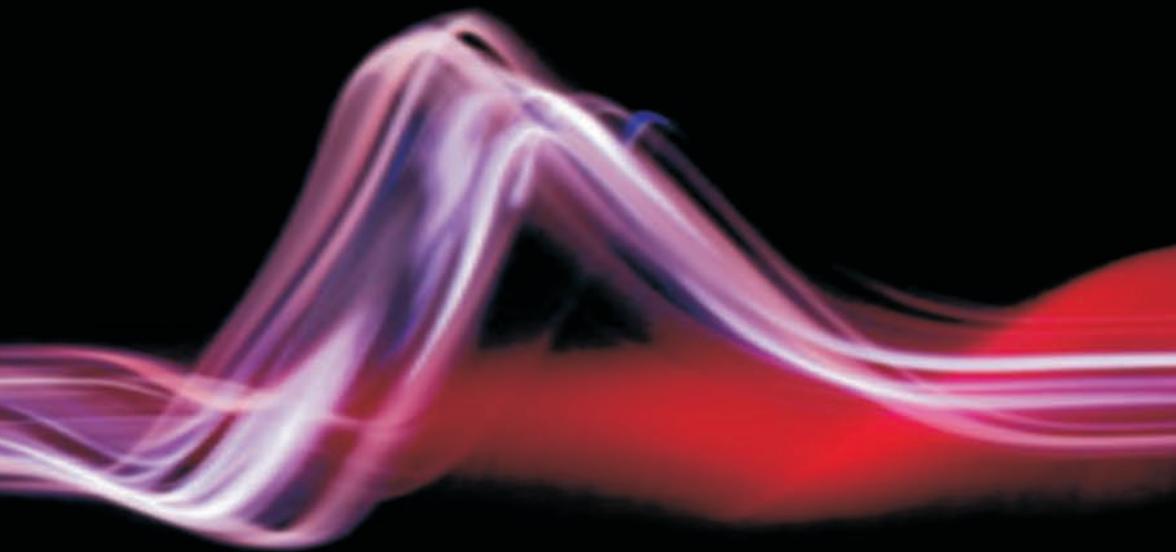


**UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKODYNAMIK  
NEUER ERYTHROPOIETISCHER WIRKSTOFFE  
IM CHRONISCHEN NIERENVERSAGEN DER RATTE**

**BERNADETTE IMMEL**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Zentrum für Medizinische Forschung  
der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim  
der Universität Heidelberg

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen zur Pharmakodynamik  
neuer erythropoietischer Wirkstoffe  
im chronischen Nierenversagen der Ratte**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**BERNADETTE IMMEL**, geb. Kuhn

Giessen 2008

---

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Gretz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lutz

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2008

**Meinen Eltern  
Ingrid und Bernhard Kuhn,**

**sowie  
meinem Ehemann Bernd Immel  
und unseren Kindern  
Bastian, Ben und Belice**

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 Erythropoietin.....	3
2.2 Rekombinates humanes Erythropoietin (EPO) .....	12
2.3 Erythropoietinmodifikationen .....	17
<b>3. Material, Tiere und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1 Versuchstiere und Tierhaltung .....	22
3.2 Versuchsaufbau .....	22
3.3 Methoden.....	25
3.4 Histologische Untersuchung der Organpräparate .....	34
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
4.1 Experiment 1 .....	37
4.2 Experiment 2 .....	53
4.3 Experiment 3 .....	70
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>96</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>115</b>
<b>7. Summary</b> .....	<b>117</b>
<b>8. Anhang</b> .....	<b>119</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>141</b>
<b>10. Danksagung</b> .....	<b>166</b>
<b>11. Nachtrag</b> .....	<b>154</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
AS	Aminosäure
BFU-E	burst-forming-unit-erythroid
Ca <sup>2+</sup>	ionisiertes Kalzium
CFU-E	colony-forming-unit-erythroid
CHO	chinese hamster ovary
CRF	chronic renale failure
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E <sub>2</sub>	Estradiol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
ET	Endotheline
EPO	rekombinates humanes Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin Rezeptor
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
fl	Femtoliter (1 <sup>-15</sup> )
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HepG2/-3B	Erythropoietin-produzierende humane Hepatomzelllinien
HIF	Hypoxie induzierbarer Transkriptionsfaktor
HIV	human-immunodeficiency-virus
IL-1	Interleukin-1
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JAK	Janus tyrosine kinase
kDa	kiloDalton
mRNA	messenger RNA
MCH	mittleres korpuskuläres Zellhämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Zellhämoglobinkonzentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

MCV	mittleres korpuskuläres Zellvolumen
MIX	Methoxy-polyethylenglykol-modifiziertes Erythropoietin
N	Stickstoff
NESP	novel erythropoiesis stimulating protein
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NO	Stickoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
OH <sup>-</sup>	Hydroxyradikal
P	Phosphat
PBS	phosphate buffered saline solution
mPEG	methoxy-Polyethylenglykol
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat
Renox	renale NAD(P)H-oxidase
rh	rekombinanten humanen
RME	receptor mediated endocytosis
Ro 50	Ro 503821
s.c.	subkutan
SD	Sprague Dawley
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TGF- $\beta$	tumor growth factor- $\beta$
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Eine renale Anämie wird bei Patienten mit chronischem Nierenversagen häufig diagnostiziert. Die Ursache der renalen Anämie beruht vor allem auf einem Erythropoietinmangel. Das hämatopoetische Wachstumshormon, Erythropoietin, ein 30,4 kDa Glykoprotein, das vor allem in der Niere produziert wird und dessen Zielzellen hauptsächlich die Vorläuferzellen der Erythrozyten darstellen, wurde 1971 erstmals von Goldwasser und Kung [62] aus Plasma von anämischen Schafen und 1977 von Myiake et al. [124] aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie isoliert. Später machten es rekombinante DNA-Technologien möglich, rekombinantes humanes Erythropoietin (EPO) für den therapeutischen Einsatz zu entwickeln. EPO wird bis heute hauptsächlich bei Anämien von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt. Durch die Entwicklung von rekombinanten humanen (rh) Proteinen sollten die Wirkungen, die mit nicht-humanen Proteinen assoziiert sind, wie eine kurze Halbwertszeit, geringe Stabilität und hohe Immunogenität, eliminiert werden. Jedoch zeigte sich bei einigen rh-Proteinen dennoch eine kurze Halbwertszeit und eine geringe Stabilität, so dass eine Erhöhung der Dosis erforderlich war. Diese führte jedoch bei einigen Patienten zur Entstehung einer negativen Immunantwort und zur Bildung von Antikörpern mit anschließender Entwicklung einer EPO-resistenten Anämie [132; 135].

Polyethylenglykol (PEG)-konjugierte Proteine stellen eine neue Klasse von Biomolekülen dar. PEG, ein amphiphiles Polymer, wird seit 1977 zur Modifikation von Proteinen eingesetzt [3]. Die Kopplung von Polyethylenglykol an Proteine, wie z.B. Ovalbumin und Adenosin-deaminase [74; 102], resultierte in einer verlängerten Zirkulationszeit im Serum und erhöhter metabolischer Stabilität verbunden mit einer stark verminderten Immunogenität.

Ziel dieser Studie war es, an fünfsechstel-nephrektomierten Sprague-Dawley-(SD)-Ratten neue erythropoietische Wirkstoffe zu untersuchen. Im Besonderen sollte überprüft werden:

1. Effektivität und Nachweis einer Wirkungssteigerung neuer erythropoietischer Wirkstoffe, synthetisiert durch den Einbau einer einzelnen Methoxy-polyethylenglykolkette, im Vergleich zu EPO im Hinblick auf die Erythropoese,
2. Analyse der Wirkdauer der Substanzen bei subkutaner Applikation in verschiedenen Frequenzen,
3. Überprüfung einer Dosis-Wirkungsbeziehung in dreimonatiger Versuchszeit,
4. Entwicklung von Nebenwirkungen (z.B. Hypertonie),

5. Bildung von Antikörpern gegen EPO,
6. Ausprägung der medullären und extramedullären Erythropoiese an Hand histologischer Präparate.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Erythropoietin

#### Struktur von Erythropoietin

Das hämatopoetische Wachstumshormon, Erythropoietin, ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 30,4 kiloDalton (kDa), welches zu 60 % aus Protein und zu 40 % aus Kohlenhydraten besteht [161]. Bekannt sind die Aminosäure-Sequenz des Erythropoietins von Mensch, Affe, Maus (Abb. 1), Hund und Ratte. Die Aminosäure-Sequenz des Menschen wurde über die Gensequenzierung [79; 105], wie auch über die Proteinsequenzierung [99] entschlüsselt. Das menschliche Erythropoietin besteht aus 166 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 18,4 kDa. Die Präform hat zusätzlich 27 Aminosäuren (AS) am N-terminalen Ende, die vor allem hydrophobe Reste aufweisen, und einen Argininrest am C-terminalen Ende. Die 27 AS werden vor dem Verlassen der Zelle abgespalten. Erythropoietin ist an vier Stellen glykosyliert: an den Aminosäuren Asparagin 24, 38 und 83 [139] und an Serin 126 [99]. Außerdem besitzt Erythropoietin zwei Disulfidbrücken [99], wobei Cysteine an den Positionen 7 und 161, sowie an den Positionen 29 und 33 miteinander verbunden werden. Die Kohlenhydratanteile enthalten Galaktose, Fukose (Desoxy-L-Galaktose), Mannose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) [40]. Die Strukturen der Oligosaccharide des aus dem Urin des Menschen isolierten Erythropoietins stimmen mit dem biotechnisch hergestellten Erythropoietin weitgehend überein, wobei der Unterschied vor allem im Sialinsäuregehalt besteht [153].

**Abb. 1:** Aminosäuren-Sequenz von humanem Erythropoietin (Hu) im Vergleich zu dem von Affe (Mk) und Maus (Ms), dargestellt in 1-Buchstaben-Code, beginnend (negativ nummeriert) mit der Präform (\* = Glykosylierungsstellen, — = fehlende Aminosäure) [45]

	-20	-10	-1		
Hu	MGVHECPAWLWLLLLSLSLPLGLPVLG				
Mk	MGVHECPAWLWLLLLSVSLPLGLPVP				
Ms	MGVPERPT—LLLLLSLLIPLGLPVLC				
	+1	10	20	* 30	* 40
Hu	APRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENIT				
Mk	APRLICDSRVLERYLLEAKEAENVTTGCSESCSLNENIT				
Ms	APRLICDSRVLERYILEAKEAENITMGCAEGPRLSENIT				
	41	50	60	70	80
Hu	VFDTKVNFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGOAL				
Mk	VFDTKVNFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGOAV				
Ms	VFDTKVNFYAWKRMEVEEQAIIEVWQGLSLLSEAILQAAAL				
	81 *	90	100	110	120
Hu	LVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAOKEAIS				
Mk	LANSSQPFEPLQLHMDKAVSGLRSITTLRALGAQ—EAIS				
Ms	LANSSQPPEPLQLHIDKAVISGLRSLTSLRVLGAOKELMS				
	121	* 130	140	150	160
Hu	PPDAASAAPLRTITADTFKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEA				
Mk	PPDAASAAPLRTITADTFCKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEA				
Ms	LPDTPPAAPLRTITVDTFCKLFRVYANFLRGKCLKLYTGEV				
	161				
Hu	CRTGDR				
Mk	CRRGDR				
Ms	CRRGDR				

Bereits in vitro-Studien von Dordal et al. mit dem aus humanem Urin gewonnenen Erythropoietin zeigten, dass das Entfernen des gesamten Kohlenhydratanteils in einem Verlust der Hälfte der biologischen Aktivität resultiert [38]. Im Gegensatz dazu zeigten Goldwasser und Kung anhand von Knochenmarkzellen plethorischer Ratten, dass das Entfernen der Sialinsäure in vitro nicht essentiell ist [61]. Anscheinend wird dieser terminale Sialinsäurerest nur in vivo für die Funktion benötigt [56], denn wenn Erythropoietin die terminale N-Acetylneuraminsäure fehlt, wird es über die Leber in kürzester Zeit aus dem Plasma entfernt, da der exponierte Galaktose-Rest dann an den Galaktose-Rezeptor der Leber binden kann [38] und so das Protein in der Leber weiter abgebaut wird.

### **Syntheseorte von Erythropoietin**

Das Wachstumshormon Erythropoietin kann in verschiedenen Organen im Organismus synthetisiert werden. Beim Erwachsenen wird Erythropoietin hauptsächlich in der Niere und im geringeren Ausmaß in der Leber synthetisiert. In der Niere wird Erythropoietin in den peritubulären Fibroblasten Typ 1 des Interstitiums der inneren Nierenrinde [11; 92; 117] gebildet, während das Hormon in der Leber von Hepatozyten und Fibroblasten des Interstitiums produziert wird [93]. Spätere Studien von Maxwell et al. zeigten, dass die nichtparenchymalen Erythropoietin-produzierenden Zellen in der Leber Ito-Zellen (Fettspeicherzellen) sind [118]. Diese befinden sich im perisinusoidalen Abschnitt innerhalb des Disse'schen Raums und zeigen viele Ähnlichkeiten zu den Erythropoietin-produzierenden, fibroblastischen interstitiellen Zellen der Niere. In beiden Organen sind diese Zellen die wichtigsten Bindegewebe-produzierenden Zellen, bei Verletzungen proliferieren beispielsweise beide Zelltypen. Sowohl die Ito-Zellen als auch die renalen Fibroblasten Typ 1 produzieren „ecto-5'-nucleotidase“, deren Expression im anämischen Zustand ansteigt, und den Hepatozyten-Wachstumsfaktor, welcher Wachstum und Differenzierung von Tubuluszellen und Hepatozyten beeinflusst. Beim Fetus wird Erythropoietin hauptsächlich von der Leber produziert [166] und ist essentiell für die fetale Erythropoese [104]. Sowohl in Ito-Zellen, wie auch in den Hepatozyten, welche die Zentralvene umgeben, konnte bei Mäusen eine Erythropoietin-spezifische mRNA nachgewiesen werden [31].

Unter Verwendung von „enzym-linked-immunoassays“ (EIA) wurden geringfügige Mengen von Erythropoietin auch in anderen Organen mehrerer Spezies, wie Eileiter [114], Gebärmutter [169] und Gehirn [115] detektiert. Im Hoden [154] konnte die mRNA von Erythropoietin nachgewiesen werden. Die Erythropoietin-Produktion im Eileiter (Ampulla

und Isthmus) und Uterus wird induziert durch Estradiol (E<sub>2</sub>). Es wird angenommen, dass Erythropoietin im Eileiter Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit hat und für die zyklische Angiogenese im Östrus benötigt wird. Verschiedene Studien zeigten, dass Neuronen den Erythropoietin-Rezeptor exprimieren [36; 115; 126] und Astrozyten Erythropoietin produzieren [112; 116]. Somit zeigt das zentrale Nervensystem (ZNS) ein parakrines Erythropoietin/EPO-Rezeptor System. Im Gehirn schützt Erythropoietin die Neuronen vor ischämischen Schäden [137]. Auch Tumoren des ZNS können Erythropoietin produzieren, wie in je einem Fall eines Meningioms und eines zerebellären Hämangioblastoms, nachgewiesen wurde [25]. Im Hoden von Ratten wurde im Zustand der Normoxie und in ansteigender Konzentration während der Hypoxie Erythropoietin-mRNA gefunden, dabei stimuliert Erythropoietin die epididymale Spermareifung und die Fruchtbarkeit des Spermas [168].

Weitere Studien weisen daraufhin, dass Erythropoietin noch in vielen anderen Organen nachgewiesen und dort produziert werden kann. In den Endothelzellen der Umbilicalvene von Menschen, in Nebennierenkapillaren von Rindern und in den Gehirnkapillaren der Ratte wurde gezeigt, dass EPO-Rezeptor-mRNA exprimiert wird [8; 167]. In der Lunge und in der Milz von Ratten konnte mRNA von Erythropoietin isoliert werden [49].

### **Regulation der Produktion von Erythropoietin als Feedback-Mechanismus**

Die Induktion für die Erythropoietinsynthese in der Niere [143] und im Gehirn [112] wird hauptsächlich über die Hypoxie reguliert, die zu einem verstärkten Anstieg der Transkription des Erythropoietin-Gens führt. Eine erhebliche Erythropoietin-Produktion im Zustand der Hypoxie zeigten auch zwei Leber-Zelllinien vom Menschen, Hep3B und HepG2 [60]. Auch physiologische und pharmakologische Wirkstoffe regulieren die Genexpression von Erythropoietin (Tab. 1). Negativ können sich beispielsweise Zytostatika, wie Cisplatin, und Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A, sowie andere Stoffe, wie Theophyllin, auf die Erythropoietin-Produktion auswirken.

**Tabelle 1:** Beeinflussung der Genexpression von Erythropoietin

---

**Induktion in vivo und in vitro**

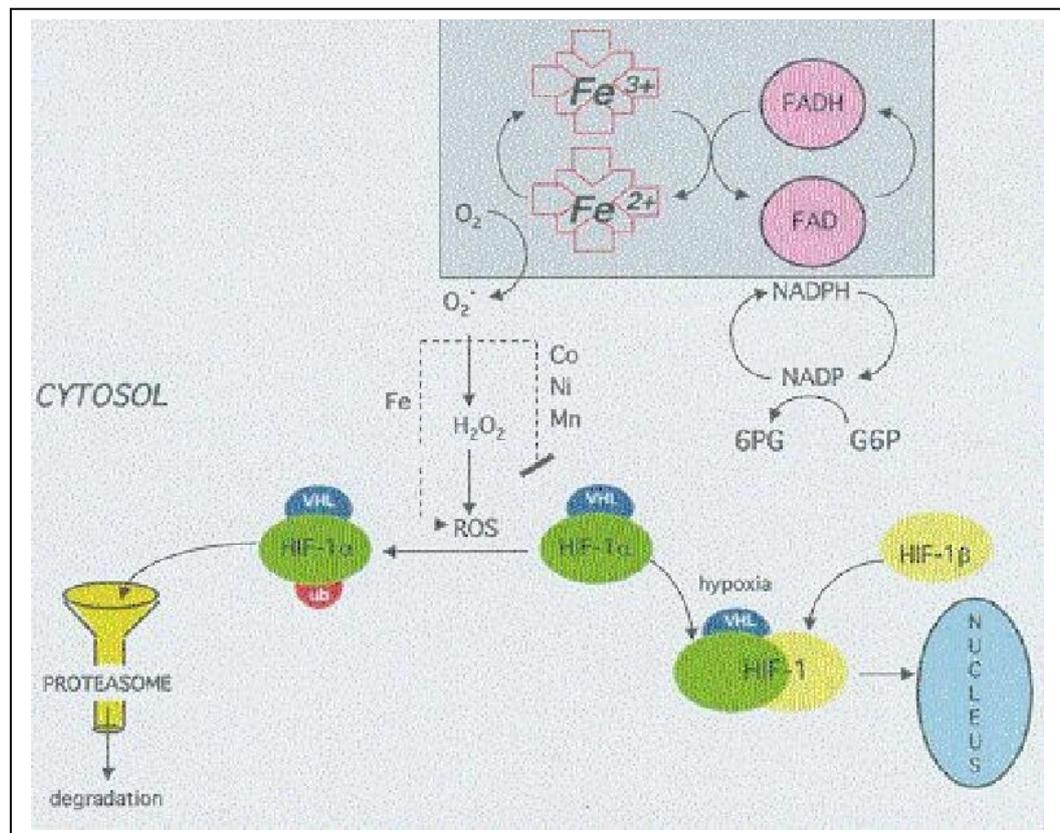
1. Hypoxie [30; 39 ;40; 59; 75; 95; 144]
2.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  [39; 50; 59; 75; 143; 152]
3. Eisenchelator: Desferrioxamin [30; 39; 50; 59; 89; 162]

**Aufhebung der Induktion in Hep3B und HepG2**

1. Kohlenmonoxid [39]
  2. Stickstoffmonoxid [39]
  3. Entzündungscytokine: TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$  [39; 51; 80]
  4. Phorbolster: Forskolin [39]
  5. Proteinsynthesehemmer: Cycloheximid [39]
  6. Zytostatikum: Cisplatin [28]
  7. Immunsuppressivum: Cyclosporin A [28]
  8. Theophyllin [28]
- 

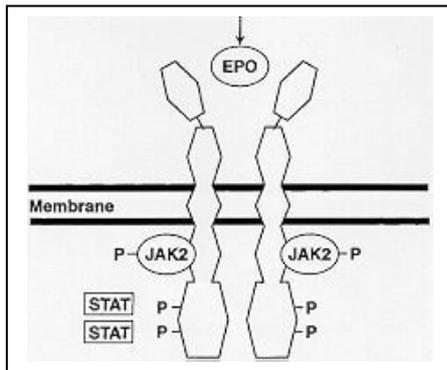
Der Mechanismus der sauerstoffabhängigen Erythropoietin-Synthese wurde in den letzten Jahren durch Experimente an Hepatomzellen untersucht (Abb. 2). Ein durch Hypoxie induzierbarer Transkriptionsfaktor (HIF) aktiviert die DNA-Sequenz eines sogenannten Enhancers durch Bindung am 3'-Ende des Erythropoietin Gens [39]. Diese regulatorische Verknüpfung von HIF wird durch eine Signalkaskade vermittelt, an deren Anfang vermutlich die renale NAD(P)H-oxidase (Renox) als Sauerstoffsensoren steht [58]. Die Oxidase überträgt Elektronen mit Hilfe von Flavin (FAD) und von Häm auf molekularen Sauerstoff, wodurch Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) erzeugt wird. Superoxid wird, in Anwesenheit von Eisen, in Hydroxyradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) und andere reaktive Sauerstoffarten (reactive oxygen species, ROS) umgewandelt. Dadurch wird HIF-1 $\alpha$  oxidativ verändert, so dass das Ubiquitin/Proteasom-System diese Komponente schnell degradiert [39]. Unter Hypoxie wird diese Degradation gehemmt, was zur Akkumulation von HIF-1 $\alpha$ , damit zur Bildung des Komplexes aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit und zur Expression des Erythropoietin-Gens sowie zur Produktion von Erythropoietin führt [40].

**Abb. 2:** Sauerstoffabhängiger zellulärer Mechanismus der möglichen Signalkaskade und deren Mediatoren, die das Erythropoietin-Gen im Zellkern aktivieren [39]. Die renale NAD(P)H-oxidase steht vermutlich als Sauerstoffsensoren am Anfang der Oxygenierungs- oder Redoxreaktionen (G6P = Glukose-6-Phosphat, NADPH = reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, FAD = Flavin-Adenin-Dinucleotid, Fe = Eisen,  $O_2^-$  = Superoxid, Co = Kobalt, Ni = Nickel, Mn = Mangan, ROS = reactive oxygen species, HIF = Hypoxie induzierbarer Transkriptionsfaktor)



### Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R)

Nach der Synthese gelangt das hämatopoetische Wachstumshormon Erythropoietin über den Blutstrom ins Zielorgan Knochenmark, um dort die Erythropoese zu stimulieren. Da Erythropoietin nur in niedrigen Konzentrationen im Körper zirkuliert und damit Untersuchungen der Rezeptoren schwierig werden, wurde der EPO-R erst näher untersucht, nachdem im Jahre 1985 das Erythropoietin-Gen geklont und rekombinantes Erythropoietin produziert werden konnte. Der menschliche EPO-R (Abb. 3) besitzt etwa 508 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 66 kDa und gehört zur der Superfamilie der Zytokin-Rezeptoren [14].



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Proteine, die in die Signalkaskade von Erythropoietin involviert sind [13] (EPO = Erythropoietin, P = phosphorylierter Tyrosinrest, JAK2 = Janus tyrosine kinase 2, STAT = signal transducer and activator of transcription)

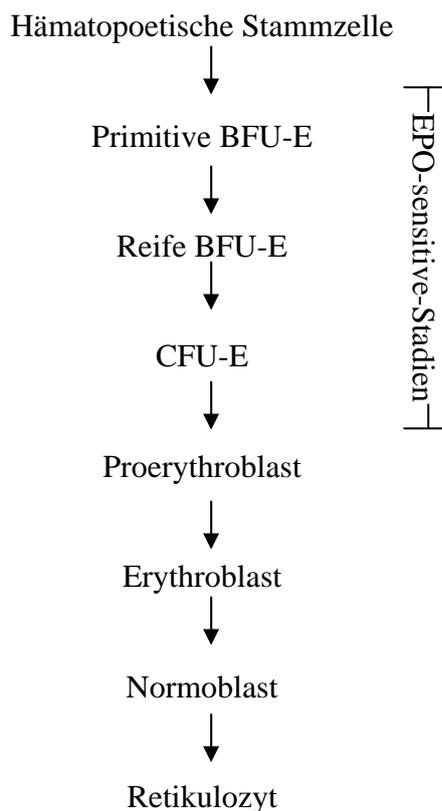
Erythropoietin-abhängige erythrozytäre Vorstufenzellen besitzen zwischen 100 und einigen 1000 Rezeptorstellen pro Zelle [32], weiterhin wurden EPO-R in Megakaryozyten von Ratten und Mäusen [54], in Endothelzellen des Menschen [8] und in Zellen von Ratten mit neuraler Aktivität [115] gefunden. Smithgall zählt den EPO-R zu den Einzelketten-Rezeptoren [147], der über einzelne Polypeptidketten mit einem extrazellulären und einem zytosolischen Anteil verfügt. Der extrazelluläre Anteil, mit etwa 200 Aminosäuren [14], hat eine hohe Bindungsaffinität für Erythropoietin. Der zytosolische Anteil, der essentiell ist für die Signalübertragung im Zellinneren, reguliert die Proliferation und Differenzierung der erythropoietischen Vorläuferzellen [147]. Die Aktivierung des EPO-R geschieht über die Dimerisierung des p66 Proteins [97], welches zur Stimulation und Autophosphorylierung von Janus tyrosine kinase 2 (JAK2) führt. Danach werden verschiedene intrazelluläre Kaskaden aktiviert [96], wie z.B. die Ras/Mitogen activated protein-(MAP)-Kinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase und der signal transducer and activator of transcription (STAT-Faktor) [13]. Bei der Aktivierung der zytosolischen Tyrosinkinase kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  1. Dies führt zur Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>), was dazu führt, dass Ca<sup>2+</sup> verstärkt aus intrazellulären Speichern austritt und es zu einem zusätzlichen Influx von Ca<sup>2+</sup> über „EPO-R Kanäle“ kommt [82]. Die durch EPO-induzierten intrazellulären Signalkaskaden führen in den erythrozytären Vorläuferzellen nach 12-14 Stunden zur Synthese von Hämoglobin und Membranproteinen und damit zur Stimulation der Erythropoese [52].

### Erythropoese

Im Knochenmark befinden sich Zellen der Erythropoese, die in erythropoietischen Inseln zusammenliegen. In Abb. 4 wird die Entwicklungsreihe der Erythropoese, an deren Ende die Erythrozyten stehen, und die Wirkung von Erythropoietin, als Wachstumshormon, auf

bestimmte Zellstadien dargestellt. Während der Erythropoese beeinflusst Erythropoietin die Differenzierung von „burst- und colony-forming-unit-erythroid“ (BFU-E; CFU-E). Die Oberflächenrezeptoren dieser Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen besitzen eine unterschiedliche Sensitivität für Erythropoietin.

**Abb. 4:** Stadien der erythrozytären Vorläuferzellen und deren Erythropoietin-Sensitivität [91] (BFU-E = „burst-forming-unit-erythroid“, CFU-E = „colony-forming-unit-erythroid“, EPO-sensitive Stadien = Erythropoietin-sensitive Zellen)



BFU-E und CFU-E, die dem Proerythroblasten vorangehen, werden über ihre Wachstumscharakteristika *in vitro* definiert, wohingegen der Proerythroblast und die späteren Stadien über ihre morphologische Erscheinung definiert werden. Die unreifen BFU-E werden charakterisiert durch ihr hohes proliferatives Potential und ihre geringe Anzahl an EPO-Rezeptoren [140]. Diese Stammzellen benötigen für die Proliferation neben einer hohen Konzentration an Erythropoietin, eine weitere Anzahl von Wachstumsfaktoren, wie z.B.: Interleukin-3, Stammzellfaktor und „granulocyte-/macrophage colony-stimulating factor“ [43]. Erythropoietin wirkt auf die BFU-E's mitogen [150]. In Studien wurde gezeigt, dass die Vorläufer der roten Blutkörperchen während der Entwicklung zu reifen BFU-E Stammzellen eine höhere Erythropoietin-Sensitivität erlangen, die allerdings im Proerythroblasten-Stadium wieder verloren geht.

Die CFU-E Stammzellen, die aus den BFU-E's hervorgehen, verlieren allmählich ihre proliferative Kapazität und besitzen annähernd 1000 EPO-R auf ihrer Oberfläche [140; 141]. CFU-E Stammzellen benötigen Erythropoietin, während sie sich differenzieren, und zwar weniger um zu proliferieren, als um zu überleben [90]. Koury und Bondurant vermuten, dass Erythropoietin einen Überlebensfaktor für CFU-E Stammzellen darstellt, indem der programmierte Zelltod verhindert wird. Andere Studien bestätigten, dass Erythropoietin für die Erythropoiese in vivo und das Überleben der CFU-E's essentiell ist [104; 166]. Darüber hinaus zeigten diese Experimente, dass sich in Abwesenheit von Erythropoietin und dessen Rezeptoren BFU-E und CFU-E Stammzellen zwar erst normal entwickelten, sich dann jedoch nicht zu Erythrozyten differenzierten. Daraus wurde geschlossen, dass Erythropoietin nicht für die Proliferation und Differenzierung von BFU-E zu CFU-E Stammzellen benötigt wird, sondern in vivo entscheidend ist für das Überleben und die irreversible Differenzierung von CFU-E's zu Erythrozyten [166]. Der Mangel an dem hämatopoetischen Wachstumshormon, Erythropoietin, führt durch die direkte Beeinflussung der Erythropoiese zu einer persistierenden Anämie.

### **Ursachen der renalen Anämie**

Durch die progressive Schädigung der Nieren entsteht ein Erythropoietinmangel, der die Hauptursache für die renale Anämie [26], eine normochrome, normozytäre Anämie, darstellt. Die Entstehung der Anämie bei chronischem Nierenversagen ist jedoch ein multifaktorielles Geschehen, bei der außer der abnehmenden Produktion von Erythrozyten durch Erythropoietinmangel auch noch andere Faktoren (Blutverlust und verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten) mitwirken [47]. Cofaktoren, die bei der Pathogenese der renalen Anämie eine Rolle spielen, sind in der Tabelle 2 ausführlich aufgeführt.

**Tabelle 2:** Ursachen der renalen Anämie [41]

---

**Abnehmende Produktion von Erythrozyten**

- Inadequate Erythropoietin-Produktion
- Eisenmangel
- Folsäure-Mangel
- Hyperparathyreoidismus
- Inadequate Dialysebehandlung
- Entzündungsreaktionen

**Blutverlust**

- Hämodialyse
- Diagnostische und therapiekontrollierende Blutentnahmen
- Okkulter gastrointestinaler Blutverlust

**Verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten**

- extrakorpuläre Faktoren (urämisches Plasma)
  - korpuskuläre Faktoren (reduzierte osmotische und oxidative Resistenz der Erythrozyten, reduzierte Verformbarkeit der Erythrozyten)
  - Hypersplenismus
- 

Sowohl der Blutverlust als auch die verkürzte Lebenszeit der Erythrozyten können bei chronischer Niereninsuffizienz durch moderate Erythropoiese kompensiert werden. Eschbach und Adamson zufolge wird die Pathophysiologie der Anämie bei chronischen Nierenversagen hauptsächlich bedingt durch den Mangel an Erythropoietin [47]. Welche Faktoren beim chronischen Nierenversagen im Einzelnen zum Erythropoietinmangel führen, ist in Tabelle 3 aufgeführt. Dabei erscheint der Anstieg von Entzündungszytokinen, wie z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ , und TGF- $\beta$ , bei der Pathogenese der Anämie bei chronischen Erkrankungen generell bedeutend zu sein [121]. Means et al. zeigten, dass TNF- $\alpha$  durch IFN- $\beta$  [121] bzw. IL-1 über die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  aus T-Lymphozyten indirekt eine Hemmung der CFU-E Stammzellen bewirken [120]. Dabei vermuteten Taniguchi et al., dass IFN- $\gamma$  die Transkription der mRNA der EPO-Rezeptoren blockiert und es dadurch zu einer Reduzierung der Anzahl von EPO-R kommt [155].

**Tabelle 3:** Mögliche Ursachen des relativen Erythropoietinmangels [41]

- 
- Destruktion der Subpopulation von renalen Fibroblasten, die unter normalen Bedingungen Erythropoietin produzieren
  - Transformation der Erythropoietin-produzierenden Fibroblasten in Matrix-produzierende Myofibroblasten
  - Mangel von parakrinen Signalen der angrenzenden tubulären Epithelien
  - Lokale Hemmung der Erythropoietin-Produktion durch Entzündungszytokine
  - Fehlende Kompensation durch Erythropoietin-Produktion der Leber
- 

Nicht therapierte Anämien, die durch Erythropoietinmangel hervorgerufen wurden, können zu einer hyperdynamischen zirkulatorischen Adaption führen. Daraus kann bei Patienten mit Nierenversagen eine Linksherzdilatation resultieren. Zugleich wird die myokardiale Sauerstoffversorgung aufgrund eines Defizits an Kapillaren beeinträchtigt [6]. Seit 1986 kann die renale Anämie und somit eine Folgeerkrankung mit gentechnisch hergestelltem, sog. rekombinantem humanem Erythropoietin behandelt werden.

## **2.2 Rekombinates humanes Erythropoietin (EPO)**

### **Entwicklung**

Die humane DNA von Erythropoietin wurde erstmals von Jacobs et al. und Lin et al. 1985 identifiziert, charakterisiert und mit Hilfe von Eierstockszellen des chinesischen Hamsters geklont [79; 105]. Seit 1986 wird Erythropoietin gentechnisch hergestellt. Die Tabelle 4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Erforschung von Erythropoietin.

**Tabelle 4:** Zeitlicher Verlauf der Schwerpunkte bei der Erforschung von EPO

Jahr	Autor		
1953	Erslev et al.	[44]	Injektionen von Plasma hypoxischer Kaninchen in gesunde Empfängertiere. Der Plasmafaktor, der die Erythropoese auslöste, wurde Erythropoietin genannt
1971	Goldwasser et al.	[62]	Isolation von Erythropoietin aus anämischen Schafen
1977	Myiake et al.	[124]	Isolation und Reinigung von Erythropoietin aus Urin des Menschen
1979	Sherwood und Goldwasser	[146]	Entwicklung eines Radioimmunassays für Erythropoietin
1985	Lin et al.	[105]	Klonen von Erythropoietin des Menschen: isoliertes Erythropoietin-Gen wurde biologisch aktiv nach Einschleusung in Eierstockszellen vom chinesischen Hamster
1985	Jacobs et al.	[79]	Klonen von humanem Erythropoietin
1986	Winearls et al.	[165]	Erste klinische Versuche
1987	Eschbach et al.	[48]	Phase 1 und 2 der klinischen Versuche
1998	MacLeod et al.	[108]	Herstellung von rekombinantem caninem Erythropoietin

### Struktur und Pharmakokinetik von EPO

EPO besitzt die gleiche Aminosäure-Sequenz wie das natürliche humane Erythropoietin und auch eine fast identische Zusammensetzung der Kohlenhydrate [56]. Für den klinischen Gebrauch sind heutzutage zwei rekombinante Hormone verfügbar: Epoetin- $\alpha$ , welches 39% Kohlenhydratanteil besitzt, und Epoetin- $\beta$  mit 24% Kohlenhydratanteil. In ihrer Pharmakokinetik scheinen sich beide Formen nicht von einander zu unterscheiden; beide stellen einen wirksamen Stimulator der Erythrozytenvorläuferzellen im Knochenmark dar [52; 101]. Bleuel et al. untersuchten die Pharmakokinetik nach subkutaner (s.c.) und intravenöser (i.v.) Injektion von EPO an gesunden Sprague-Dawley-Ratten, Hunden und Mäusen [17]. Bei subkutaner Injektion erreichte die Serumkonzentration in Ratten ihr Maximum nach 12 Stunden. Die Bioverfügbarkeit in Ratten betrug 76 %. Die Eliminationshalbwertszeit betrug im Mittel, vergleichbar mit der Halbwertszeit nach intravenösen Injektion, 13 Stunden. Bei der Absorptionshalbwertszeit der s.c. Gabe wurden 5,4 Stunden ermittelt. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Eliminationsrate bei Ratten nach s.c. Injektion nicht von der Absorptionsrate aus dem Depot dominant bestimmt wird. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Ergebnissen stellten Bleuel et al. fest, dass bei anderen Spezies, wie z.B. beim Hund, die Eliminationsrate vom Anfluten aus dem Depot abhängig ist [17]. Das Verteilungsvolumen von EPO bei Ratten lag bei 65 – 79 ml/kg, was auf eine extrazelluläre Verteilung der Substanz hinweist [87]. EPO wird sowohl renal als auch extrarenal aus dem Gesamtorganismus eliminiert. Kato et al.

beobachteten, dass die Zielorgane Knochenmark und Milz größtenteils auch für die Elimination von EPO zuständig sind [83]. Anscheinend kommt es erst nach der Sättigung der Oberflächenrezeptoren zu einer Elimination über die Niere. Es wird angenommen, dass der Mechanismus dieser gesättigten Clearance unter anderem durch die rezeptorvermittelte Endozytose (receptor mediated endocytosis, RME) beeinflusst wird [83]. Sawyer et al. beschrieben die Aufnahme von  $^{125}\text{I}$ -EPO in Friend-Virus-infizierte Erythrozyten durch RME mit anschließendem lysosomalen Abbau, wobei spezifische Bindungsstellen an der Zelloberfläche bei hoher EPO-Konzentration reduziert wurden (Downregulation) [142]. Die renale Clearance von EPO ist jedoch deutlich niedriger als die Gesamtclearance; sie wird durch die normale bzw. beeinträchtigte Nierenfunktion beeinflusst [87]. So betrug die totale Clearance in fünfsechstel-nephrektomierten Ratten nach der Gabe von EPO nur 66 % der Werte der Kontrolltiere. Daher ist anzunehmen, dass die Nierenfunktion den Metabolismus im extrarenalen Gewebe beeinflusst [88]. Resultate von Kato et al. lassen vermuten, dass die Niere zur ungesättigten Clearance beiträgt [83] und, dass EPO aus dem Plasma auch glomerulär filtriert wird, da Verbindungen bis zu einer Molekularmasse von  $\geq 60$  kDa gefiltert werden und EPO eine Molekularmasse von 30,4 kDa besitzt.

### **Antikörperbildung gegen EPO**

Eine Antikörperbildung gegen EPO kann bei Ratten durch die Verabreichung von rekombinantem humanem Erythropoietin entstehen. Die Arbeitsgruppe von Kato et al. zeigte interindividuelle Unterschiede bei der Produktion von Antikörpern (Ak) und deren biphasische Wirkung auf die Pharmakokinetik von EPO in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration im Plasma [84]. In Experimenten von Kato et al. wurde die Pharmakokinetik von  $^{125}\text{I}$ -EPO nach wiederholter wöchentlicher Gabe über einen vierwöchigen Zeitraum an zehn männlichen Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Nach der Injektion von  $^{125}\text{I}$ -EPO konnte bei allen zehn SD-Ratten nach 10 – 12 Stunden eine Ak-Produktion ermittelt werden. Jedoch wurde nach der vierten Injektion festgestellt, dass das Antigen  $^{125}\text{I}$ -EPO (Ag) bei acht von zehn SD-Ratten rasch aus der Zirkulation eliminiert wurde, was auf eine Erhöhung der Plasmaclearance von  $^{125}\text{I}$ -EPO hinwies, während bei den anderen zwei Ratten eine verlangsamte Elimination der Ag-Konzentration aus dem Organismus festgestellt wurde. Die Eliminationsrate aus dem Plasma von großen Antigen-Antikörperkomplexen (trimere Formen) steigt, im Gegensatz zu kleinen Immunkomplexen (monomere oder dimere Formen) schneller an. Kato et al. vermuten, dass geringe Antikörpermengen ( $^{125}\text{I}$ -EPO) im Plasma an Antigene in der monomeren oder dimeren Form

gebunden werden. In diesem Fall wäre die totale Clearance von  $^{125}\text{I}$ -EPO gering, da dieser Immunkomplex dem Eliminationsmechanismus entkommen kann. Eine schnellere Elimination durch die Leber entsteht, wenn der Antikörpertiter erhöht ist, da dann auch Immunkomplexe mit höherer Molekularmasse (Trimer) gebildet werden.

In der Literatur wird, wenn auch sehr selten, über die Bildung von Antikörpern bei Menschen mit EPO-resistenter Anämie berichtet, denen EPO über einen längeren Zeitraum (bis zu 2 Jahre) therapeutisch verabreicht worden war [132; 135].

### **Nebenwirkungen**

Schon Winearls et al. [165] und Eschbach et al. [46] berichteten, dass bei der Behandlung von Dialysepatienten mit EPO beträchtliche Nebenwirkungen auftreten können: Thrombenbildung im arteriovenösen Shunt, hypertensive Enzephalopathie, Anfallsleiden und übermäßig gesteigerter Appetit sind beschrieben. Bei fünfsechstel-nephrektomierten Ratten stellten Gretz et al. insgesamt einen schnelleren Verlauf des Nierenversagens, und bei einigen Tieren auch das Auftreten eines akuten Nierenversagens, sowie Embolien und Lähmungen fest [66]. Diese Effekte beruhen wahrscheinlich auf rheologischen Problemen, verursacht durch den Anstieg des Hämatokrits nach EPO-Gabe.

Häufigste Nebenwirkung ist das Auftreten bzw. die Erhöhung des Bluthochdrucks bei 30 % der Patienten, die mit EPO behandelt werden, wobei der genaue Mechanismus der Hypertonie weitgehend unbekannt ist [55]. Im Vergleich wurde ein geringerer Anstieg des Blutdrucks bei Patienten mit s.c. EPO-Gabe gegenüber denen mit i.v. Gabe beobachtet [163]. Diskutiert werden verschiedene Theorien, wie rheologische Mechanismen, eine ansteigende Ansprechbarkeit auf Norepinephrin, eine Erhöhung des basalen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  [82], ein veränderter Eicosanoid-Stoffwechsel, eine erworbene NO-Resistenz, ein ansteigender Endothelin Spiegel [18; 78] und genetische Einflüsse [72]. Brochu et al. beobachteten bei urämischen Ratten eine durch EPO induzierte Hypertension, an deren Pathogenese das Endothelin-(ET)-system beteiligt war [23]. Raine und Roger beschreiben, dass sich der Blutdruckanstieg bei Menschen insbesondere in den ersten vier Monaten der Therapie entwickelt und sich danach normalerweise stabilisiert [136]. Bei Ratten mit einer chronischen Niereninsuffizienz wurde der Anstieg, unabhängig vom Hämatokrit, bereits nach etwa einer Woche beobachtet [159]. Beccari schildert, dass der Bluthochdruck nicht selten begleitet wird von einer hypertensiven Enzephalopathie und Schlaganfällen [15], die durch zerebrale

Hypoperfusion oder durch fokale zerebrale Ödeme bewirkt wurden. Delanty et al. berichteten über die Entwicklung einer Hypertension, zusammen mit Kopfschmerzen und Schlaganfällen bei sechs Dialysepatienten während der EPO-Therapie [34].

### **Therapeutische Anwendung von EPO**

Der Einsatz von EPO erstreckt sich mittlerweile nicht nur auf die Behandlung der Anämie bei Nierenerkrankungen, sondern generell auf die Behandlung und Prophylaxe von Anämien auch anderer Genese. Dazu gehören Anämien bei der Gaucher Krankheit, Thallassämie, Hämoglobinopathie, bei Non-Hodgkin Lymphomen und multiplen Myelomen, aber auch Therapie-induzierte-Anämien wie bei der HIV-Infektion (Humanes-Immundefizienz-Virus) und bei Krebserkrankungen nach der Chemo- und Strahlentherapie. Auch bei Frühgeburten [27] und in der Predialyse wird EPO eingesetzt. EPO kann weiterhin verwendet werden, um autologe Blutspenden vor Operationen zu fördern, damit die generell risikoreichen Bluttransfusionen vermieden werden können. Das Risiko der Übertragung von Hepatitis-Viren, Cytomegalie-Viren, Epstein-Barr-Viren, HIV und anderen Viren wird damit ausgeschlossen. Auch begünstigt die Behandlung mit EPO die Reduktion der Linksherzdilatation, sie verbessert die Lebensqualität, den Ernährungsstatus, den Glukosestoffwechsel, die Funktion des Immunsystems, die Sexualfunktionen, sie reduziert Gerinnungsstörungen, und verringert Juckreiz. Amann et al. stellten jedoch bei Ratten mit partiell entfernten Nieren fest, dass, obwohl EPO die Hypertrophie des linken Ventrikels verhindern konnte, die Reduktion der kapillären Versorgung im linken Ventrikel nicht beeinflusst werden konnte [6].

Das heute übliche Behandlungsregime für Patienten, die EPO therapeutisch verabreicht bekommen, erfordert eine frequente Administration einer dreimal wöchentlichen, s.c. oder i.v. Injektion [123]. Aufgrund der kurzen Plasma-Halbwertszeit (bei i.v. Injektion ca. 9 Std. und s.c. Injektion 12-16 Std.) des Proteins wird eine weniger frequente Dosierung nicht empfohlen. Jegliche Modifikation, die die Halbwertszeit verlängert und damit auch ein größeres Dosierungsintervall zulässt, würde die Behandlung vereinfachen und die Lebensqualität verbessern. In der humanmedizinischen Forschung sind verschiedene Konzepte und Ansätze zur Entwicklung einer verbesserten Erythropoietinmodifikationen in der Entwicklung, die im folgenden Abschnitt ausgeführt werden.

### 2.3 Erythropoietinmodifikationen

Die Entwicklung einer verbesserten Erythropoietinmodifikation, besteht beispielsweise darin, EPO durch den Austausch von Aminosäuren zu verändern. Ein solcher Austausch wurde zuerst bei Insulin vorgenommen [37], bei dem Lysin und Prolin der B-Kette an der Position 28 und 29 vertauscht wurde (LYS B<sup>28</sup> →<sup>29</sup>, PRO B<sup>29</sup> →<sup>28</sup>) [77].

#### **Glykosylierung**

Darüber hinaus besteht noch die Option, durch Hyperglykosylierung von EPO die Halbwertszeit von EPO zu verlängern. Das von Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA) entwickelte [57] hyperglykosylierte Analog von Epoetin- $\alpha$ , mit einer Molekularmasse von 38 kDa, wird NESP genannt (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein). Im Gegensatz zu EPO und dem endogenen Erythropoietin, die drei an Stickstoff gebundene Kohlenhydratketten besitzen, hat NESP fünf Kohlenhydratketten verknüpft mit Stickstoff. NESP wurde mittels ortsspezifischer Mutation hergestellt. Der Gehalt an Kohlenhydraten hat sich dabei um 12% erhöht. Dies ist wichtig für das biologische Verhalten, da sich der Gehalt an Sialinsäure-enthaltenden Kohlenhydraten von EPO direkt proportional verhält zu der Halbwertszeit im Serum und zu der biologischen Aktivität in vivo [22]. Die Tertiärstruktur von EPO wird durch die zwei zusätzlichen Kohlenhydratketten weder zerstört, noch werden die Rezeptorinteraktionen behindert [42]. Die vorklinischen Studien an Ratten zeigten, dass NESP eine signifikant längere Halbwertszeit (bei i.v. Injektion ca. 25 Std und s.c. Injektion ca. 48 Std.) als EPO besitzt [4].

Hartley et al. induzierten bei Mäusen eine Anämie durch wiederholte Gaben von Cisplatin, um an diesen Mäusen die Effektivität von NESP gegenüber EPO nach singularer Injektion zu untersuchen. Eine einmalige Injektion von EPO (12,500 U/kg bzw. 105  $\mu$ g/kg) bewirkte keinen Anstieg des Hämatokrits. Im Vergleich dazu stieg bei einmaliger Applikation von NESP der Hämatokrit für 10 Tage von 43 % auf 55 %. Um diesen Effekt von NESP zu erreichen, mußte EPO dreimal wöchentlich verabreicht werden [73]. Untersuchungen der Immunogenität von NESP wurden in der Literatur nicht beschrieben. Zurzeit wird NESP an 1500 anämischen Patienten mit chronischem Nierenversagen zur klinischen Prüfung (Phase 3) eingesetzt [9].

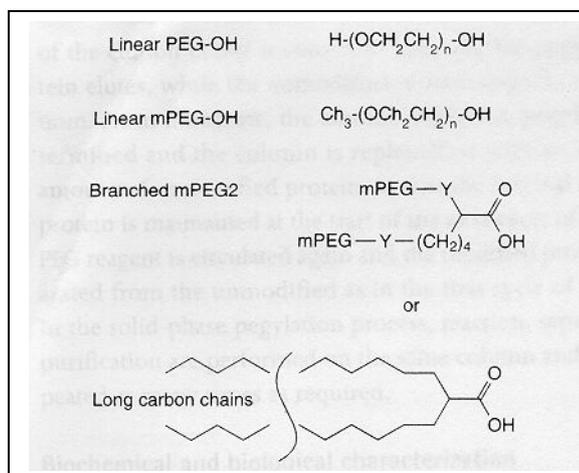
## **Gentherapie**

Eine weitere Alternative, um in der Zukunft möglicherweise die renale Anämie der chronischen Niereninsuffizienz zu therapieren, stellt die Gentherapie dar. Setoguchi et al. zeigten an Cotton-Ratten, dass Adenoviren als Vektoren genutzt werden können, um das Erythropoietin-Gen in vivo zu transfektieren [145]. Das Genprodukt wurde exprimiert und die physiologische Funktion des hämatopoetischen Wachstumsfaktor resultierte in einem Anstieg des Hämatokrits. Als Komplikationen dieser Gentherapie muß die Immunantwort auf die Adenoviren gesehen werden. Retrovirale Vektoren sind wenig geeignet, da diese sich teilende Zellen benötigen und dadurch für eine Gentherapie nicht von Nutzen wären [86]. Maruyama et al. demonstrierten den Gentransfer an gesunden Ratten mit Hilfe der Elektroporation. Zuerst wurden Elektrodenpaare in die Schenkelmuskulatur der Hinterbeine von anästhesierten Ratten eingesetzt, danach wurden zwischen den Elektroden Ratten-EPO exprimierende DNA-Plasmide als Vektoren injiziert [113]. Die Erzeugung von elektrischen Feldern resultierte in einer Erhöhung der Zellpermeabilität. Dadurch kann es zu einem Transport nackter DNA durch die Zellmembranen kommen [148]. In dieser Studie konnte ein signifikanter Anstieg des Hämatokrits von 49% auf 68% festgestellt werden. Die höchste Serumkonzentration wurde am siebten Tag mit 122 mU/ml gemessen, danach konnte bis zum 32. Tag ein allmählicher Abfall auf 36 mU/ml beobachtet werden [113].

## **Kovalente Polymerbindung an EPO**

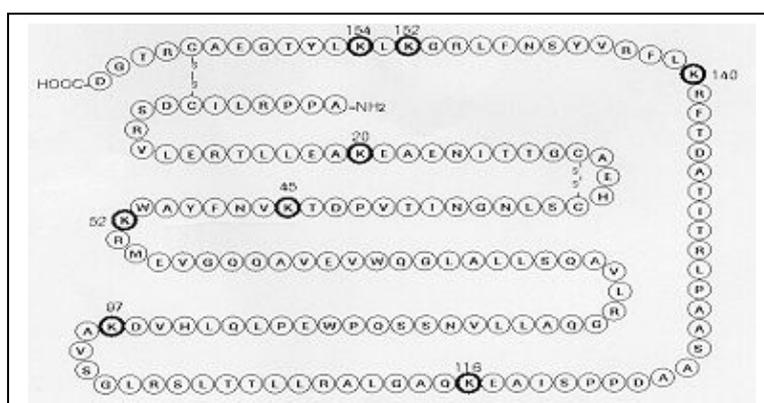
Eine Möglichkeit, die Eigenschaften von Proteinen zu verändern, ist die Anknüpfung von Polymeren. So wurden z.B. verschiedene Polyethylenglycole (PEG) über verschiedene Wege in Proteine eingebaut. PEG ist ein amphiphiles Polymer und besteht aus periodischen Ethylenoxid-Untereinheiten, deren Anzahl von einer ganzen Zahl  $n$  repräsentiert wird. Jeder Ethylenoxidrest hat eine Molekularmasse von 44 Da;  $n \times 44$  Da ergibt die durchschnittliche Molekularmasse einer PEG-Kette. Polyethylenglykol enthält zwei terminale Hydroxylgruppen, die üblicherweise (beispielsweise in Methoxygruppen) umgewandelt werden. Man unterscheidet lineare und verzweigte PEG-Ketten, die mittels Lysin oder Triazinen verbunden werden. Abb. 5 illustriert einige repräsentative PEG-Moleküle [12].

**Abb. 5:** Chemische Strukturen von repräsentativen PEG-Molekülen [12]  
(PEG = Polyethylenglykol, m = methoxy)

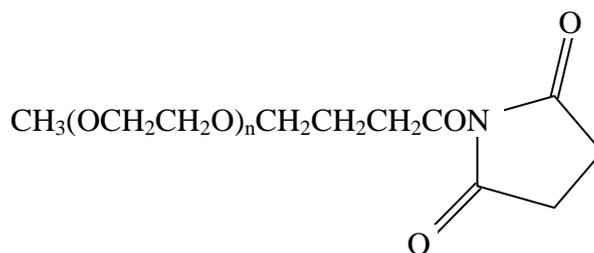


Die Pegylierung von Proteinen läuft in verschiedenen Schritten ab. Anhand eines Beispiels sollen diese vereinfacht dargestellt werden. Im Falle von EPO sind neun potentielle Stellen für die Anknüpfung von Polymeren über die  $NH_2$  Gruppen vorhanden. Dazu gehört die N-terminale Aminogruppe und die  $\epsilon$ -Amino Gruppe von acht Lysin-Resten, diese werden in Abb. 6 in der Primärstruktur von EPO hervorgehoben. Welche der neun primären Aminogruppen pegyliert wird, entscheiden die Konformation des Proteins, sowie die Größe und die Form der PEG-Moleküle. Bis jetzt wurde der N-Terminus und Lysin<sup>52</sup> als die wichtigsten pegylierten Stellen identifiziert [76]. Im ersten Schritt wird PEG an ein Reagenz gekoppelt, wie z.B. N-Hydroxysuccinimid-aktivierter Ester (Abb. 7). Diese Verbindung ermöglicht im zweiten Schritt, die Entstehung einer Protein-Amidbindung.

**Abb. 6:** Primärstruktur von EPO mit den neun potentiellen Anknüpfungsstellen:  $\epsilon$ -Amino Gruppe der acht Lysin-Reste und N-terminale Aminogruppe [76] ( $NH_2$  = N-terminale Aminogruppe, **K** = Lysin)



**Abb. 7:** Chemische Struktur der PEG-Reagenz-Verbindung (methoxy-PEG-succinimidyl-Buttersäure), dass zur Pegylierung der Proteine eingesetzt wird [76]



Als Resultat der Bindung, Pegylierung genannt, des PEG-Reagenz an das Protein EPO entsteht folgende chemische Struktur:



mit  $n =$  bis zu 1000 und  $m =$  Anzahl der PEG-Ketten.

Anstatt der Hydroxysuccinimid-aktivierten Ester können andere Reagenzien verwendet werden, wie beispielsweise: PEG-Epoxide (Alkylbindung), PEG-Carbonylimidazole (Urethanbindung), PEG-Nitrophenyl Carbonate (Urethanbindung) und PEG-Aldehyde (N-terminus: Schiff'sche Base). Auch funktionelle Gruppen auf Oberflächen von Proteinen (z.B.: Cystein und Oligosaccharide) können als Anknüpfungsort für die Pegylierung genutzt werden. Dafür kommen zum Beispiel folgende Reagenzien in Frage: PEG-Vinyl Sulfone (via freiem Cystein), PEG-Hydrazide (via Oligosacchariden) und PEG-Isocyanate (via Alkohol- oder Aminogruppen) [12].

Bailon und Berthold beschreiben 1998 die einzelnen Schritte der Pegylierung [12]. Zu den Faktoren, die die Pegylierung beeinflussen, gehören der pH-Wert, das molare Protein/PEG-Reagenz-Verhältnis, die Proteinkonzentration und sowohl die Reaktionszeit als auch -temperatur. Durch Kontrolle eines oder mehrerer Faktoren können gezielt mono-, di-, tri-, etc. Konjugate von PEG erzeugt werden. Die Pegylierung wird meistens mit gelösten Stoffen durchgeführt, kann jedoch auch in Festphase erstellt werden. Bei der Pegylierung in Lösungsphase beträgt das Verhältnis von Protein:PEG-Reagenz in einer typischen Lösungsreaktion mit Reagenzien wie N-Hydroxysuccinimid-aktiviertem Ester 1:3 – 5. Der pH liegt zuerst bei 7 – 8, die Temperatur bei 4 – 8 °C, und die Reaktion ist, nach anschließender Ansäuerung mit Essigsäure auf pH 4,5, in etwa 8 – 16 Stunden abgeschlossen. Das

Reaktionsgemisch wird mit Wasser verdünnt und auf einen Kationenaustauscher gegeben, wo überschüssiges Reagenz und Reaktionsnebenprodukte ausgewaschen werden. Pegyliertes Protein wird dann mittels steigender Salzkonzentration im Puffer von unmodifizierten Proteinen abgetrennt.

Bereits 1977 zeigten Abuchowski et al., dass pegylierte Proteine effektiver sind als die korrespondierenden unmodifizierten Proteine [3]. Bis heute wurden verschiedene Proteine pegyliert, deren zeitlicher therapeutischer Einsatz am Patienten in Tabelle 5 dargestellt wird.

**Tabelle 5:** Erste therapeutisch verwendete pegylierte Proteine und ihr therapeutischer Einsatz

1987	Adenosin deaminase	[74]; Kombinierte Immundefizienz
1988	Asparaginase	[81]; Akute lymphomblastische Leukämie
1990	Superoxid dismutase	[156]; Verbrennung, Arthritis
1988	Urikase	[29]; Non-Hodgkin Lymphoma
1991	Interleukin-2	[25]; Renales Zellkarzinom

Es ist möglich, PEG gezielt mit einer definierten Molekularmasse herzustellen. Mit der Anzahl der PEG-Moleküle, die an das Protein gebunden werden und mit der Erhöhung der durchschnittlichen Molekularmasses des PEG-Polymers, verbessern sich die Eigenschaften der pegylierten Proteine. Die positiven Effekte der Pegylierung der Proteine beruhen wahrscheinlich auf den veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften gegenüber dem Ausgangsmolekül. Dazu gehören Konformationsänderungen, sterische Beeinflussung und veränderte elektrostatische Bindungseigenschaften [12]. Die positiven Eigenschaften von pegylierten Proteinen in der klinischen Anwendung umfassen gesteigerte Hitzestabilität [70], Schutz vor proteolytischer Inaktivierung [1; 157; 164], verbesserte Löslichkeit [28], verlängerte Halbwertszeit in vivo [2; 130], eine verminderte Clearance und eine Reduktion der Immunogenität [3; 33; 129; 170]. Diskutiert wird folgende Theorie: aufgrund der Bildung eines PEG-Mantels um das Protein, wird sterisch eine Reaktion des Proteins mit Immunzellen (Makrophagen) verhindert [102] und eine proteolytische Inaktivierung stark verlangsamt [1; 157; 164].

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

#### **3.1 Versuchstiere und Tierhaltung**

Die durchgeführten Tierexperimente wurden beim Regierungspräsidium Karlsruhe beantragt und mit dem Aktenzeichen 35-9185.82/949/99 genehmigt. Für das Experiment wurden insgesamt 226 männliche Sprague-Dawley-Ratten der Fa. Janvier, Le Genest St Isle, Frankreich, verwendet. Bei ihrer Ankunft wogen die Ratten zwischen 350 g und 400 g und waren etwa 12 Wochen alt. Nach einer grobsinnlichen klinischen Untersuchung wurden die Ratten ohne wissentliche Auswahl in Gruppen von 3 – 4 Tieren in Makrolonkäfigen (20 x 59 x 38 cm) vom Typ IV auf Weichholzgranulat im Tierhaus des Zentrums für Medizinische Forschung, Klinikum Mannheim, Universität Heidelberg eingeteilt und gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant 22 +/- 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 55 +/- 5 %, der Lichtwechsel erfolgte im 12 Stunden Takt. Die Tiere wurden ad libitum mit pelletiertem Alleinfutter R/M-H (Fa. Ssniff, Soest) für Ratten und Mäuse gefüttert. Das Futter enthielt Rohprotein 19 %, Rohfett 3,3 %, Rohfaser 4,9 %, Rohasche 6,7 %, Lysin 1 %, Methionin 0,3 %, Calcium 1 %, Phosphor 0,7 %, Magnesium 0,2 % und Natrium 0,25 %. Als weitere Zusatzstoffe pro kg waren Vit. A 15.000 IE, Vit. D<sub>3</sub> 1.000 IE und Vit. E 100 mg enthalten. Das Trinkwasser stand den Ratten ad libitum zur Verfügung.

#### **3.2 Versuchsaufbau**

##### 3.2.1 Experimente

Zur Untersuchung der Pharmakodynamik verschiedener Erythropoietinmodifikationen beim chronischen Nierenversagen der SD-Ratte wurde das schon länger therapeutisch eingesetzte, biotechnisch hergestellte Erythropoietin (rekombinantes humanes Erythropoietin; EPO) mit einem derzeit in der klinischen Prüfung befindlichen neuen, durch Integration einer Methoxy-Polyethylglykolkette über dem Succinimolyt-butanoyl-Linker in EPO hergestellter Substanz Ro 503821 sowie eine Familie davon abgeleiteter Verbindungen (MIX) verglichen. Die Studie wurde in drei Experimente unterteilt. Im Experiment 1 wurden Ro 503821 (Ro 50) und das Gemisch (MIX) im Vergleich zum herkömmlichen EPO und einer Kontrollgruppe auf ihre Effektivität hin geprüft. Im Experiment 2 wurde die Applikationsfrequenz von Ro 50 und

MIX im Vergleich zum herkömmlichen EPO und einer Kontrollgruppe geprüft und im Experiment 3 wurde eine Dosis-Wirkungskurve der Substanz- und Kontrollgruppen erstellt. Die verschiedenen Substanzen wurden subkutan appliziert. Die einzelnen Experimente, Medikationen, Anzahl der Tiere, Dosierung und die Applikationsfrequenz sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6:** Darstellung der drei Experimente (Ro 50 und MIX beschreiben die benutzten Testchargen: Ro 50 ist zu 96,1 % mono-, zu 3,8 % dipegyliert und enthält zu 0,2 % EPO; MIX ist zu 70,9 % mono-, zu 27,1 % di- und zu 1,7 % tripegyliert; EPO = rekombinantes humanes Erythropoietin; NaCl = physiologische Kochsalzlösung; n = Anzahl der Tiere in den jeweiligen Dosierungsgruppen)

Versuch	Medikation [ $\mu\text{g}/\text{kg KM}$ ]			Dosierung und Applikationsfrequenz
<b>Experiment 1:</b> (Prüfung der Effektivität) Prüfung von 2 neuen EPO-Modifikationen in je 2 Konzentrationen im Vergleich zu herkömmlichem EPO und zur Kontrolle	Ro 50	0,25	(n=13)	niedrige Dosis; 1-mal wöchentlich
	Ro 50	2,5	(n=11)	hohe Dosis; 1-mal wöchentlich
	MIX	0,25	(n=11)	niedrige Dosis; 1-mal wöchentlich
	MIX	2,5	(n=11)	hohe Dosis; 1-mal wöchentlich
	EPO	0,25	(n=12)	Norm-Dosis; 3-mal wöchentlich
<b>Experiment 2:</b> (Prüfung der Applikationsfrequenz) Anwendung verschiedener Applikationsfrequenzen bei der erfolgreichen EPO-Modifikation (Ro 50) im Vergleich zu herkömmlichem EPO und Kontrolle	Ro 50	0,25	(n=12)	niedrige Dosis; 3-mal wöchentlich
	Ro 50	0,75	(n=12)	hohe Dosis; 1-mal wöchentlich
	EPO	0,25	(n=12)	niedrige Dosis; 3-mal wöchentlich
	EPO	0,75	(n=12)	hohe Dosis; 1-mal wöchentlich
	NaCl	0,9 %	(n=11)	1-mal wöchentlich
<b>Experiment 3:</b> (Dosis-Wirkungsbeziehung) Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve der erfolgreichen EPO-Modifikation im Vergleich zu herkömmlichem EPO und Kontrolle	Ro 50	0,75	(n=13)	niedrige Dosis; 1-mal wöchentlich
	Ro 50	2,5	(n=12)	3,5-fache Dosis; 1-mal wöchentl.
	Ro 50	7,5	(n=13)	10-fache Dosis; 1-mal wöchentlich
	EPO	0,75	(n=14)	Norm-Dosis; 1-mal wöchentlich
	NaCl	0,9 %	(n=12)	1-mal wöchentlich

### 3.2.2 Zeitlicher Ablauf der Experimente

Die Ratten wurden nach ihrer Ankunft in Gruppen von 3 – 4 Tieren auf die Käfige verteilt. Es folgte eine Eingewöhnungsphase von einer Woche, damit die Ratten sich an die neue Umgebung adaptieren konnten. Dann folgte eine zweidrittel-Nephrektomie links und nach einer zweiwöchigen Ruhepause wurde eine Nephrektomie rechts durchgeführt. In der

Folgeweche wurde der systolische Blutdruck mittels Schwanzplethysmographie zu Trainingszwecken gemessen, um die Tiere an diese Untersuchungsmethoden zu gewöhnen. Die erste Blutentnahme und die erste reguläre Blutdruckmessung erfolgten dann eine Woche vor Beginn der Medikation. Der Versuchsablauf ist nachfolgend tabellarisch (Tab. 7) dargestellt.

---

**Table 7:** Zeitlicher Ablauf der Experimente 1 - 3

---

Experiment 1:

1. Tag:	zweidrittel-Nephrektomie linke Niere
14. Tag:	Nephrektomie rechte Niere
23. Tag:	Blutdruck (BD) - Training
28. Tag:	Blutentnahme, Blutdruckmessung (0. Woche)
35. Tag:	Beginn Medikation
nach:	
1 Woche:	1. Blutentnahme
2 Wochen:	2. Blutentnahme, Blutdruckmessung
3 Wochen:	3. Blutentnahme
4 Wochen:	4. Blutentnahme, Blutdruckmessung, Euthanasie

Experiment 2:

1. Tag:	zweidrittel-Nephrektomie linke Niere
14. Tag:	Nephrektomie rechte Niere
23. Tag:	Blutdruck-Training
28. Tag:	Blutentnahme, Blutdruckmessung (-1. Woche)
35. Tag:	Blutentnahme (0. Woche)
43. Tag:	Beginn Medikation
nach:	
1 Woche:	1. Blutentnahme
2 Wochen:	2. Blutentnahme, Blutdruckmessung
3 Wochen:	3. Blutentnahme
4 Wochen:	4. Blutentnahme, Blutdruckmessung, Euthanasie

Experiment 3

1. Tag:	zweidrittel-Nephrektomie linke Niere
14. Tag:	Nephrektomie rechts
28. Tag:	Blutdruck-Training
32. Tag:	Blutentnahme, Blutdruckmessung (0. Woche)
41. Tag:	Beginn Medikation
nach:	
1 Woche:	1. Blutentnahme
2 Wochen:	2. Blutentnahme, Blutdruckmessung
4 Wochen:	3. Blutentnahme, Blutdruckmessung
6 Wochen:	4. Blutentnahme, Blutdruckmessung
8 Wochen:	5. Blutentnahme, Blutdruckmessung, Antikörperbestimmung
9 Wochen:	Euthanasie der Tiere der Dosierung Ro 50 2,5 µg/kg und Ro 50 7,5 µg/kg
10 Wochen:	6. Blutentnahme, Blutdruckmessung, Antikörperbestimmung
12 Wochen:	7. Blutentnahme, Blutdruckmessung, Antikörperbestimmung, Euthanasie

---

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Messung des systolischen Blutdrucks

Der systolische Blutdruck wurde in zweiwöchentlichem Abstand vormittags, immer einen Tag vor der Blutentnahme gemessen. Die Blutdruckmessung fand in dem Raum statt, in dem die Ratten auch gehalten wurden, um sie nicht durch den Transport in einen anderen Raum zu beunruhigen. Die nichtinvasiven Messungen erfolgten am Rattenschwanz mit Hilfe des Sphygmomanometer S-2 (Fa. Hugo Sachs Elektronik, March). Die gesamte Anlage besteht im Einzelnen aus dem Meßgerät Sphygmomanometer, einem Aufwärmkasten aus Plexiglas mit angepaßten Heizlüftern und dem Oszilloskop, mit dem die Pulsation des Meßsignals beobachtet werden kann. Zu Beginn wurden drei Ratten in je einen Rattenrestrainer aus Plexiglas in den Aufwärmkasten gesetzt und bei konstanter Temperatur von 34 °C ca. 20 – 30 min aufgewärmt. An die jeweils zu messende Ratte wurde am Schwanzansatz eine Manschette und kaudal davon ein Piezo-Sensor angelegt. Nachdem eine gleichmäßige und regelmäßige Pulswelle auf dem Oszilloskop erreicht worden war, wurde die Messung durchgeführt. Die Manschette wurde dafür schnell aufgepumpt (im Durchschnitt bis zu einem Druck von 200 mm Hg), bis die Pulsation im Oszilloskop verschwand. Dann wurde eine langsame vom Gerät gesteuerte Druckabsenkung eingeleitet, bis die Pulsation wieder auf dem Oszilloskop erschien. Die Druckabsenkung wurde manuell gestoppt und der zu diesem Zeitpunkt herrschende systolische Druck wurde vom Gerät abgelesen und notiert. Bei jedem Tier wurden 4-5 Messungen pro Untersuchungszeitpunkt vorgenommen.

#### 3.3.2 Blutprobenentnahme

Die Blutentnahme erfolgte unter Äthernarkose durch retrobulbäre Punktion. Von jedem Tier wurde jeweils 1,0 ml Blut für die Bestimmung der Nierenparameter und 0,5 ml Blut für die Blutbildbestimmung in EDTA-KE/-1.3-Eppendorfgefäße entnommen. Für das Experiment 3 wurde viermal eine Antikörperbestimmung vorgenommen, für die zusätzliche 0,3 ml Blut in Eppendorfgefäße ohne Antikoagulantien aufgefangen wurde. Die gefüllten 1,0 ml EDTA-KE/-1.3-Eppendorfgefäße und die 0,3 ml unbeschichteten Eppendorfgefäße wurden bei 4000 U/min zentrifugiert, um das Plasma und das Serum (Ak-Bestimmung) zu gewinnen. Die mit 0,5 ml Blut gefüllten EDTA-KE/-1.3-Eppendorfgefäße wurden ca. eine halbe Stunde auf einem Taumel-Rollenmischer (Fa. Contraves, Northampton) gedreht. Mit dem Blutanalysegerät Cell-Dyn 3500 (Fa. Abbott, Wiesbaden) wurde aus dem Vollblut (0,5 ml

EDTA-KE/-1.3-Eppendorfgefäß) der Hämatokrit (Hkt), der Hämoglobin Gehalt (Hb), und die Anzahl der Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten bestimmt. Für das Experiment 3 wurden zusätzlich das Mittlere Korpuskuläre Zellvolumen (MCV), das Mittlere Korpuskuläre Zellhämoglobin (MCH) und die Mittlere Korpuskuläre Zellhämoglobinkonzentration (MCHC) mit dem oben genannten Gerät durchgeführt. Die Retikulozytenzählung erfolgte flowzytometrisch mittels eines EPICS XL-MCL (Fa. Coulter Electronics, Krefeld). Die Färbung erfolgte dabei mit dem Supravitalstoff Thiazol-Orange.

In dem EDTA-Plasma wurden der Gehalt von Harnstoff, Kreatinin, Cholesterin, Triglyzeride, Phosphat, Glukose, Glutamat-oxalazetat-transaminase (GOT), Glutamat-pyruvat-transaminase (GPT) und Alkalische Phosphatase (ALP) mit einem Hitachi Automatic Analyzer (Fa. Roche, Mannheim) und die Proteinkonzentration über eine Coomassiefärbung (Pierce) bestimmt. Die Antikörperbestimmung wurde mittels ELISA-Kit (Fa. Boehringer, Mannheim) an der Humboldt Universität/Universitätsklinikum Charité in Berlin von Prof. Dr. med. Gross durchgeführt.

### 3.3.3 Feststellung der Körpermasse

Die Bestimmung der Körpermasse fand in dem Raum statt, in dem die Ratten auch gehalten wurden, um sie nicht durch den Transport in einen anderen Raum zu beunruhigen. Für die Messung wurde eine Ratte jeweils in einen mit Zellstoff ausgelegten Makrolonkäfig (14 x 26,5 x 20,5 cm) vom Typ II gesetzt, der sich auf einer Waage (Fa. Kern, 440 – 47, Balingen-Frommern) befand.

### 3.3.4 Medikation

EPO (Epoetin beta) als auch zwei neue Erythropoiese-stimulierende Substanzen (Ro 50 und MIX) wurde von Firma Roche Diagnostics GmbH synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die nach Sepharose-Chromatographie enthaltenen Fraktionen wurden dann, gelöst in Phosphat-Puffer (10 mM Natrium/Kalium-Phosphat) mit einem pH von 7,5 auf Trockeneis verschickt.

**Tabelle 8:** Charakterisierung der mit Ro 50 und MIX bezeichneten Testchargen

	Monopegyliert	Dipegyliert	Tripegyliert	Unpegyliert
Ro 50	96,1 %	3,8 %	-	0,2 %
MIX	70,9 %	27,1 %	1,7 %	0,1 %

Die Stammlösungen wurden von der Firma Roche, Mannheim hergestellt. Für Experiment 1 und 2 hatte die Testcharge (Ro 50) eine Konzentration, bezogen auf den Proteingehalt, von 1,72 mg/ml. Um einen Proteingehalt von 1 mg/ml zu erhalten, wurde eine Stammlösung aus 1 ml Ro 50-Lösung, 0,5 ml 0,9 % iger NaCl und 0,220 ml frisch gewonnenem Rattenserum hergestellt. Im Experiment 3 hatte Ro 50 einen Proteingehalt von 4,55 mg/ml, daher wurde die Stammlösung aus 1 ml Ro 50-Lösung, 2,9 ml NaCl und 0,6 ml frisch gewonnenem Rattenserum gemischt.

Im Tierhaus des Zentrums für Medizinische Forschung, Klinikum Mannheim, Universität Heidelberg wurden, die aus den verschiedenen Stammlösungen abgefüllten, 50 µl Aliquots in Polystyrenröhrchen bis zum Tage der Injektion bei -22° bis -24 °C aufbewahrt und vor der s.c. Applikation mit 19,95 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung auf ein Volumen von 20 ml gebracht. Dies entspricht bei einem Applikationsvolumen von 2 ml/kg einer Dosierung von 2,5 µg/kg KM. Daraus wurde ein 1:10 Verdünnung hergestellt (2 ml in 18 ml 0,9%iger Kochsalzlösung), um eine Dosierung von 0,25 µg/kg KM zu erhalten. Die Tabelle 9 zeigt die weiteren Verdünnungen, die nötig waren, um die erforderliche Dosis zu erhalten.

Die Testcharge MIX hatte eine Konzentration, bezogen auf den Proteingehalt, von 0,768 mg/ml. Zu 1 ml MIX-Lösung wurden 0,356 ml 0,9%iger NaCl und 0,180 ml frisch gewonnenes Rattenserum gegeben (Fa. Roche, Mannheim). Das weitere Aufbewahren der Charge und die Herstellung der Verdünnungen wurden, wie bei Ro 50 beschrieben, vorgenommen. In der Tabelle 9 sind die Verdünnungen für die erforderliche Dosis aufgeführt.

**Tabelle 9:** Verdünnung der Stammlösung von Ro 50 und MIX mit 0,9 %iger Kochsalzlösung (NaCl), um die erforderliche Dosis der Injektionslösung herzustellen

Dosis [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM]	Stammlösung [ $\mu\text{l}$ ]	NaCl [ml]
0,25	2,5	19,997
0,75	7,5	19,992
2,5	25	19,975
7,5	75	19,925

### 3.3.5 Zweidrittel-Nephrektomie, linke Seite

Eine Woche nach Ankunft der Ratten wurde eine zweidrittel-Nephrektomie vorgenommen. Zur Anästhesie wurde eine Injektions-Kombinationsnarkose mit 75 mg/kg KM Ketamin (Hostaket®, Fa. Hoechst Roussel Vet, Unterschleißheim) und 5 mg/kg KM Xylazin (Rompun® 2 %, Fa. Bayer Vital, Leverkusen) i.m. verwendet. Vor der Operation wurde die Tiefe der Narkose über den Zwischenzehenhautreflex getestet. Bei positivem Reflexergebnis wurde Ketamin i.p. nachdosiert. Um die Augen während der Narkose vor dem Austrocknen zu schützen, wurde Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen®Roche, Roche Nicholas, Eppstein) verabreicht. Nachdem die Körpermasse der Tiere ermittelt worden war, wurde die linke Bauchwand rasiert und mit Propanol-Benzalkonium Gemisch (Cutasept®F, Fa. Bode, Hamburg) desinfiziert.

**Abb. 8** zeigt eine anästhesierte und mit Augensalbe versorgte Sprague-Dawley Ratte auf der Wärmeplatte. Das Operationsfeld ist geschoren und desinfiziert



Während der gesamten Operation und der Nachbehandlung wurden die anästhesierten Tiere auf Wärmeplatten (36 °C) gelagert, um sie vor Auskühlung zu schützen. Die desinfizierte Haut (Abb. 8) und die Bauchhöhle wurde dann mit einem 1,5 cm langen Schnitt durch Haut und Muskulatur 1 cm parallel zur Wirbelsäule eröffnet. Die Niere konnte dann vorsichtig vorgelagert (Abb. 9) und die Nierenkapsel mit einem Skalpell eröffnet werden.

**Abb. 9** stellt die linke Seite einer anästhesierten Ratte dar, an der ein etwa 1,5 cm langer Schnitt durch Haut und Muskulatur, 1 cm parallel zur Wirbelsäule durchgeführt wurde. Die Niere ist, befreit von der Nierenkapsel, vorgelagert



**Abb. 10** demonstriert die Resektion des vorderen und hinteren Nierenpols der abgeklemmten linken Niere



Anschließend wurde der Nierenhilus (A. und V. renalis, Ureter) mit einer Bulldog-Klemme abgeklemmt. Der vordere und der hintere Nierenpol wurde mit einer Schere unter Schonung des Nierenbeckens entfernt (Abb. 10). Das restliche Nierengewebe wurde mit Cellulose (Tabotamp®, Fa. Johnson & Johnson, Norderstedt), einer resorbierbaren Hämostyptikumfaser, umwickelt (Abb. 11), um die Blutung zu stoppen.

**Abb. 11** zeigt die abgeklemmte Niere, umwickelt mit der resorbierbaren Hämostyptikumfaser



Nachdem die Bulldog-Klemme entfernt worden war, wurde die umwickelte Restnieren 1 Minute beobachtet und zurückverlagert. Dann wurden Peritoneum und Muskelschicht durch eine fortlaufende Naht verschlossen (4/0 Faden Vicryl®, Fa. Johnson & Johnson, Norderstedt). Auf die Muskelnäht wurden 2-3 Tropfen Polyvidon-Iod (Braunol®2000, Fa. Braun, Melsungen) gegeben und die Haut dann durch Wundklammern verschlossen (nach Dr. Sticks 14 mm NS). Der Wundbereich wurde gesäubert und mit Sprühpflaster (BAND-AID®, Fa. Johnson & Johnson, Norderstedt) versorgt.

Zur postoperativen Nachsorge wurden 4 ml auf Körpertemperatur erwärmte physiologische Kochsalzlösung s.c. auf zwei Stellen verteilt verabreicht. Antibiotisch wurde den Ratten 100 mg/kg KM Mezlocillin (Baypen®, Fa. Bayer, Leverkusen) i.p. und zur Analgesie 0,01 mg/kg Buprenorphin-hydrochlorid (Temgesic®, Fa. Essex Pharma, München) s.c. gegeben. Die Ratten wurden in der Aufwachphase unter ständiger Überwachung unter eine vorgewärmte und ausgepolsterte Abzugshaube gelegt, bis sie dann nach dem Aufwachen in mit Zellstoff ausgelegte Käfige gesetzt werden konnten. Am darauffolgenden Tag wurden die Hautnähte

kontrolliert und die Ratten in Käfige, die mit Weichholzgranulat ausgelegt waren, gesetzt. Die Wundklammern wurden nach 10 – 14 Tagen entfernt.

#### Nephrektomie, rechte Seite

Die Nephrektomie rechts wurde 14 Tage nach der zweidrittel-Nephrektomie durchgeführt. Es wurde die gleiche Anästhesie wie bei der zweidrittel-Nephrektomie links gewählt. Auch die präoperative Vorbereitung verlief wie schon beschrieben. In der rechten Bauchregion wurde ein 1,5 cm langer Schnitt durch Haut und Muskulatur 1 cm parallel zur Wirbelsäule gesetzt. Die Niere wurde vorsichtig vorgelagert und die Nierenkapsel mit einem Skalpell eröffnet. Anschließend wurden auf die Gefäße und den Ureter zwei Ligaturen mit je drei Knoten gesetzt. Die Gefäße wurden distal der Ligaturen mit einem Skalpell durchtrennt und die abgetrennte Niere wurde entfernt. Nach Prüfung, ob die durchtrennten Gefäße verschlossen waren, wurde der Hilusstumpf zurück verlagert und der Muskel- und Hautschnitt wurden, wie bereits beschrieben, adaptiert. Zur Nachsorge wurde 4 ml/pro Ratte auf Körpertemperatur erwärmte 0,9 %ige Kochsalzlösung, und 0,01 mg/kg Buprenorphin (Temgesic®, Fa. Essex Pharma, München) s.c. gegeben.

#### 3.3.6 Verluste und Euthanasie von Tieren vor Beginn der Medikation

Vor Beginn der Medikation und der Gruppeneinteilung für Experiment 1 verstarben 4 Ratten von 73 Tieren, und 1 Ratte wurde aufgrund eines hochgradig verschlechterten Allgemeinbefindens euthanasiert.

Beim Experiment 2 starben 5 von 76 Tieren nach der zweidrittel-Nephrektomie links. Nach der Nephrektomie rechts, zwei Wochen später, verstarben 7 Ratten. Aufgrund erhöhter Harnstoffwerte im Blutplasma (> 200 mg/dl) wurden 5 Tiere vor Verabreichung der ersten Medikation euthanasiert.

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung im Experiment 3 verstarben 9 von 77 Tieren nach der zweidrittel-Nephrektomie links. Nach der Nephrektomie rechts, zwei Wochen später, verstarb 1 Ratte. Nach der ersten Blutentnahme verstarb 1 Ratte aufgrund eines akuten Herz-Kreislaufversagens. Vor Beginn der Medikation wurde 1 Ratte mit erhöhtem Harnstoffwert

und 1 Ratte wurde aufgrund eines hochgradig verschlechterten Allgemeinbefindens euthanasiert.

### 3.3.7 Verluste und Euthanasie von Tieren nach Beginn der Medikation

Im Experiment 1 wurden zwei Wochen nach Beginn der Medikation 4 Ratten euthanasiert. Drei Tiere gehörten davon der EPO-Gruppe (0,25 µg/kg KM) an und 1 Tier der MIX-Gruppe (0,25 µg/kg KM). Sie zeigten erhöhte Harnstoffwerte im Blutplasma (> 200 mg/dl) und/oder einen hohen Gewichtsverlust (> 10 % der Körpermasse).

Im Experiment 2 wurde bis zum Versuchsende weder ein Tier wegen erhöhten Harnstoffwerten, verschlechtertem Allgemeinbefinden oder anderen Nebenwirkungen euthanasiert werden, noch ist ein Tier verstorben.

Während des Experimentes 3 verstarb 1 Tier und 8 Tiere wurden euthanasiert. Von diesen 8 Tieren wurde in der 5. Woche 1 Tier der Ro 50-Gruppe (2,5 µg/kg KM) aufgrund von hohem Gewichtsverlust (> 10% des Körpermasse) und 1 Tier dieser Gruppe aufgrund von Krämpfen und Zittern euthanasiert. In derselben Woche wurde 1 Tier der Ro 50-Gruppe (7,5 µg/kg KM) aufgrund eines hohen Gewichtsverlust (> 10 % der Körpermasse) euthanasiert. In der sechsten Wochen wurde 1 Tier der Kontrollgruppe mit Anzeichen von Krämpfen und Zittern und 1 Ratte der Ro 50-Gruppe (7,5 µg/kg KM) mit einer partiellen Lähmung der linken Vorder- und Hinterhand euthanasiert. In der siebten Woche wurde 1 Tier der Ro 50-Gruppe (2,5 µg/kg KM) mit Symptom des Zitterns euthanasiert. Acht Wochen nach Beginn der Medikation wurden 2 Tiere der Ro 50-Gruppe (7,5 µg/kg KM) mit schlechtem Allgemeinbefinden euthanasiert, dabei zeigte eines der Tiere eine gelähmte Hinterhand. Danach wurden die Tiere, die mit Ro 50 2,5 µg/kg KM und Ro 50 7,5 µg/kg KM behandelt wurden aufgrund ständig steigender Hämatokritwerte und dem daraus resultierenden schlechten Allgemeinzustand in der achten Woche aus dem Experiment genommen. In der neunten Woche wurde 1 Tier der EPO-Gruppe (0,75 µg/kg KM) tot im Käfig aufgefunden.

### 3.3.8 Euthanasie der Tiere zum Versuchsende und histologische Aufarbeitung

Am Ende jedes Abschnittes wurden die Ratten mit der gleichen Injektions-Kombinationsnarkose wie bei den operativen Eingriffe (siehe Kapitel 3.3.5), narkotisiert. Dann wurden die Ratten gewogen.

#### Perfusion und Sektion

Ein Drittel der Ratten des Experimentes 3 wurden perfundiert, alle anderen Ratten wurden lediglich einer Sektion unterzogen. Für die Perfusion wurde die narkotisierte Ratte auf einem Korkbett fixiert. Nach einer Laparotomie wurde die Aorta abdominalis und Vena cava inferior bis zu den Aa. renales freipräpariert und kaudal im Bereich der Aortengabelung abgeklemmt. Mit einer Butterfly-19-G-Kanüle (Vasuflo®, Fa. Dispomed Witt, Gelnhausen), der an die Flüssigkeitsleitung der Perfusionsanlage angeschlossen war, folgte nun die Punktion der Aorta. Die Kanüle wurde dann mit einer Bulldog-Klemme in der Aorta fixiert. Nach der Eröffnung der Vena cava im kaudalen Drittel wurden die Ratten für 90 sec mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) bei 280 mbar Druck und weitere 90 sec bei 220 mbar Druck perfundiert. Zur Membranstabilisierung wurden die Ratten danach noch 180 sec bei 220 mbar Druck mit 18 % Saccharose-Lösung perfundiert. Bei der anschließenden Sektion wurden die Organe makroskopisch beurteilt. Zur weiteren Bearbeitung wurde ein Organspektrum entnommen, bestehend aus dem Nierenrest der zweidrittel-Niere (Querschnitt), zweier Scheiben aus den Hauptlappen der Leber, einer Querschnittsscheibe der Milz und zweier Anschnitte aus beiden Hauptlappen der Lunge. In den Experimenten 2 und 3 wurden zusätzlich noch Knochen (Femur und Tibia) entnommen. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, PFA und 18 % Saccharose-Lösung, ist im Anhang aufgeführt.

Die Organe wurden wie folgt aufgearbeitet:

1. Paraffinhistologie: Der verbliebene Nierenrest wurde als Querschnitt mit einer Größe von ca. 1 cm x 0,5 cm in 4 % gepuffertes Formaldehyd für 24 h, gemeinsam mit jeweils einem Stückchen des rechten und des linken Leberlappens von derselben Größe und je einem Stück Milz und Lunge in ein Probegläschen eingelegt. Danach wurden die Organe zur Paraffineinbettung weiterprozessiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösung, 4 % Formaldehyd, ist im Anhang aufgeführt.
2. Kryopräparate: Ein Stück des Nierenrestes der zweidrittel-Niere wurde in Kryomulden (Cryomolds®, Fa. Vogel, Giessen) auf einen Tropfen Tissue-Tek®-Gel (Fa. Sakura Finetek,

Zoeterwonde, NL) gelegt. Die Kryomulden wurden dann mit Tissue-Tek®-Gel vollständig aufgefüllt und, um das Gewebe beim Einfriervorgang zu schonen, zuerst in gefrierendes 2-Methylbutan gehalten. Nachdem die Probe gefroren war, wurde sie in flüssigem Stickstoff nachgefroren und anschließend bei  $-80\text{ °C}$  in Alufolie-Tüten gelagert.

3. Knochenmark: Femur und Tibia wurden weitgehend von der Muskulatur freipräpariert. Die Knochen wurden für mindestens 5 Tage in 4 % gepuffertes Formaldehyd eingelegt, danach wurden die verbliebenen Muskeln vollständig abgelöst. Die Knochen wurden mit Hilfe einer Knochensäge (Trennbandsäge, Fa. Exakt, Norderstedt) längs geschnitten und 3 Wochen in eine Entkalkungslösung auf einem Rotationsschüttler gelagert. Die Entkalkungslösung wurde jede Woche ersetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, 4 % Formaldehyd und Entkalkungslösung, ist im Anhang aufgeführt.

Die Organpräparate wurden anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) gefärbt. Die Farbstoffe sind im Anhang aufgeführt.

### **3.4 Histologische Untersuchung der Organpräparate**

Die Organe Niere, Leber, Lunge, Milz und Knochenmark wurden auf patho-histologische Veränderungen untersucht. Der Schweregrad der Veränderungen wurde mittels einer graduellen Einstufung beurteilt (Grad 1 – 4). Minimale, sehr wenige bzw. sehr kleine Veränderungen wurden als Grad 1; geringgradige, wenige bzw. kleine Veränderungen als Grad 2; mittelgradige, in mäßiger Anzahl bzw. in mäßiger Größe auftretende Veränderungen als Grad 3 und hochgradige, viele bzw. große Veränderungen als Grad 4 beurteilt. In Tabelle 10 sind die so ermittelten histologischen Veränderungen aufgelistet. Einzelne herdförmige patho-histologische Veränderungen von Niere, Leber und Lunge wurden als Grad 1 (minimal), mehrere herdförmige Veränderungen als Grad 2 (geringgradig), alle Veränderungen, die zwischen Grad 2 und 4 liegen als Grad 3 (mittelgradig) und Veränderungen, die das gesamte Organ betrafen, als Grad 4 beurteilt. Geringgradige diffuse Vergrößerungen der Milzfollikel wurden als Grad 2 und mittelgradige als Grad 3 beurteilt. In der Milz wurde die gesteigerte extramedulläre Erythropoiese und im Knochenmark die gesteigerte medulläre Erythropoiese im Vergleich zu den Kontrollen je nach Stärke des Auftretens beurteilt.

---

**Tabelle 10:** Histologische Veränderungen, die in jedem Organ mit dem Gradingcode beurteilt wurden

---

Histologisch beurteilte Nierenveränderungen

- a) interstitielle entzündliche Zellinfiltrate
- b) interstitielle Fibrose
- c) Tubulusdilatation
- d) Zystenbildung
- e) tubuläres Protein
- f) basophile Tubuli
- g) Glomerulopathie
- h) Pyelitis
- i) Kapsel­fibrose

Histologisch beurteilte Milzveränderungen

- a) folliculäre Milzhyperplasie
- b) extramedulläre Erythropoiese

Histologisch beurteilte Knochenmarkveränderungen

Im Knochenmark von Femur und Tibia wurde die medulläre Erythropoiese beurteilt.

Histologisch beurteilte Leberveränderungen

- a) interstitielle entzündliche Zellinfiltrate
- b) perivaskuläre entzündliche Zellinfiltrate

Histologisch beurteilte Lungenveränderungen

- a) interstitielle entzündliche Zellinfiltrate
  - b) perivaskuläre entzündliche Zellinfiltrate
- 

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Daten sowie die Erstellung der graphischen Abbildungen im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte auf den Rechnern des Zentrums für Medizinische Forschung der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg und im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen. Die Ergebnisse der wöchentlich durchgeführten Blutuntersuchungen, Blutdruckmessungen und Körpermasse wurden als arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen beschrieben und graphisch wiedergegeben. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung des Statistikprogramms SAS für Windows 8.1 und BMDP/Dynamic, Release 8.0 [35], erstellt. Zusätzlich wurde in Anlehnung an den Versuchsplan für die folgenden Parameter: prozentuale Retikulozytenzahl, Hämatokrit, Kreatinin und Blutdruck eine mehrfaktorielle

---

Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) mit Messwiederholungen (Programm BMDP 2 V) durchgeführt. Da der Parameter Kreatinin eine rechtsschiefe Verteilung aufwies, wurden dessen Werte logarithmisch transformiert, um in guter Annäherung eine Normalverteilung zu gewinnen. Dabei wurden die Kontrollgruppen rein deskriptiv zum Vergleich mitgeführt. In Experiment 1 wurde die ANOVA mit den Gruppen durchgeführt, die die Substanz MIX und Ro verabreicht bekommen haben. In den Experimenten 2 und 3 wurde die ANOVA mit den Gruppen durchgeführt, die Ro und EPO verabreicht bekommen haben.

Die histologische Auswertung der Experimente 1 – 3 wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auf einem Olympus BH-2 Mikroskop des Zentrums für Medizinische Forschung der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg vorgenommen. Die Inzidenz der patho-histologischen Veränderungen wurde tabellarisch dargestellt und mit Hilfe des Kruskal-Wallis Test (Programm BMDP 3 S) zwischen den Versuchsgruppen verglichen. Die, im Experiment 3 zusätzlich durchgeführte Antikörperbestimmung wurde als dichotome Variable (Ak gegen die Medikation vorhanden/nicht vorhanden) analysiert. Alle Ergebnisse wurden mittels  $\chi^2$ -Test (SAS-Procedure) verglichen. Bei Erwartungswerte  $< 5$  wurde der Fisher's-exact-Test (SAS-Procedure) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Experiment 1

Bei der Prüfung der Effektivität wurde EPO mit zwei EPO-Modifikationen im Hinblick auf die Erythropoese verglichen. Ein allgemeines Screening der aufgetretenen Nebenwirkungen wurde dokumentiert. Die Tiere wurden ohne wissentliche Auswahl in verschiedene Dosis-Gruppen zugeteilt.

Dosierungsgruppen:

Ro 50	0,25	(0,25 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
Ro 50	2,5	(2,5 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
MIX	0,25	(0,25 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
MIX	2,5	(2,5 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
EPO	0,25	(0,25 µg/kg KM);	3-mal wöchentlich
NaCl		(0,9 %ig) ;	1-mal wöchentlich

Die therapeutische Wirkung des biotechnisch hergestellten Erythropoietins mit der Dosierung 0,25 µg/kg KM (bei 3-mal wöchentlicher Gabe) geht aus früheren Untersuchungen hervor [10; 17]. Diese Dosierung ist die empfohlene therapeutische Höchstdosierung beim Menschen in der Therapie der Anämie des chronischem Nierenversagen [10]. Um die Wirkung von EPO mit den EPO-Modifikationen zu vergleichen, wurde die bekannte Dosierung von EPO für die EPO-Modifikationen auf ein Drittel reduziert (0,25 µg/kg KM) und um den Faktor drei vervielfacht (2,5 µg/kg KM) bei jeweils einmaliger Gabe pro Woche.

#### 4.1.1 Blutparameter

**Absolute Retikulozytenzahl und prozentuale Retikulozytenzahl:** Die Veränderungen der absoluten und prozentualen Retikulozytenzahl in den verschiedenen Gruppen sind in den Abb. 12 und 13 dargestellt. Beide Parameter zeigen ähnliche Verläufe. Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die beiden Gruppen Ro 50 0,25 und MIX 0,25 mit niedriger Dosierung (0,25 µg/kg KM) zeigen während der vierwöchigen Versuchszeit keinen deutlichen Anstieg der absoluten Retikulozytenzahl. Die maximale Anzahl der absoluten Retikulozyten liegt bei allen drei Gruppen während der gesamten Versuchszeit bei etwa  $0,5 \pm 0,10 \times 10^6/\mu\text{l}$ . Im Vergleich dazu zeigen die hochdosierten Gruppen Ro 50 2,5 und MIX 2,5 (2,5 µg/kg KM), wie auch EPO (0,25 µg/kg KM) in der ersten Woche einen deutlichen Anstieg der Parameter. Die absolute Retikulozytenzahl in der Gruppe EPO steigt von  $0,38 \pm 0,14 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf  $0,80 \pm 0,04 \times 10^6/\mu\text{l}$  (1. Woche). Bis zum Versuchsende jedoch

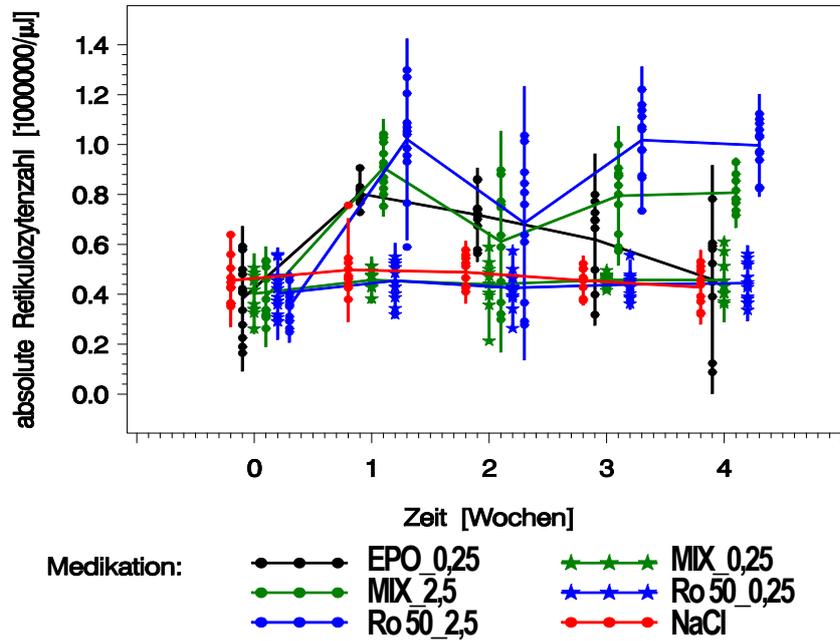
fallen die Retikulozytenzahlen der Gruppe EPO langsam wieder auf Zahlen, die im Bereich der Retikulozytenzahlen der Kontrolltiere liegen ( $0,45 \pm 0,23 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Die absolute Retikulozytenzahl der Gruppe MIX 2,5 ( $2,5 \mu\text{g/kg KM}$ ) steigt von  $0,39 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf  $0,90 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$  in der ersten Woche. Im weiteren Verlauf kommt es, nach einem Abfall der Retikulozytenzahl auf  $0,61 \pm 0,22 \times 10^6/\mu\text{l}$  (2. Woche), wieder zu einem Anstieg der Retikulozytenzahlen auf  $0,79 \pm 0,14 \times 10^6/\mu\text{l}$  in der 3. Woche und bleibt in diesem Bereich bis zur 4. Woche. Die Gruppe Ro 50 2,5 ( $2,5 \mu\text{g/kg KM}$ ) zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf der Parameter wie die Gruppe MIX 2,5, bereits ab der ersten Woche wird jedoch eine höhere Stimulation der Retikulozyten festgestellt. Vom Ausgangswert  $0,35 \pm 0,07 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) kommt es zu einem Anstieg der absoluten Retikulozytenzahl auf  $1,02 \pm 0,20 \times 10^6/\mu\text{l}$  (1. Woche), dieser Wert fällt in der 2. Woche auf  $0,68 \pm 0,27 \times 10^6/\mu\text{l}$  und bleibt ab der dritten Woche bei  $1,01 \pm 0,14 \times 10^6/\mu\text{l}$ .

Die Resultate der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Retikulozytenzahl der Substanzen MIX und Ro sind in Tabelle 11 dargestellt. Die dreifaktorielle Wechselwirkung zwischen Substanz, Dosis und Zeit (SDZ) sowie die zweifaktorielle Wechselwirkung zwischen Substanz und Zeit (SZ) sind statistisch nicht signifikant ( $p = 0,59$  bzw.  $p = 0,55$ ). Dies bedeutet, dass gemittelt über die Dosierung kein Unterschied zwischen den zeitlichen Verläufen der beiden Substanzen nachgewiesen werden kann. Dagegen sind die Wechselwirkungen zwischen Dosis und Zeit (DZ) und zwischen Substanz und Dosis (SD) statistisch signifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ). Das heißt, dass sich die zeitlichen Verläufe zwischen den Dosierungen signifikant unterscheiden und die Dosiseffekte substanzabhängig sind. Die Gruppe Ro 50 2,5 hat einen stärkeren Anstieg. Darüber hinaus zeigen sich global (Haupteffekte) keine Substanzunterschiede ( $p = 0,46$ ), jedoch hochsignifikante Dosis- und Zeiteffekte (jeweils  $p < 0,0001$ ).

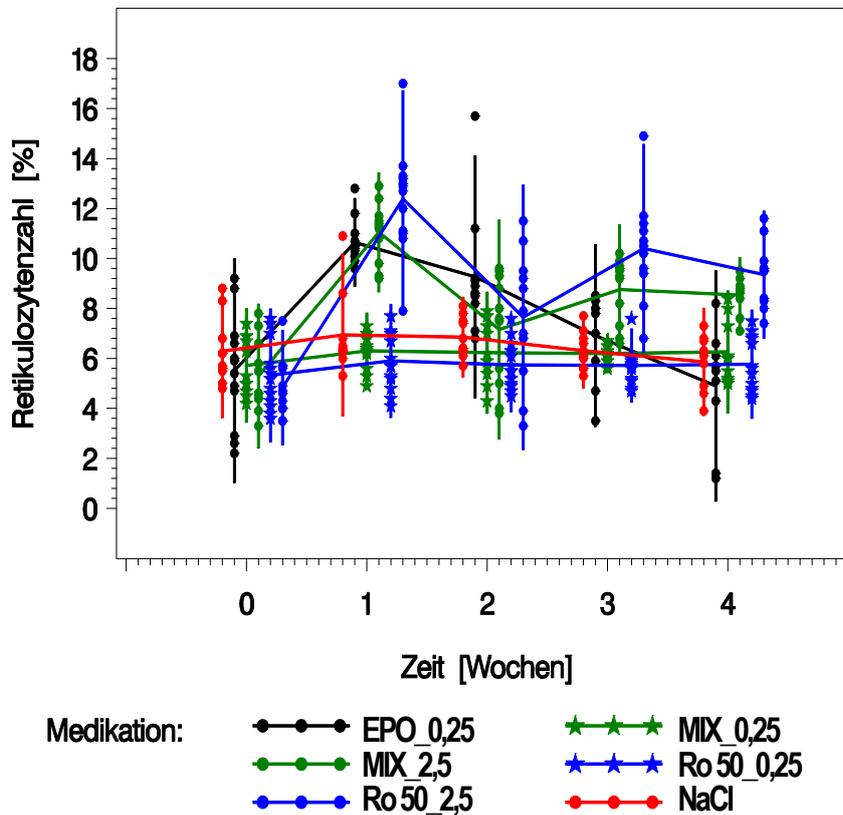
**Tabelle 11:** Resultate der dreifaktoriellen ANOVA der Retikulozytenzahl in Experiment 1 (nur Vergleich für die Substanzen MIX und Ro)

Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Dosis (D)	Zeit (Z)	SD	SZ	DZ	SDZ
Retikulozyten	0,46	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	0,0021	0,55	$p < 0,0001$	0,59

**Abb. 12:** Entwicklung der absoluten Retikulozytenzahl in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37, dargestellt ist )

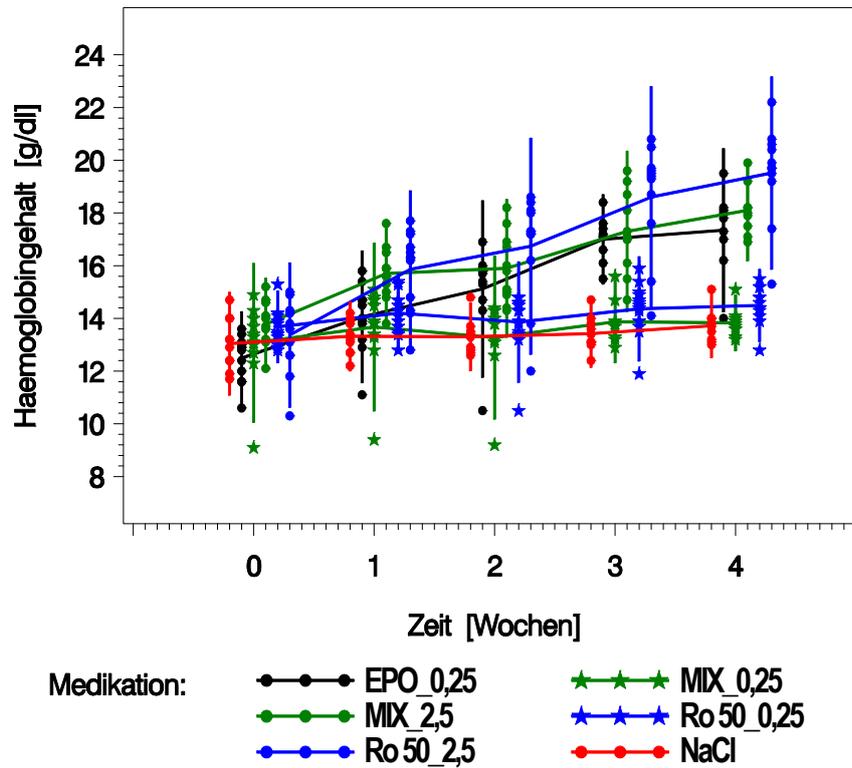
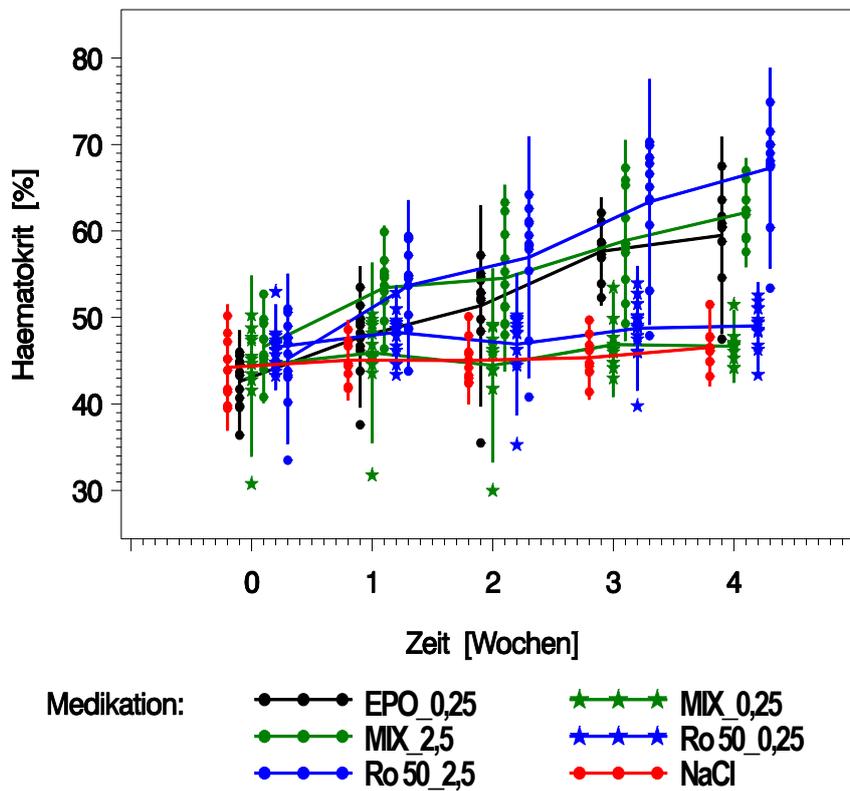


**Abb. 13:** Entwicklung der Retikulozytenzahl in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37)



**Hämoglobin / Hämatokrit / Rote Blutkörperchen:** In Abb. 14 ist die Entwicklung der Hämoglobinkonzentration dargestellt. Die Hämoglobinkonzentration der Kontrollgruppe (NaCl) und der Gruppe MIX 0,25 zeigen einen sehr geringen Anstieg von  $13 \pm 1,5$  g/dl (0. Woche) auf  $14 \pm 0,60$  g/dl (4. Woche) und auch der Hämoglobingehalt der niedrig dosierten Gruppe Ro 50 0,25 bleiben über den gesamten Versuchszeitraum mit etwa  $14 \pm 1,14$  g/dl annähernd gleich. Nur in den hoch dosierten Gruppen Ro 50 2,5 und MIX 2,5 und der Gruppe EPO ist ein deutlicher Anstieg zu beobachten. In der Gruppe EPO steigt der Hämoglobingehalt von  $13 \pm 0,88$  g/dl (0. Woche) auf  $17 \pm 1,55$  g/dl (4. Woche) und in der Gruppe MIX 2,5 von  $14 \pm 0,88$  g/dl (0. Woche) auf  $18 \pm 0,96$  g/dl (4. Woche). Die Gruppe Ro 50 2,5 zeigt den höchsten Anstieg der Hämoglobinkonzentration von  $13 \pm 1,37$  g/dl (0. Woche) auf  $20 \pm 1,83$  g/dl (4. Woche) Die Entwicklung des Hämoglobingehaltes (Abb. 14) und der Hämatokritkonzentration (Abb. 15) korreliert mit der zeitlichen Entwicklung der Anzahl der roten Blutkörperchen (Abb. 16).

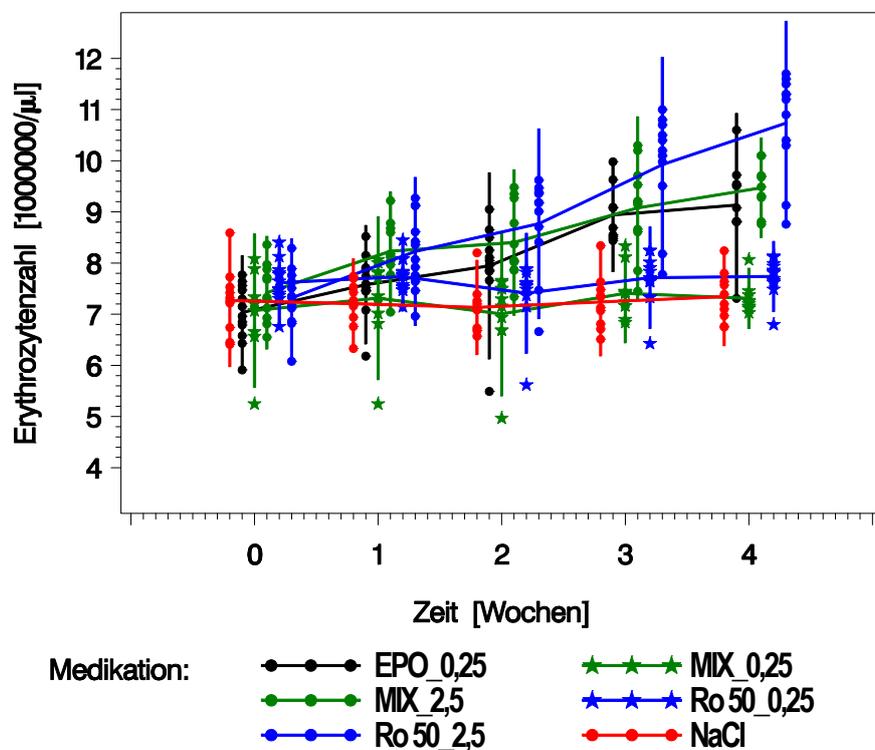
Die Resultate der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Hämatokritkonzentration der Substanzen MIX und Ro sind in Tabelle 12 dargestellt. Die dreifaktorielle Wechselwirkung zwischen Substanz, Dosis und Zeit (SDZ) ist nicht signifikant ( $p = 0,46$ ). Die zweifache Wechselwirkung zwischen Dosis und Zeit (DZ) ist signifikant ( $p < 0,0001$ ), das bedeutet das die beiden Dosierungen ( $0,25 \mu\text{g/kg KM}$  und  $2,5 \mu\text{g/kg KM}$ ) verschieden verlaufen. Die Entwicklung der Hämatokritkonzentration der Gruppen mit der hohen Dosierung ( $2,5 \mu\text{g/kg KM}$ ) zeigt einen deutlichen Anstieg im Gegensatz zu den Gruppen mit der niedrigen Dosierung ( $0,25 \mu\text{g/kg KM}$ ). Die Wechselwirkung zwischen Substanz und Zeit ( $p = 0,0081$ ) zeigt, dass die zeitlichen Verläufe im gemittelten über die beiden Dosierungen nicht parallel sind. Die Gruppe Ro 2,5 hat einen stärkeren Anstieg. Die Wechselwirkung zwischen Substanz und Dosis (SD) ist nicht signifikant ( $p = 0,99$ ), das bedeutet, dass der globale Dosis einfluß nicht nachweislich substanzabhängig ist. Darüber hinaus zeigen sich global (Haupteffekte) keine Substanzunterschiede ( $p = 0,28$ ), jedoch hochsignifikante Dosis- und Zeiteffekte (jeweils  $p < 0,0001$ ).

**Abb. 14:** Entwicklung des Hämoglobingehaltes in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37)**Abb. 15:** Entwicklung der Hämatokritkonzentration in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37)

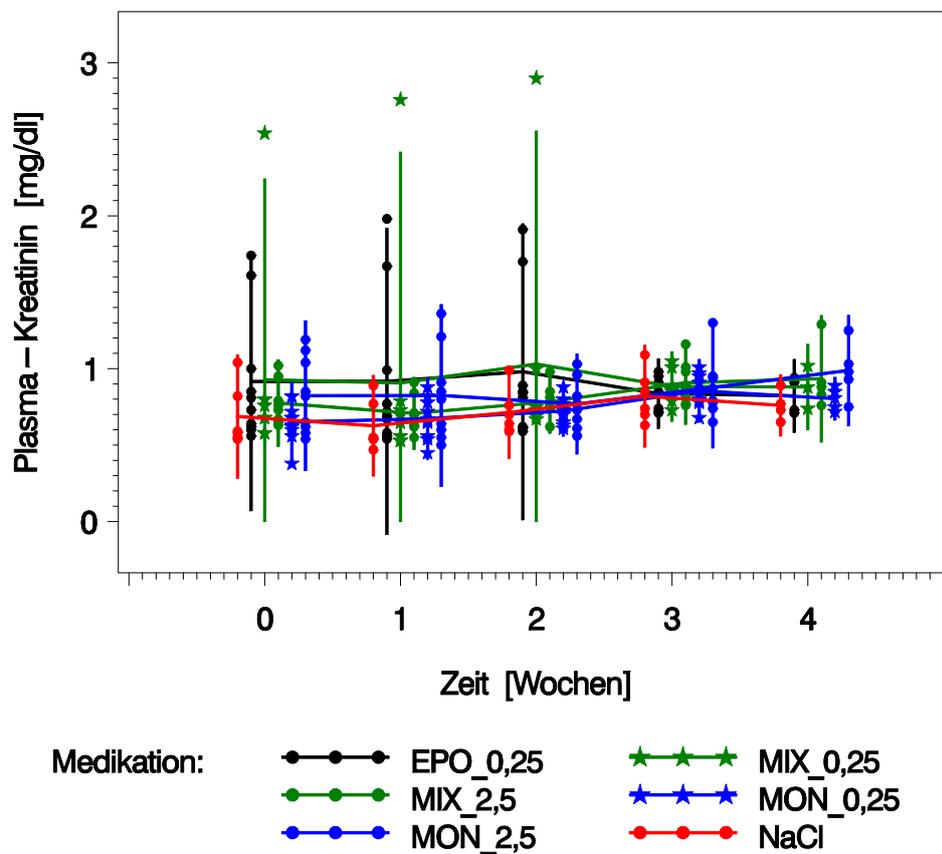
**Tabelle 12:** Resultate der dreifaktoriellen ANOVA der Hämatokritkonzentration in Experiment 1 (nur Vergleich für die Substanzen MIX und Ro)

Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Dosis (D)	Zeit (Z)	SD	SZ	DZ	SDZ
Hämatokrit	0,28	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	0,99	0,0081	$p < 0,0001$	0,46

**Abb. 16:** Entwicklung der Anzahl der roten Blutkörperchen in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37)



In Abb. 17 ist die Entwicklung der **Kreatininkonzentration** dargestellt. Die Entwicklung der Kreatininkonzentration zeigt in keiner der Gruppen einen deutlichen Anstieg und schwankt während der gesamten Versuchszeit zwischen  $0,65 \pm 0,13$  und  $1,03 \pm 0,76$  mg/dl. In Tabelle 13 sind die Resultate der dreifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen der Entwicklung der Kreatininkonzentrationen der Substanzen MIX und Ro dargestellt. Bis auf den globalen Zeiteffekt (Z) sind alle weiteren in der Varianzanalyse einbezogenen Effekte statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Das heißt, es kann nicht nachgewiesen werden, dass bezüglich des Anstiegs der Kreatininkonzentration eine Abhängigkeit von Substanz und/oder Dosis besteht.

**Abb. 17:** Entwicklung der Kreatininkonzentration in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37)**Tabelle 13:** Resultate der dreifaktoriellen ANOVA der Kreatininkonzentration in Experiment 1 (nur Vergleich für die Substanzen MIX und Ro)

Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Dosis (D)	Zeit (Z)	SD	SZ	DZ	SDZ
Hämatokrit	0,89	0,19	$p < 0,0001$	0,82	0,67	0,13	0,95

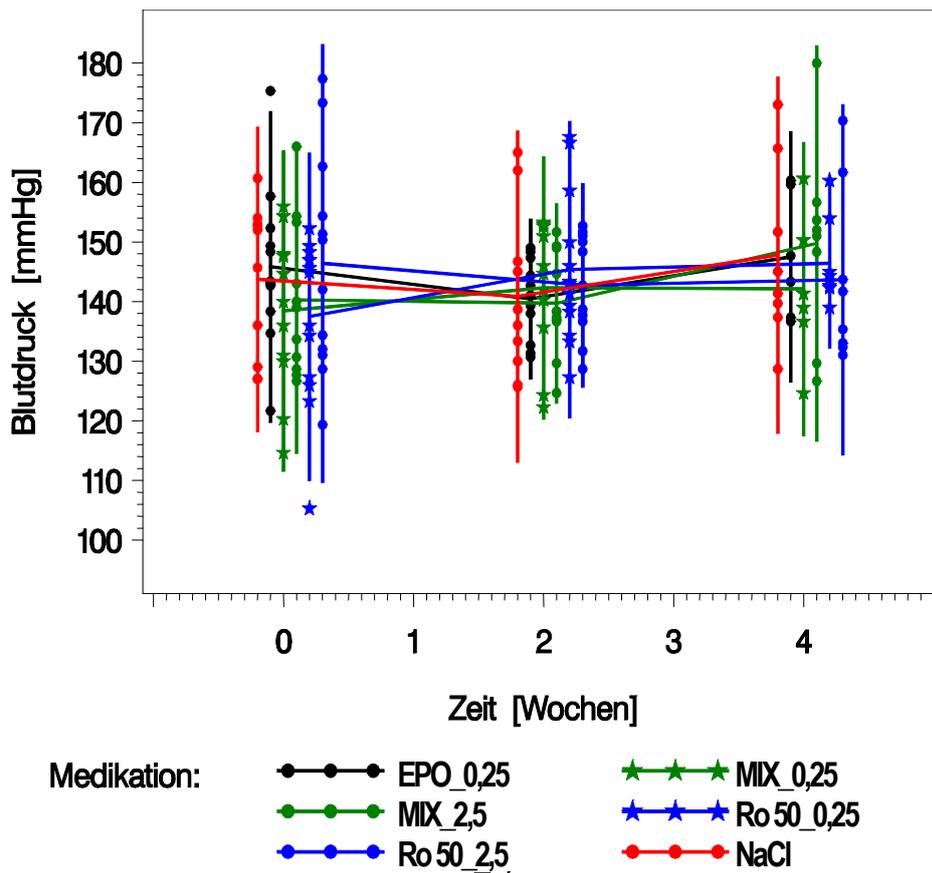
Die Abbildungen der Entwicklung aller nachfolgenden Blutparameter sind im Anhang aufgeführt, da die Parameter im Experiment 1 keine Veränderungen zeigen: Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, Leberenzymaktivitäten (Glutamat-oxalacetat-transaminase [GOT], Glutamat-pyruvat-transaminase [GPT], Alkalische Phosphatase [ALP]), Lipide (Cholesterin, Triglyzeride), Nierenfunktionsparameter (Harnstoff und Phosphat), Protein und Glukose.

#### 4.1.2 Blutdruck

In Abb. 18 ist der Verlauf des **systolischen Blutdrucks** aufgetragen. Der durchschnittliche systolische Blutdruck zeigt in keiner der Gruppen einen deutlichen Anstieg und schwankt während der gesamten Versuchszeit  $137 \pm 14$  mm Hg und  $149 \pm 17$  mm Hg.

Die Resultate der ANOVA mit Messwiederholungen der Entwicklung des systolischen Blutdrucks der Substanzen MIX und Ro (Tabelle 14) zeigen, dass alle einbezogenen Effekte statistisch nicht signifikant sind ( $p > 0,05$ ). Das heißt, es kann nicht nachgewiesen werden, dass bezüglich der Entwicklung des systolischen Blutdrucks eine Abhängigkeit von Substanz, Dosis und/oder Zeit besteht.

**Abb. 18:** Entwicklung des systolischen Blutdrucks in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37)



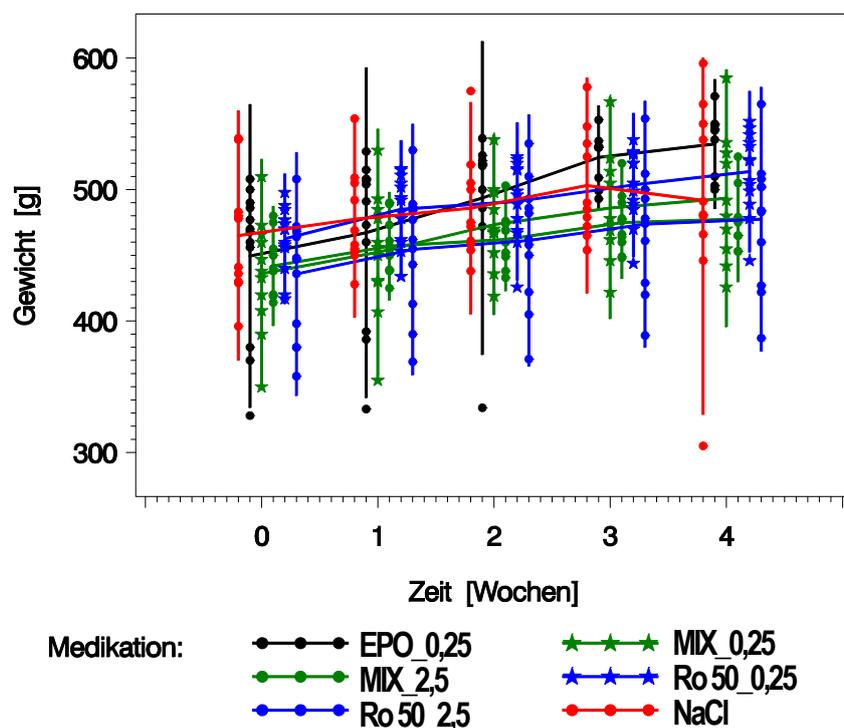
**Tabelle 14:** Resultate der dreifaktoriellen ANOVA des Verlaufs des systolischen Blutdrucks in Experiment 1 (nur Vergleich für die Substanzen MIX und Ro)

Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Dosis (D)	Zeit (Z)	SD	SZ	DZ	SDZ
Retikulozyten	0,40	0,58	0,26	0,82	0,87	0,38	0,60

#### 4.1.3 Körpermasse

Die Entwicklung der Körpermasse ist in Abb. 19 erfaßt. Alle Dosierungsgruppen zeigen einen ständigen Anstieg der Körpermasse über den gesamten Versuchszeitraum. Die Gruppe EPO läßt ab der zweiten Woche den deutlichsten Anstieg bis zur 4. Woche (im Durchschnitt  $535 \pm 67$  g) erkennen (Gesamtzunahme von 86 g). Die Tiere der Kontrollgruppe und der Gruppe Ro 50 0,25 wiegen in der vierten Woche im Mittel ca.  $511 \pm 40$  g (Gesamtzunahme von 47 g). Dagegen zeigt die Entwicklung der Körpermassenzunahmen der Gruppen MIX 0,25, MIX 2,5 und Ro 50 2,5 eine flachere Steigung, d.h. die Gesamtzunahme von der ersten bis zur vierten Woche beträgt etwa 43 g.

**Abb. 19:** Entwicklung der Körpermasse in Experiment 1 (Dosierung s. S. 37)

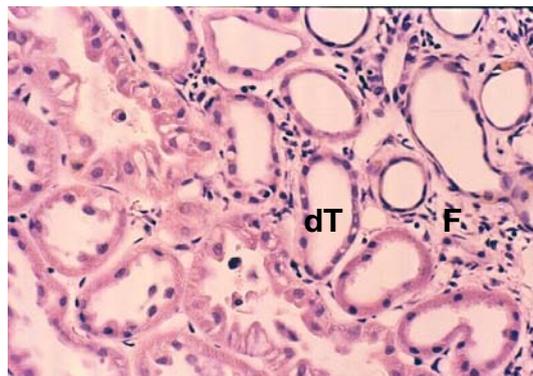


#### 4.1.4 Histologie

##### **Patho-histologische Nierenveränderungen**

In der Niere finden sich in meist geringen Schweregraden interstitielle entzündliche Zellinfiltrate, eine interstitielle Fibrose, Tubulusdilatationen, Zystenbildungen, tubulär gelagertes Protein, basophile Tubuli, Kapselfibrose und eine Glomerulopathie (Abb. 20). In einigen Fällen wird auch eine Pyelitis beobachtet. Bis auf die Veränderung der Kapselfibrose, ist keine der beobachteten patho-histologischen Veränderungen statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der Kapselfibrose, abgestuft in die Grade 0 – 4, sind mit  $p = 0,0027$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (MIX und Ro; Tab. 15). Besonders auffällig ist die Gruppe MIX 2,5 mit hoher Anzahl von Grad 3 und 4.

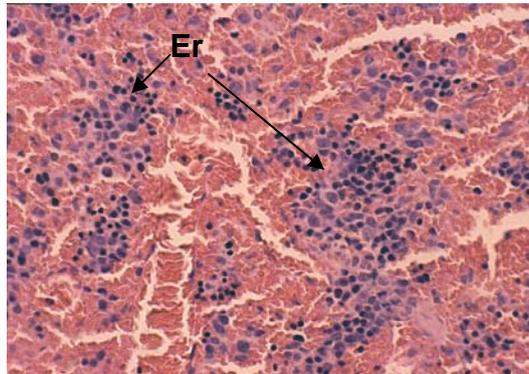
**Abb. 20:** Niere mit dilatiertem Tubulus (**dT**) und interstitielle Fibrose (**F**) in Experiment 1, (Färbung HE, Vergrößerung 160×)



##### **Patho-histologische Milzveränderungen**

In der Milz wird besonders nach Veränderungen im Sinne einer folliculären Milzhyperplasie und einer extramedullären Erythropoiese gesucht (Abb. 21). Eine gering- bis mittelgradige folliculäre Milzhyperplasie (Grad 2 und 3) wird sowohl bei den Tieren der Kontroll-, wie auch bei den Tieren der Substanzgruppe festgestellt (Tab. 15). Daher kann es sich nicht um eine substanzspezifische Wirkung handeln ( $p = 0,07$ ). Nur in den hochdosierten Gruppen Ro 50 2,5 (3 von 11 Tieren), MIX 0,25 (2 von 11 Tieren) und MIX 2,5 (5 von 11 Tieren) kann vereinzelt eine minimale bis geringgradige (Grad 1 und 2) extramedulläre Erythropoiese beobachtet werden ( $p = 0,07$ ).

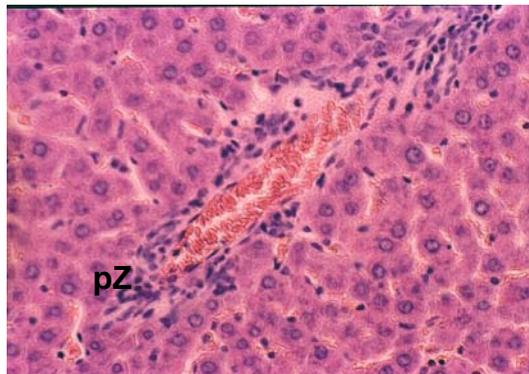
**Abb. 21:** Milz, extramedulläre Erythropoese in Experiment 1 (**Er**; Grad 1; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



### Patho-histologische Leberveränderungen

Alle Gruppen zeigen meist minimale bis geringgradige (Grad 1 und 2) interstitielle wie auch perivaskuläre entzündliche Zellinfiltrate in der Leber (Abb. 22; Tab. 15). Bei den Entzündungszellen handelt es sich um Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen. Ein medikamentös verursachter Effekt kann nicht beobachtet werden ( $p = 0,17$  bzw.  $p = 0,14$ ).

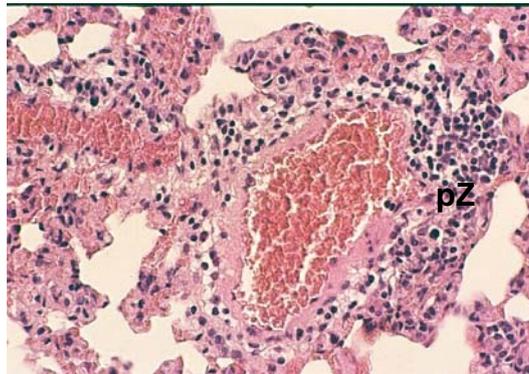
**Abb. 22:** Perivaskuläres Zellinfiltrat (**pZ**) in der Leber in Experiment 1 (Grad 1; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



### Patho-histologische Lungenveränderungen

Die Kontroll- und Substanzgruppen zeigen meist minimale bis geringgradige (Grad 1 und 2) interstitielle wie auch perivaskuläre entzündliche Zellinfiltrate (Abb. 23; Tab. 15). Bei den Entzündungszellen handelt es sich um Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen. Ein medikamentös verursachter Effekt kann nicht beobachtet werden ( $p = 0,91$  und  $p = 0,35$ ).

**Abb. 23:** Perivaskuläres Zellinfiltrat (**pZ**) in der Lunge in Experiment 1 (Grad 2; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



**Tabelle 15:** In der Inzidenztabelle sind die patho-histologischen Auswertungen der einzelnen Dosierungsgruppen und die Resultate des Kruskal-Wallis Tests (KW-Test; nur Vergleich für die Substanzen MIX und Ro) von Niere, Milz, Leber und Lunge des Experimentes 1 dargestellt. Die Gruppen sind wie folgt eingeteilt:

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	MIX	MIX	EPO
		0,25	2,5	0,25	2,5	0,25
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	10	13	11	10	11	11
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	<u>8</u>	<u>13</u>	<u>11</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	2	-	-	-	-	-
- Grad 1	1	4	3	1	1	4
- Grad 2	7	9	6	8	8	4
- Grad 3	-	-	2	1	2	1
- Grad 4	-	-	-	-	-	2
KW-Test	p = 0,34					
<u>interstitielle Fibrose</u>	<u>10</u>	<u>12</u>	<u>11</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	-	1	-	-	-	-
- Grad 1	3	7	3	6	3	5
- Grad 2	7	5	5	3	7	3
- Grad 3	-	-	3	1	1	1
- Grad 4	-	-	-	-	-	2
KW-Test	p = 0,10					

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	MIX	MIX	EPO
		0,25	2,5	0,25	2,5	0,25
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	10	13	11	10	11	11
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>Tubulusdilataion</u>	<u>10</u>	<u>13</u>	<u>11</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-	-
- Grad 1	4	7	3	6	3	2
- Grad 2	4	6	5	2	7	6
- Grad 3	2	-	3	2	1	2
- Grad 4	-	-	-	-	-	1
KW-Test	p = 0,27					
<u>Zystenbildung</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>4</u>
- keine (Grad 0)	7	9	6	6	10	7
- Grad 1	3	4	3	3	1	3
- Grad 2	-	-	2	1	-	1
KW-Test	p = 0,23					
<u>tubuläres Protein</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>10</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
- keine (Grad 0)	4	6	1	6	3	2
- Grad 1	5	6	6	2	7	7
- Grad 2	1	1	4	2	-	-
- Grad 3	-	-	-	-	1	1
- Grad 4	-	-	-	-	-	1
KW-Test	p = 0,09					
<u>basophile Tubuli</u>	<u>10</u>	<u>13</u>	<u>11</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-	-
- Grad 1	4	8	2	5	3	5
- Grad 2	6	5	7	3	7	3
- Grad 3	-	-	2	2	1	1
- Grad 4	-	-	-	-	-	2
KW-Test	p = 0,12					

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	MIX	MIX	EPO
		0,25	2,5	0,25	2,5	0,25
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	10	13	11	10	11	11
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>Glomerulopathie</u>	<u>9</u>	<u>11</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>10</u>	<u>9</u>
- keine (Grad 0)	1	2	2	-	1	2
- Grad 1	6	10	3	9	6	5
- Grad 2	2	1	5	1	3	3
- Grad 3	1	-	1	-	1	-
- Grad 4	-	-	-	-	-	1
KW-Test	p = 0,28					
<u>Pyelitis</u>	<u>1</u>	<u>-</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>3</u>
- keine (Grad 0)	9	13	9	9	8	8
- Grad 1	1	-	1	1	2	1
- Grad 2	-	-	-	-	1	2
- Grad 3	-	-	1	-	-	-
KW-Test	p = 0,25					
<u>Kapsel fibrose</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>10</u>	<u>9</u>	<u>11</u>	<u>10</u>
- keine (Grad 0)	-	2	1	1	-	1
- Grad 1	-	-	1	-	1	-
- Grad 2	5	1	7	4	-	5
- Grad 3	5	9	2	5	5	5
- Grad 4	-	1	-	-	5	-
KW-Test	p = 0,0027					
<b>Anzahl untersuchter Milzen:</b>	10	13	11	11	11	9
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>follikuläre Milzhyperplasie</u>	<u>10</u>	<u>13</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>9</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-	-
- Grad 1	5	-	1	-	-	1
- Grad 2	4	11	2	5	5	7
- Grad 3	1	2	8	6	6	1
KW-Test	p = 0,07					

<b>Anzahl untersuchter Milzen:</b>	10	13	11	11	11	9
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>extramedulläre Erythropoiese</u>	-	-	3	2	5	-
- keine (Grad 0)	10	13	8	9	6	9
- Grad 1	-	-	1	1	3	-
- Grad 2	-	-	2	1	2	-
KW-Test	p = 0,07					
<b>Anzahl untersuchter Leber:</b>	10	13	10	11	10	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	10	12	9	10	9	10
- keine (Grad 0)	-	1	1	1	1	2
- Grad 1	6	3	7	4	3	7
- Grad 2	3	8	2	6	6	3
- Grad 3	1	1	-	-	-	-
KW-Test	p = 0,17					
<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	MIX	MIX	EPO
		0,25	2,5	0,25	2,5	0,25
<b>Anzahl untersuchter Leber:</b>	10	13	10	11	10	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>perivaskuläre Zellinfiltrate</u>	3	10	8	6	10	7
- keine (Grad 0)	7	3	2	5	-	5
- Grad 1	3	6	5	5	6	1
- Grad 2	-	3	3	1	4	4
- Grad 3	-	1	-	-	-	2
KW-Test	p = 0,14					
<b>Anzahl untersuchter Lungen:</b>	10	13	11	11	11	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	10	13	11	11	11	12
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-	-
- Grad 1	2	1	3	1	2	4
- Grad 2	8	12	7	10	8	8
- Grad 3	-	-	1	-	1	-
KW-Test	p = 0,91					

---

<b>Anzahl untersuchter Lungen:</b>	10	13	11	11	11	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>					
<u>perivaskuläre Zellinfiltrate</u>	<u>6</u>	<u>13</u>	<u>11</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>8</u>
- keine (Grad 0)	4	-	-	2	1	4
- Grad 1	2	4	1	3	3	-
- Grad 2	4	9	9	5	6	7
- Grad 3	-	-	1	1	1	1
KW-Test	p = 0,35					

## 4.2 Experiment 2

Zur Prüfung der Applikationsfrequenz wurde das biotechnisch hergestellte Erythropoietin und die Erythropoietinmodifikation Ro 50 mit dem, im ersten Experiment beobachteten, stärkeren Effekt angewendet. Ein allgemeines Screening der aufgetretenen Nebenwirkungen wurde dokumentiert. Die Versuchstiere wurden ohne wissentliche Auswahl in die folgenden fünf Gruppen unterteilt:

Dosierungsgruppen:

Ro 50 0,25	(0,25 µg/kg KM);	3-mal wöchentlich
Ro 50 0,75	(0,75 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
EPO 0,25	(0,25 µg/kg KM);	3-mal wöchentlich
EPO 0,75	(0,75 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
NaCl	(0,9%ig) ;	1-mal wöchentlich

Aufgrund der hämatopoetischen Wirkung von EPO wurde dessen Dosierung beibehalten (0,25 µg/kg KM; 3-mal wöchentlich). Die Wochendosis von 0,75 µg/kg KM wurde bei einer Gruppe 1-mal wöchentlich gegeben und bei einer zweiten Gruppe auf drei Applikationen innerhalb einer Woche aufgeteilt (0,25 µg/kg KM/Injektion). Die EPO-Modifikation Ro 50 wurde in derselben Dosierung und Frequenz wie EPO verabreicht.

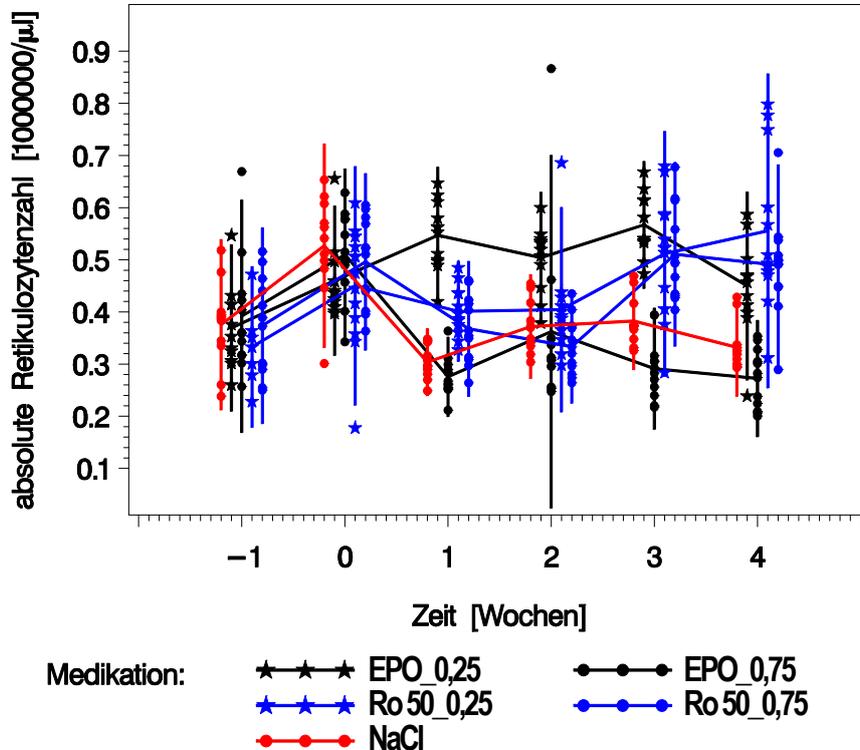
### 4.2.1 Blutparameter

**Absolute und prozentuale Retikulozytenzahl:** Die Veränderungen der absoluten und prozentualen Retikulozytenzahl in den verschiedenen Gruppen sind in Abb. 24 und 25 dargestellt. Beide Parameter weisen ähnliche Verläufe auf. Alle Dosierungsgruppen zeigen einen anfänglichen Anstieg der absoluten Retikulozytenzahl von einem mittleren Ausgangswert von  $0,37 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$  in der -1. Woche auf  $0,49 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$  in der 0. Woche. Danach kann nach Therapiebeginn bis zum Versuchsende sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe EPO 0,75 ein Abfall der mittleren absoluten Retikulozytenzahlen von  $0,52 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf  $0,30 \pm 0,05 \times 10^6/\mu\text{l}$  (4. Woche) beobachtet werden. Die absolute Retikulozytenzahl der Gruppe Ro 50 0,75 dagegen sinkt nur anfänglich von  $0,50 \pm 0,08 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf  $0,33 \pm 0,05 \times 10^6/\mu\text{l}$  (2. Woche), steigt dann jedoch wieder an und pendelt sich ab der 3. Woche auf einen Wert von  $0,51 \pm 0,08 \times 10^6/\mu\text{l}$  ein. In der Gruppe Ro 50 0,25 sinken die Zahlen von  $0,45 \pm 0,11 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf  $0,40 \pm 0,10 \times 10^6/\mu\text{l}$  (2. Woche), steigen dann jedoch wieder auf  $0,51 \pm 0,12 \times 10^6/\mu\text{l}$  in der 3. Woche und auf  $0,55 \pm 0,15 \times 10^6/\mu\text{l}$  in der 4. Woche. Die Gruppe EPO 0,25 zeigt im

Versuchsverlauf einen stetigen leichten Anstieg der Retikulozyten, deren absoluten Retikulozytenzahl schon ab der 1. Woche über  $0,54 \pm 0,07 \times 10^6/\mu\text{l}$  liegen und auf diesem Niveau bis zur 3. Woche bleiben (maximaler Wert bei  $0,57 \pm 0,06 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Dann fallen die Werte bis zur 4. Woche wieder etwas ab ( $0,45 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$ ).

Die Resultate der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Retikulozytenzahl der Substanzen EPO und Ro sind in Tabelle 16 dargestellt. Die dreifaktorielle Wechselwirkung zwischen Substanz, Applikation und Zeit (SAZ,  $p < 0,0001$ ) sowie die zweifaktorielle Wechselwirkungen zwischen Substanz und Zeit (SZ,  $p < 0,0001$ ), Applikation und Zeit (AZ,  $p < 0,0001$ ) und Substanz und Applikation (SA,  $p = 0,0043$ ) sind statistisch signifikant. Dies bedeutet, dass gemittelt über die Applikation ein Unterschied zwischen den zeitlichen Verläufen der beiden Substanzen nachgewiesen werden kann. Außerdem unterscheiden sich die zeitlichen Verläufe zwischen den Applikationen signifikant. Darüber hinaus zeigen sich global (Haupteffekte) keine Substanzunterschiede ( $p = 0,16$ ), jedoch hochsignifikante Applikations- und Zeiteffekte ( $p < 0,0001$ ).

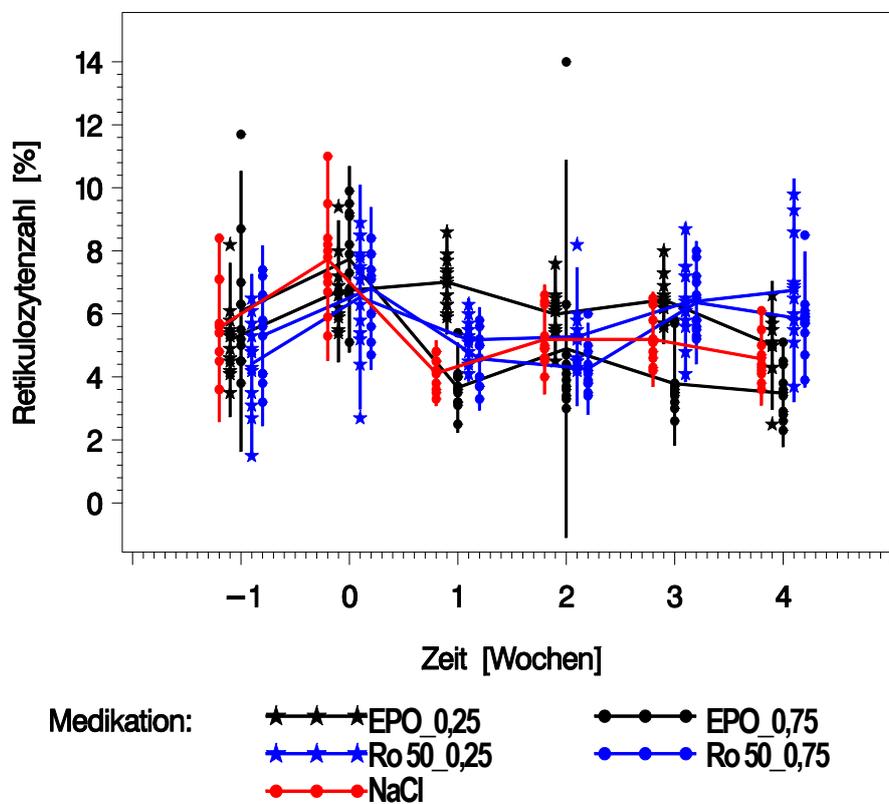
**Abb. 24:** Entwicklung der absoluten Retikulozytenzahl in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)



**Tabelle 16:** Resultate der dreifaktoriellen ANOVA der Retikulozytenzahl in Experiment 2 (nur Vergleich für die Substanzen EPO und Ro)

Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Applikation (A)	Zeit (Z)	SA	SZ	AZ	SAZ
Retikulozyten	0,16	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	0,043	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

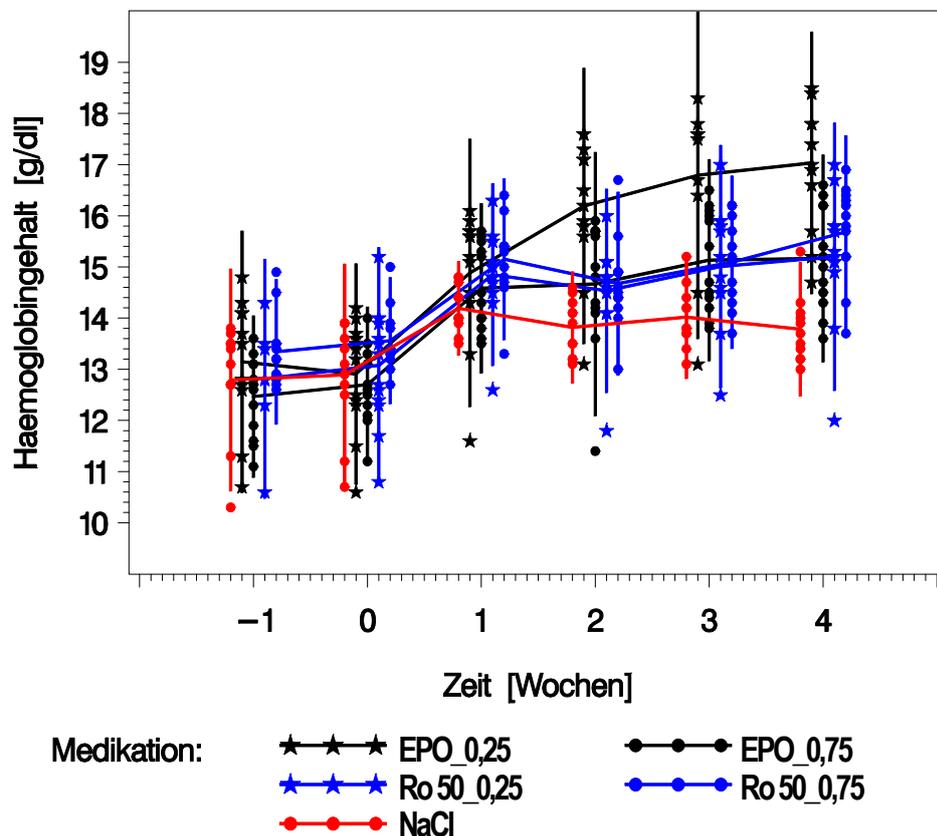
**Abb. 25:** Entwicklung der Retikulozytenzahl in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)



**Hämoglobin / Hämatokrit / Rote Blutkörperchen:** In Abb. 26 ist die Entwicklung der Hämoglobinkonzentration in den verschiedenen Gruppen dargestellt. Der Hämoglobingehalt der Kontrollgruppe bleibt, nach einem Anstieg von  $13 \pm 1,08$  g/dl (0. Woche) auf  $14 \pm 0,65$  g/dl (1. Woche), bis zum Experimentende konstant. Nach einem Anstieg der Hämoglobinkonzentration von  $13 \pm 1,15$  g/dl (0. Woche) auf  $15 \pm 1,30$  g/dl (1. Woche), bleibt dieser Hämoglobingehalt in den Ro 50-Gruppen und in der Gruppe EPO 0,75 bis zum Versuchsende bestehen. Nur die Hämoglobinkonzentration der Gruppe EPO 0,25 steigt von

$13 \pm 1,07$  g/dl (0. Woche) auf  $15 \pm 1,30$  g/dl (1. Woche) und weist bis zum Versuchsende weiter langsam ansteigende Werte ( $17 \pm 1,28$  g/dl in der 4. Woche) und damit deutlich höhere Werte als die restlichen Gruppen auf.

**Abb. 26:** Entwicklung der Hämoglobinkonzentration in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)



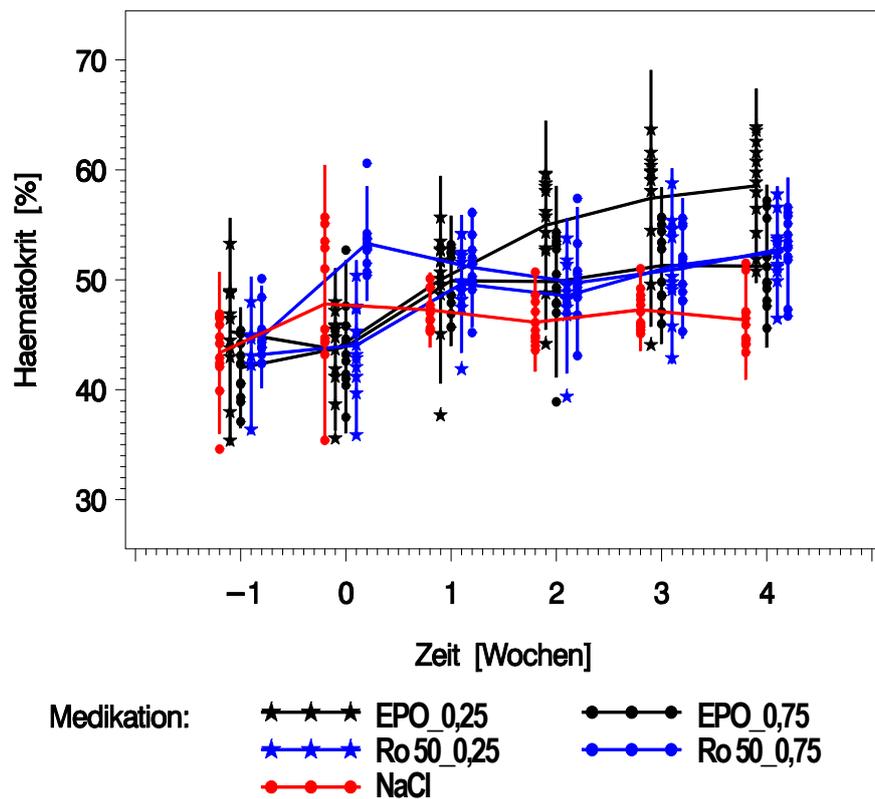
Die Verlaufskurven des Hämatokritwertes und der Anzahl der roten Blutkörperchen und (Abb. 27 und 28) korrelieren eng mit der Entwicklung der Hämoglobinkonzentration (Abb. 26). Die Resultate der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Entwicklung des Hämatokritwertes der Substanzen EPO und Ro sind in Tabelle 17 dargestellt. Die dreifaktorielle Wechselwirkung zwischen Substanz, Applikation und Zeit (SAZ,  $p < 0,0017$ ) sowie die zweifaktorielle Wechselwirkungen zwischen Substanz und Zeit (SZ,  $p < 0,0001$ ) und Applikation und Zeit (AZ,  $p < 0,0001$ ) sind statistisch signifikant. Dies bedeutet, dass gemittelt über die Applikation ein Unterschied zwischen den zeitlichen Verläufen der beiden Substanzen nachgewiesen werden kann. Die Gruppe EPO 0,25 hat einen stärkeren Anstieg der Hämatokritkonzentration. Die Wechselwirkung zwischen Substanz und Applikation (SA) ist ebenfalls signifikant ( $p = 0,0072$ ). Das heißt, dass der Applikationseffekt

substanzabhängig ist. Darüber hinaus zeigen sich global (Haupteffekte) keine Substanz- und Applikationsunterschiede ( $p = 0,63$  bzw.  $p = 0,69$ ), jedoch hochsignifikante Zeiteffekte ( $p < 0,0001$ ).

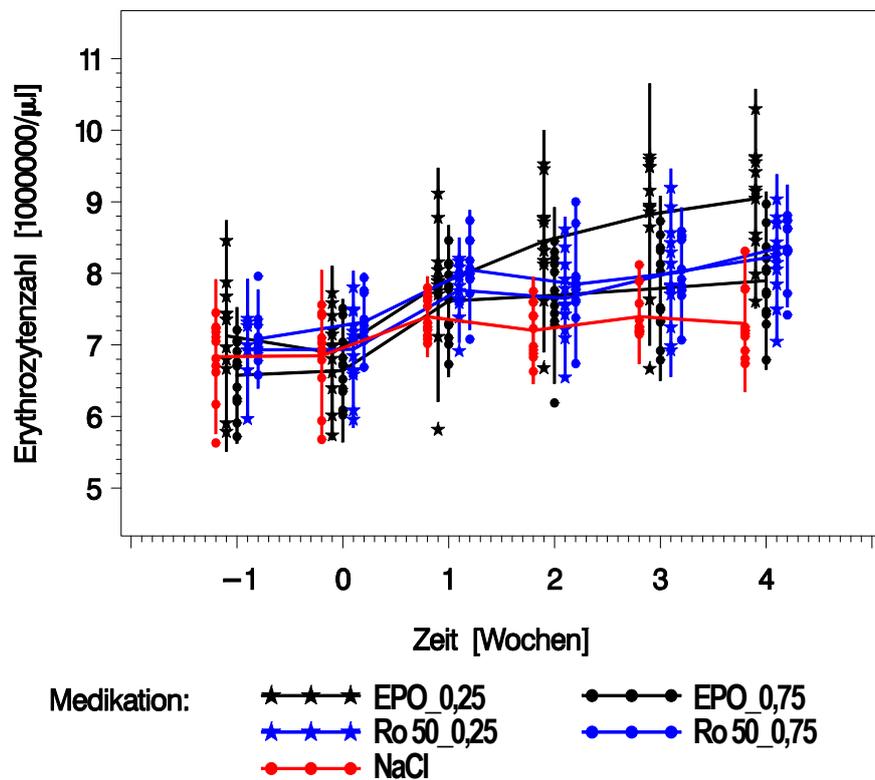
**Tabelle 17:** Resultate der dreifaktoriellen ANOVA der Entwicklung des Hämatokritwertes in Experiment 2 (nur Vergleich für die Substanzen EPO und Ro)

Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Applikation (A)	Zeit (Z)	SA	SZ	AZ	SAZ
Hämatokrit	0,63	0,69	$p < 0,0001$	0,0072	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

**Abb. 27:** Entwicklung des Hämatokrits in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)



**Abb. 28:** Entwicklung der Anzahl der roten Blutkörperchen in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)



In Abb. 29 wird die Entwicklung der **Kreatininkonzentration** dargestellt. Die Kreatininkonzentrationen der gesamten Versuchsgruppen zeigen während der gesamten Versuchszeit des Experimentes 2 etwa gleichbleibende Werte, die zwischen  $0,79 \pm 0,1$  und  $0,96 \pm 0,31$  mg/dl schwanken. Es ist kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe festzustellen. Die Resultate der dreifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Entwicklung der Kreatininkonzentration der Substanzen EPO und Ro sind in Tabelle 18 dargestellt. Die dreifaktorielle Wechselwirkung zwischen Substanz, Applikation und Zeit (SAZ), sowie die zweifaktorielle Wechselwirkungen Applikation und Zeit (AZ) sowie der globale Zeiteffekt (Z) sind statistisch signifikant ( $p = 0,0025$ ,  $p < 0,0001$  und  $p = 0,0004$ ). Alle weiteren geprüften Effekte der dreifaktoriellen Varianzanalyse sind statistisch nicht signifikant. Das bedeutet, dass die zeitlichen Verläufe für die beiden Substanzen im Hinblick auf die Applikation nicht parallel sind.

Abb. 29: Entwicklung der Kreatininkonzentration in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)

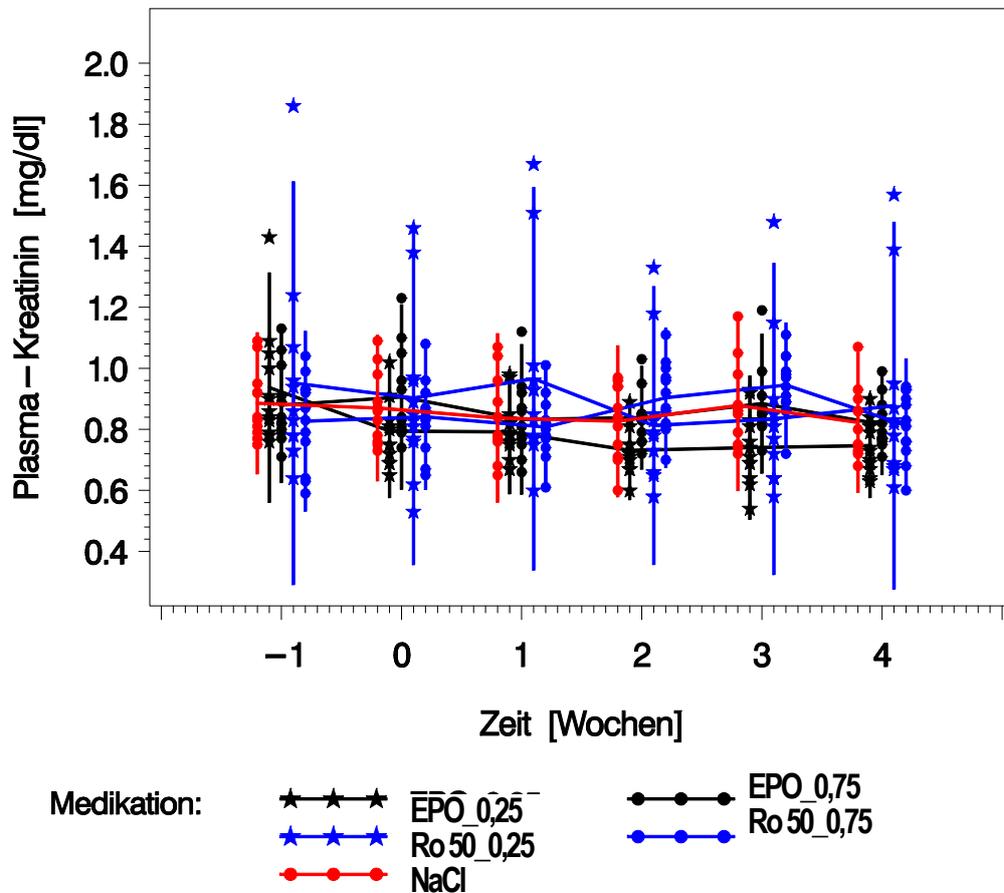


Tabelle 18: Resultate der dreifaktoriellen ANOVA der Verlaufskurven der Kreatininkonzentration in Experiment 2 (nur Vergleich für die Substanzen EPO und Ro)

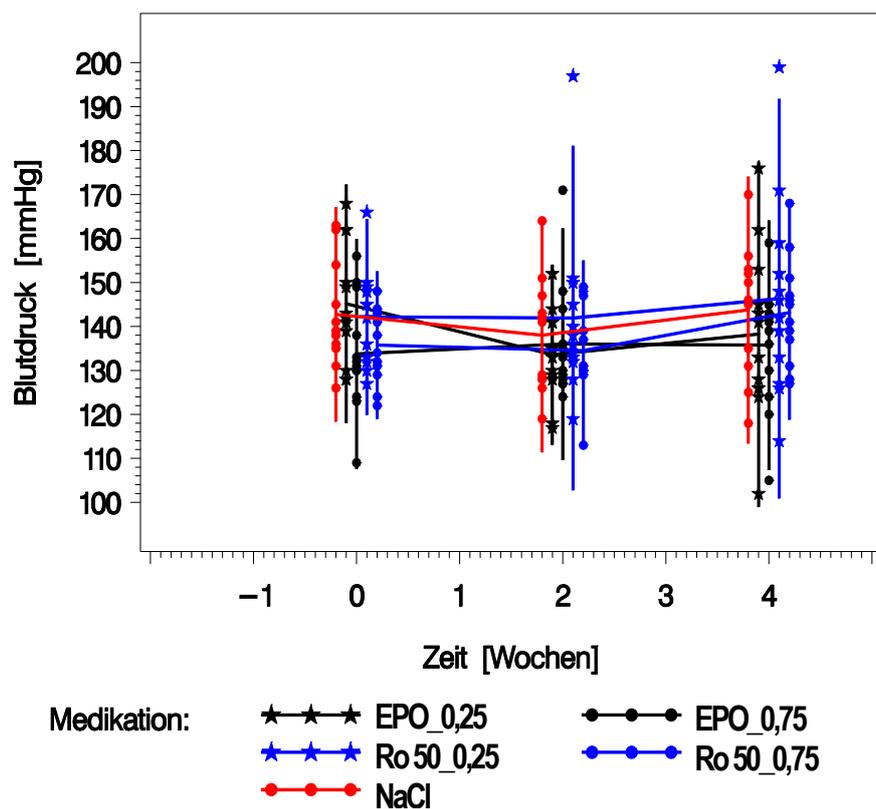
Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Applikation (A)	Zeit (Z)	SA	SZ	AZ	SAZ
Kreatinin	0,23	0,19	0,0004	0,28	0,12	p < 0,0001	0,0025

Im Anhang sind die Abbildungen der Verläufe aller unten genannten Blutparameter abgebildet. Diese Parameter zeigen keine erheblichen Veränderungen: Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, Lipide (Cholesterin, Triglyzeride) und Leberenzymaktivitäten (Glutamat-oxalazetat-transaminase (GOT), Glutamat-pyruvat-transaminase (GPT), Alkalische Phosphatase (ALP), Nierenfunktionsparameter (Harnstoff und Phosphat), Protein und Glukose.

#### 4.2.2 Blutdruck

In Abb. 30 wird die **Entwicklung des systolischen Blutdrucks** dargestellt. Die Blutdruckwerte der verschiedenen Gruppen des Experimentes 2 zeigen während der gesamten Versuchszeit etwa gleichbleibende Werte, die zwischen  $134 \pm 10$  und  $146 \pm 23$  mm Hg schwanken. Es ist kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe festzustellen. Die Resultate der ANOVA mit Messwiederholungen der Entwicklung des systolischen Blutdrucks der Substanzen EPO und Ro (Tabelle 19) zeigen, dass alle einbezogenen Effekte statistisch nicht signifikant sind ( $p > 0,05$ ). Das heißt, es kann nicht nachgewiesen werden, dass bezüglich der Entwicklung des systolischen Blutdrucks eine Abhängigkeit von Substanz, Applikation und/oder Zeit besteht.

**Abb. 30:** Entwicklung des systolischen Blutdrucks in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)



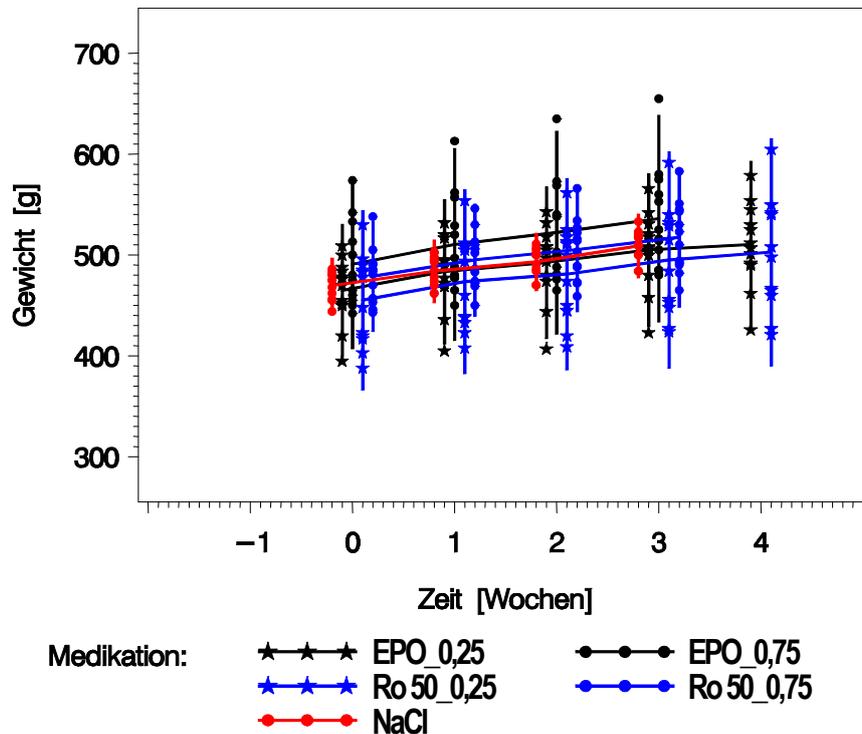
**Tabelle 19:** Resultate der dreifaktoriellen ANOVA der Entwicklung des systolischen Blutdrucks in Experiment 2 (nur Vergleich für die Substanzen EPO und Ro)

Parameter	Haupteffekte			Wechselwirkung			
	Substanz (S)	Applikation (A)	Zeit (Z)	SA	SZ	AZ	SAZ
Blutdruck	0,41	0,12	0,32	0,95	0,14	0,37	0,49

#### 4.2.3 Körpermasse

**Die Entwicklung der Körpermasse** ist in Abb. 31 dargestellt. Alle Dosierungsgruppen zeigen bis zum Versuchsende einen ständigen leichten Anstieg der Körpermasse, dabei ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe feststellbar. Die durchschnittliche Gewichtszunahme der Tiere lag, ausgehend von der Körpermasse in der 0. Woche (zwischen  $455 \pm 44$  g und  $491 \pm 42$  g), nach drei Wochen ( $495 \pm 54$  g und  $536 \pm 51$  g) zwischen 38 und 45 g.

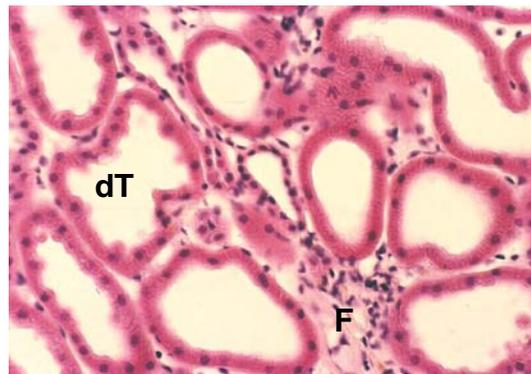
**Abb. 31:** Entwicklung der Körpermasse in Experiment 2 (Dosierung s. S. 53)



#### 4.2.4 Histologie

**Patho-histologische Nierenveränderungen:** Alle Gruppen zeigen überwiegend minimale bis geringgradige (Grad 1 und 2) interstitielle Zellinfiltrate, eine interstitielle Fibrose, Tubulusdilatationen, basophile Tubuli, tubulär gelagertes Protein und Glomerulopathien. Diese Nierenveränderungen (Abb. 32) sind, da sie zu ähnlichen Prozentsätzen in allen Gruppen diagnostiziert werden, nicht auf die Gabe der Substanz zurückzuführen (Tab. 20). Zwei Tiere der Kontrollgruppe und der Gruppe Ro 50 0,75 und drei Tiere der Gruppe Ro 50 0,25 bilden bis zu drei tubuläre Zysten. Eine Pyelitis wird jeweils bei einem Tier der Gruppen Ro 50 0,75 und EPO 0,25 beobachtet. Eine Kapsel­fibrose zeigt in der Gruppe Ro 50 0,75 eins von 12 Tieren (Grad 1), in der Gruppe EPO 0,75 sind es 3 von 12 Tieren (Grad 2), in der Kontrollgruppe 5 von 11 Tieren, in der Gruppe Ro 50 0,25 10 von 11 Tieren und in der Gruppe EPO 0,25 11 von 12 Tieren. Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der Kapsel­fibrose, abgestuft in die Grade 0 – 4, sind mit  $p < 0,0001$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (EPO und Ro mit zwei Applikationsschemata; Tab. 20). Besonders auffällig ist, dass die Gruppen Ro 50 0,25 und EPO 0,25 eine hohe Anzahl von Veränderungen mit Grad 2 und höher aufweisen.

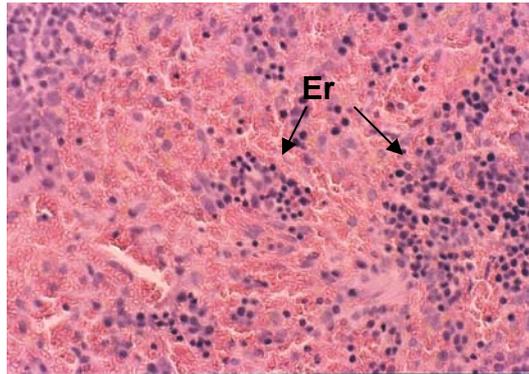
**Abb. 32:** Niere mit dilatierten Tubuli (**dT**) und interstitieller Fibrose (**F**) in Experiment 2; (Grad 2; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



**Patho-histologische Milzveränderungen:** Eine follikuläre Milzhyperplasie tritt gering- bis mittelgradig (Grad 1 und 2) bei allen Tieren auf und ist statistisch nicht signifikant (Tab. 20,  $p = 0,11$ ). Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der extramedullären Erythropoiese sind mit  $p = 0,0002$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (Tab. 20). Die extramedulläre Erythropoiese (Abb.

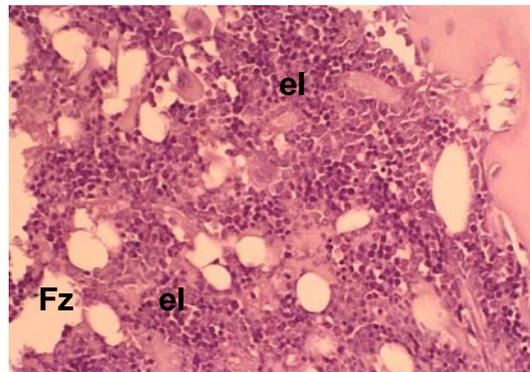
30) wird bei sieben von 12 Tieren der Gruppe Ro 50 0,75 (Grad 1 und 2) und bei einem Tier der Gruppe EPO 0,75 (Grad 1) beobachtet, nicht jedoch bei den Kontrolltieren und den Gruppen Ro 50 0,25 und EPO 0,25.

**Abb. 33:** Milz, extramedulläre Erythropoiese in Experiment 2 (**Er**; Grad 1, Färbung HE, Vergrößerung 160×)



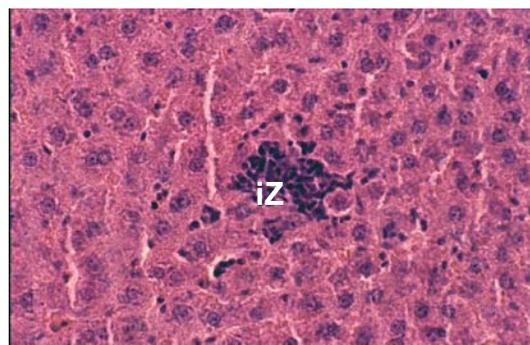
**Patho-histologische Knochenmarkveränderungen:** Anhand des Knochenmarks in Femur und Tibia wird die medulläre Erythropoiese beurteilt (Abb. 34, Tab. 20). Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der medullären Erythropoiese sind global mit  $p < 0,0001$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (Tab. 20). Die größte Steigerung der medullären Erythropoiese ist bei allen Tieren der Gruppe Ro 50 0,75 festzustellen (Grad 3 und 4). In den Gruppen Ro 50 0,25 und EPO 0,25 kann bei allen Tieren eine gering- bis mittelgradig (Grad 2 und 3) gesteigerte medulläre Erythropoiese beobachtet werden. Dagegen kommt es bei der Gruppe EPO 0,75 nur zu einer minimal bis geringgradigen (Grad 1 und 2 bei allen Tieren) gesteigerten medullären Erythropoiese. Bei der Kontrollgruppe kann lediglich bei einem Tier eine minimal gesteigerte medulläre Erythropoiese beobachtet werden.

**Abb. 34:** Knochenmark, medulläre Erythropoese in Experiment 2 (Grad 2, **Fz** = Fettzellen; **eI** = erythropoietische Inseln; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



**Patho-histologische Leberveränderungen:** Bei allen Dosierungsgruppen zeigen sich minimale bis geringgradige (Grad 1 und 2) interstitielle und perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate (Abb. 35). Die Infiltrate bestehen aus Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen. Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der interstitiellen und perivaskulären Entzündungszellinfiltraten sind mit  $p < 0,0001$  und  $p = 0,0021$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (Tab. 20). Besonders auffällig sind die Gruppen Ro 50 0,25 und EPO 0,25 mit hoher Anzahl von Grad 2.

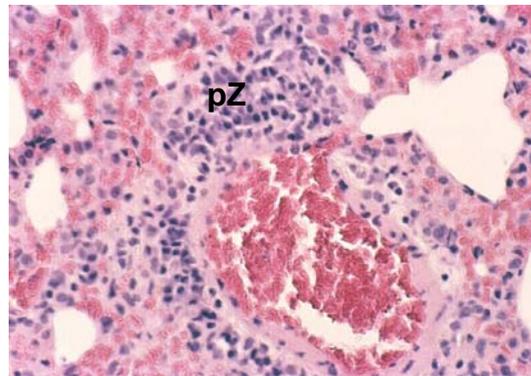
**Abb. 35:** Interstitielles Zellinfiltrat (**iZ**) in der Leber in Experiment 2 (Grad 1; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



**Patho-histologische Lungenveränderungen:** Sowohl interstitielle wie auch perivaskuläre entzündliche Zellinfiltrate (Grad 1 und 2), bestehend aus Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen, werden bei allen Tieren beobachtet (Abb. 36). Die Unterschiede zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen sind bezüglich der mittleren Ausprägung der interstitiellen Entzündungszellinfiltraten mit  $p = 0,0041$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis

Test, Tab. 20). Besonders auffällig ist, dass alle Tiere der Gruppe EPO 0,25 interstitielle Zellinfiltrate des Grades 2 zeigen.

**Abb. 36:** Perivaskuläres Zellinfiltrat (pZ) in der Lunge in Experiment 2 (Grad 2; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



**Tabelle 20:** In der Inzidenztabelle sind die patho-histologischen Auswertungen der einzelnen Dosierungsgruppen und die Resultate des Kruskal-Wallis Tests (KW-Test; nur Vergleich für die Substanzen EPO und Ro) von Niere, Milz, Knochenmark, Leber und Lunge des Experimentes 2 dargestellt. Die Gruppen sind wie folgt eingeteilt:

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50 0,25	Ro 50 0,75	EPO 0,25	EPO 0,75
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	11	11	12	12	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	<u>10</u>	<u>10</u>	<u>12</u>	<u>11</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	1	1	-	1	1
- Grad 1	4	3	9	2	6
- Grad 2	4	7	2	7	5
- Grad 3	2	-	1	2	-
KW-Test	p = 0,09				
<u>interstitielle Fibrose</u>	<u>11</u>	<u>10</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	1	-	-	-
- Grad 1	4	5	6	7	5
- Grad 2	6	4	6	4	7
- Grad 3	1	1	-	1	-
KW-Test	p = 0,86				

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	EPO	EPO
		0,25	0,75	0,25	0,75
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	11	11	12	12	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>Tubulusdilataion</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 1	4	4	5	6	5
- Grad 2	6	5	7	6	7
- Grad 3	1	2	-	-	-
KW-Test	p = 0,74				
<u>Zystenbildung</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
- keine (Grad 0)	9	8	10	12	12
- Grad 1	2	2	2	-	-
- Grad 2	-	1	-	-	-
KW-Test	p = 0,09				
<u>tubuläres Protein</u>	<u>8</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>8</u>
- keine (Grad 0)	3	5	5	4	4
- Grad 1	4	5	6	7	8
- Grad 2	4	1	1	1	-
KW-Test	p = 0,98				
<u>basophile Tubuli</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 1	3	3	6	8	4
- Grad 2	7	6	5	3	8
- Grad 3	1	2	1	1	-
KW-Test	p = 0,28				
<u>Glomerulopathie</u>	<u>9</u>	<u>8</u>	<u>11</u>	<u>9</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	2	3	1	3	1
- Grad 1	3	6	7	8	9
- Grad 2	5	1	4	1	2
- Grad 3	1	1	-	-	-
KW-Test	p = 0,37				

Dosierungsgruppe	NaCl	Ro 50	Ro 50	EPO	EPO
		0,25	0,75	0,25	0,75
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	11	11	12	12	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>Pyelitis</u>	-	1	-	1	-
- keine (Grad 0)	11	10	12	11	12
- Grad 1	-	1	-	-	-
- Grad 3	-	-	-	1	-
KW-Test	p = 0,55				
<u>Kapselfibrose</u>	5	10	1	11	3
- keine (Grad 0)	6	1	11	1	9
- Grad 1	1	-	1	-	-
- Grad 2	3	7	-	7	3
- Grad 3	1	2	-	3	-
- Grad 4	-	1	-	1	-
KW-Test	p < 0,0001				
<b>Anzahl untersuchter Milzen:</b>	11	12	12	12	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>follikuläre Milzhyperplasie</u>	11	12	12	12	12
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 2	2	4	-	3	5
- Grad 3	9	8	12	9	7
KW-Test	p = 0,11				
<u>extramedulläre Erythropoiese</u>	-	-	7	-	1
- keine (Grad 0)	11	12	5	12	11
- Grad 1	-	-	6	-	1
- Grad 2	-	-	1	-	-
KW-Test	p = 0,0002				

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	EPO	EPO
		0,25	0,75	0,25	0,75
<b>Anzahl untersuchter Knochenmarkpräparate</b>					
<b>(Femur und Tibia):</b>	11	12	12	12	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>gesteigerte Erythropoiese</u>	<u>1</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	10	-	-	-	-
- Grad 1	1	-	-	1	7
- Grad 2	-	7	1	4	5
- Grad 3	-	4	6	7	-
- Grad 4	-	1	5	-	-
KW-Test	p < 0,0001				
<b>Anzahl untersuchter Lebern:</b>	11	12	12	12	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	<u>8</u>	<u>12</u>	<u>8</u>	<u>12</u>	<u>9</u>
- keine (Grad 0)	3	-	4	-	3
- Grad 1	5	4	8	2	7
- Grad 2	3	8	-	9	2
- Grad 3	-	-	-	1	-
KW-Test	p < 0,0001				
<u>perivaskuläre Zellinfiltrate</u>	<u>6</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>12</u>	<u>6</u>
- keine (Grad 0)	5	3	2	-	6
- Grad 1	3	3	7	4	6
- Grad 2	3	6	3	8	-
KW-Test	p = 0,0021				

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	EPO	EPO
		0,25	0,75	0,25	0,75
<b>Anzahl untersuchter Lungen:</b>	11	12	12	12	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>10</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	2	-	-
- Grad 1	6	2	3	-	8
- Grad 2	5	10	7	12	4
KW-Test	p = 0,0041				
<u>perivaskuläre Zellinfiltrate</u>	<u>8</u>	<u>7</u>	<u>7</u>	<u>11</u>	<u>8</u>
- keine (Grad 0)	3	5	5	1	4
- Grad 1	6	2	3	2	6
- Grad 2	2	5	4	9	2
KW-Test	p = 0,06				

### 4.3 Experiment 3

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung und zur Abklärung möglicher Langzeiteffekte wurden die Tiere in Experiment 3 ohne wissentliche Auswahl in fünf Gruppen unterteilt und sowohl mit der erfolgreichen Modifikation Ro 50, in drei verschiedenen Dosierungen einmal wöchentlich, als auch mit EPO einmal wöchentlich behandelt. Ein allgemeines Screening der aufgetretenen Nebenwirkungen wurde dokumentiert. Für EPO und Ro 50 wurde als Wochendosis 0,75 µg/kg KM 1-mal wöchentlich gewählt, da dies die empfohlene therapeutische Dosierung, ist. Jedoch wird für EPO als Applikationsfrequenz in der Literatur eine dreimal wöchentliche s.c. Applikation empfohlen [10]. Die Dosierung und Frequenz sollte jedoch mit der Dosierung der zu testenden Modifikation Ro 50 verglichen werden können, die im Experiment 2 mit 0,75 µg/kg KM 1-mal wöchentlich als effektiv bewertet worden war. Außerdem wurden zwei höhere Dosierungsgruppen für Ro 50 untersucht, in denen die ca. 3-fache und die 10-fache Menge der niedrigsten Dosierung eingesetzt wurden. Dosierungsgruppen:

Ro 50 0,75	(0,75 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
Ro 50 2,5	(2,5 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
Ro 50 7,5	(7,5 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
EPO	(0,75 µg/kg KM);	1-mal wöchentlich
NaCl	(0,9ige);	1-mal wöchentlich

Aufgrund ständig steigender Hämatokritwerte (~80 % in der 8. Woche) und dem daraus resultierenden schlechten Allgemeinzustand der Tiere wurden die mit Ro 50 2,5 µg/kg KM und Ro 50 7,5 µg/kg KM behandelten Ratten nach acht Wochen aus dem Experiment genommen. Die statistische Analyse dieser Daten erfolgte wie unter Material, Tiere und Methoden angegeben mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Zeit. Da die beiden Gruppen Ro 50 2,5 und Ro 50 7,5 nach der achten Woche aus dem Experiment genommen wurden, wurde die statistische Analyse auf den Zeitraum 0. bis 8. Woche beschränkt.

#### 4.3.1 Blutparameter

**Absolute und prozentuale Retikulozytenzahl:** Die Veränderungen der absoluten und prozentualen Retikulozytenzahl in den verschiedenen Gruppen sind in den Abb. 37 und 38 dargestellt. Beide Parameter zeigen ähnliche Verläufe. Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die Gruppe EPO 0,75 (0,75 µg/kg KM) zeigen während der zwölfwöchigen Versuchszeit

keinen Anstieg. Die absoluten Retikulozytenzahlen der Kontrollgruppe und der Gruppe EPO schwanken von der 0.-12. Woche etwa zwischen  $0,22 \pm 0,10 - 0,33 \pm 0,05 \times 10^6/\mu\text{l}$ . Im Vergleich dazu zeigen die Tiere der Gruppen Ro 50 einen deutlichen und dosisabhängigen Anstieg der Retikulozytenzahl über die gesamte Versuchszeit. Die absoluten Retikulozytenzahlen der Gruppe Ro 50 0,75 steigen von  $0,31 \pm 0,07 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf einen Wert von  $0,43 \pm 0,12 \times 10^6/\mu\text{l}$  (4. und 6. Woche), um dann bis zur 12. Woche noch einmal anzusteigen ( $0,58 \pm 0,04 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Die absoluten Retikulozytenzahlen der Gruppe Ro 50 2,5 steigen von  $0,33 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf  $0,82 \pm 0,12 \times 10^6/\mu\text{l}$  (1. Woche), fallen dann auf  $0,47 \pm 0,20 \times 10^6/\mu\text{l}$  (2. Woche) und steigen wieder auf  $0,67 \pm 0,06 \times 10^6/\mu\text{l}$  (4. Woche). Bis zum Versuchsende schwanken die Retikulozytenzahlen dann zwischen  $0,5 \pm 0,04 \times 10^6/\mu\text{l}$  (6. Woche) und  $0,59 \pm 0,10 \times 10^6/\mu\text{l}$  (8. Woche). Die Gruppe Ro 50 7,5 (7,5  $\mu\text{g/kg KM}$ ) zeigt insgesamt die höchsten Retikulozytenzahlen, wobei, nach einem Peak in der 1. Woche ( $1,35 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$ ), ein langsamer Abfall auf Zahlen zwischen  $1,17 \pm 0,06 - 1,13 \pm 0,12 \times 10^6/\mu\text{l}$  (2.-4. Woche) einsetzt. In der 6. Woche fallen die absoluten Retikulozytenzahlen weiter auf  $0,87 \pm 0,23 \times 10^6/\mu\text{l}$ , zeigen abschließend jedoch wieder ansteigende Tendenzen in der achten Woche mit einer Zahl von  $1,05 \pm 0,14 \times 10^6/\mu\text{l}$ .

Das Resultat der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Entwicklung der Retikulozytenzahl der Substanzen Ro und EPO zeigt eine statistisch hochsignifikante Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe sowie einen statistisch hochsignifikanten globalen Zeit- und Gruppeneffekt ( $p < 0,0001$ ). Das bedeutet, dass die Verläufe im Ganzen gesehen nicht parallel sind und, gemittelt über alle Gruppen, einen Anstieg der Retikulozytenzahl über die Zeit. Je höher die Dosierung von Ro 50 gewählt wird, umso stärker ist der initiale Anstieg in der 1. Woche ausgeprägt und verläuft auf entsprechend hohem Niveau.

Abb. 37 Entwicklung der absoluten Retikulozytenzahl in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)

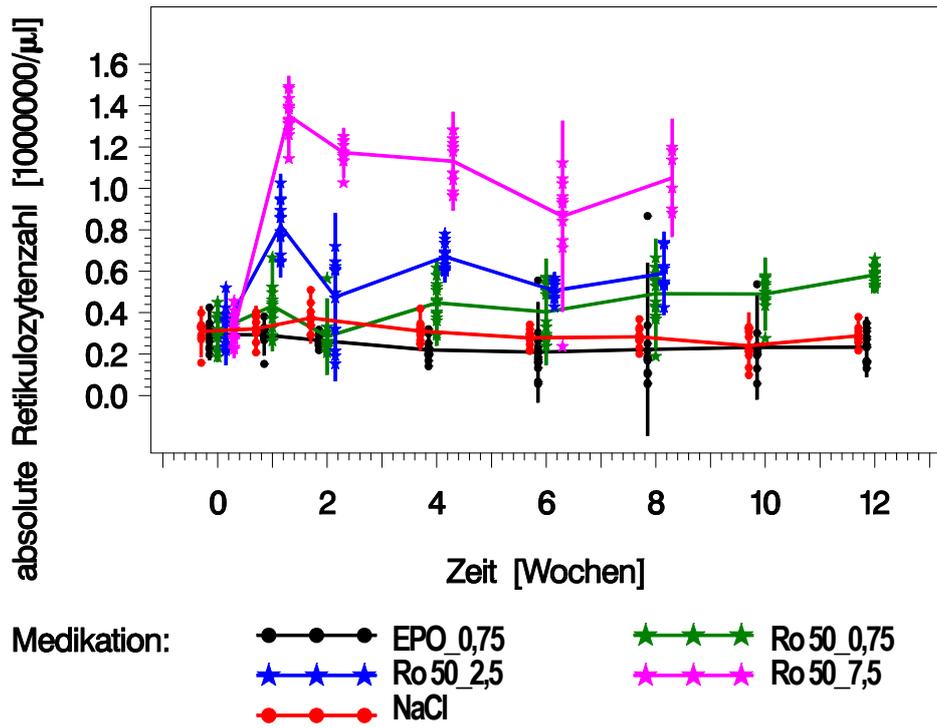
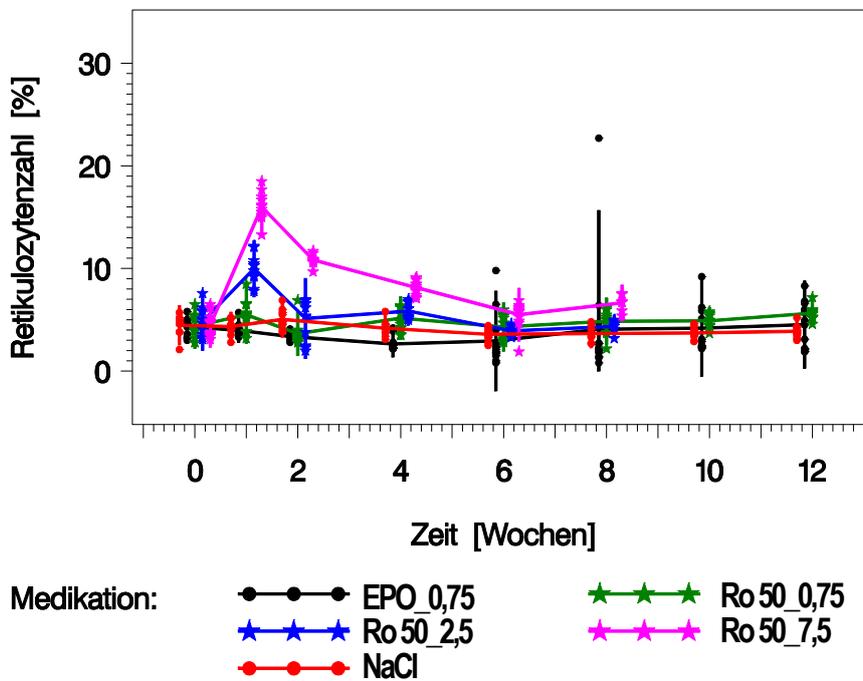
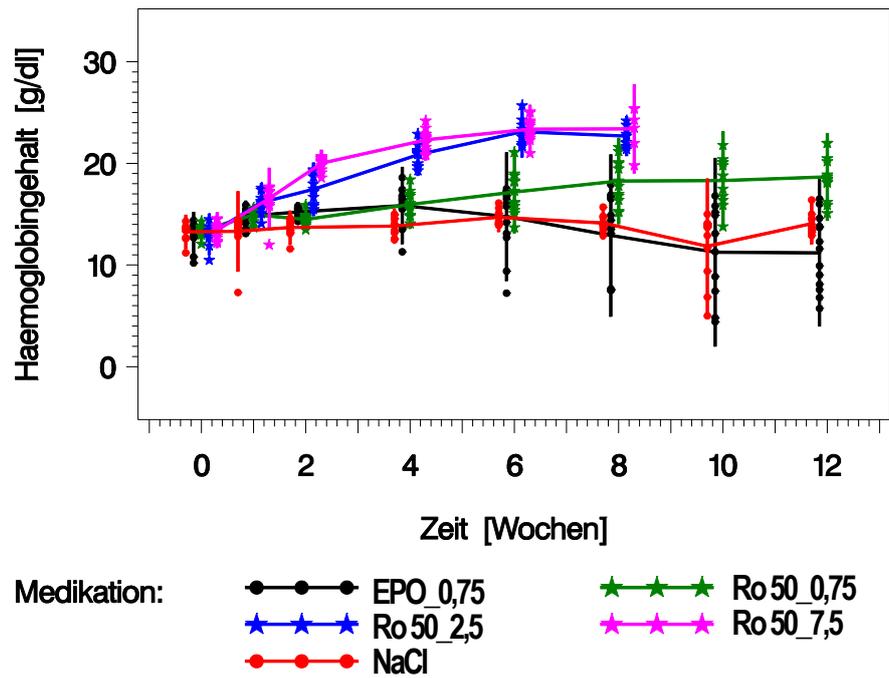
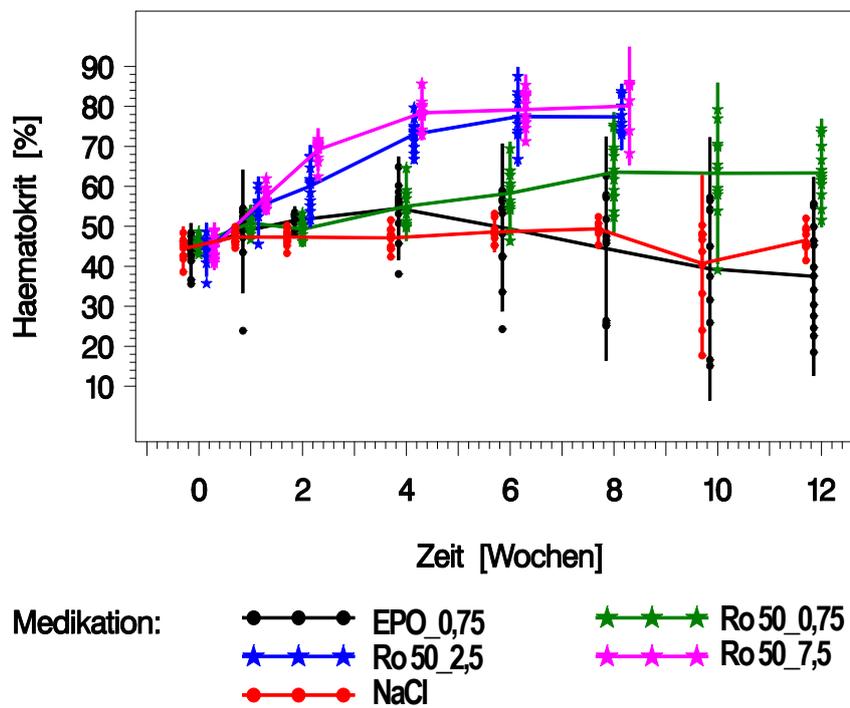


Abb. 38: Entwicklung der Retikulozytenzahl in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)

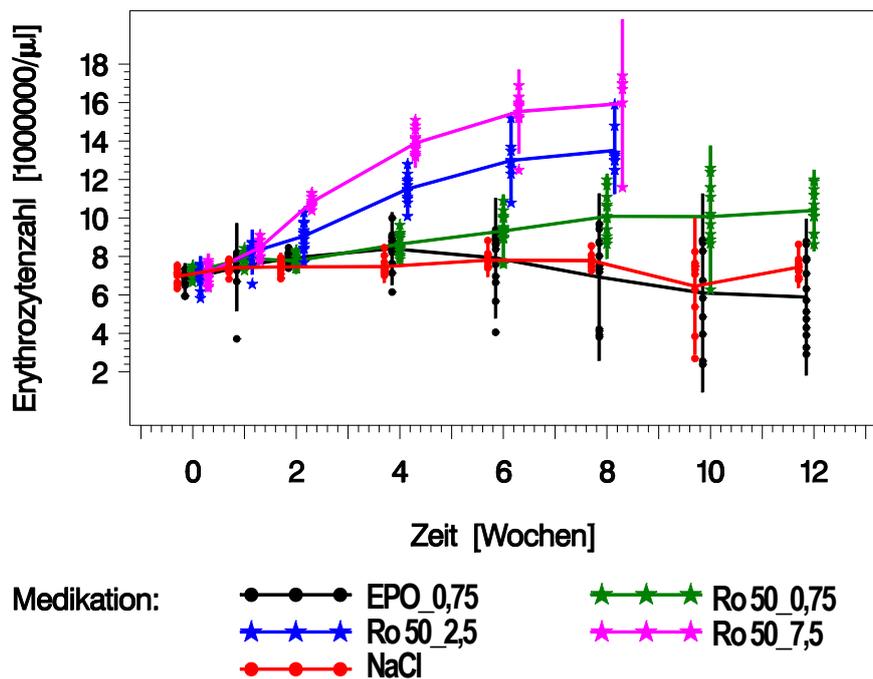


**Hämoglobin / Hämatokrit / Rote Blutkörperchen:** In Abb. 39 ist die Entwicklung der Hämoglobinkonzentration in den verschiedenen Gruppen dargestellt. Der Hämoglobingehalt der Kontrollgruppe (NaCl) steigen von  $13 \pm 0,83$  g/dl (0. Woche) auf  $14 \pm 1,0$  g/dl (12. Woche). Die maximale Konzentration liegt bei  $15 \pm 0,70$  g/dl (6. Woche) und der minimale Wert liegt bei  $12 \pm 3,31$  g/dl (10. Woche). Die Konzentrationen der Gruppe EPO steigen von  $13 \pm 1,14$  g/dl (0. Woche) auf  $16 \pm 1,88$  g/dl (4. Woche) und zeigen dann einen Abfall des Hämoglobingehaltes, unter die Werte der Kontrolltiere, auf  $11 \pm 4,62$  g/dl (10.-12. Woche). Im Vergleich dazu steigt bei allen Gruppen mit der Medikation Ro 50 die Hämoglobinkonzentration dosisabhängig über die gesamte Versuchszeit. Die Abbildung 37 stellt bei der Gruppe Ro 50 0,75 einen flachen Anstieg der Hämoglobinkonzentration von  $13 \pm 0,48$  g/dl (0. Woche) auf  $19 \pm 2,14$  g/dl (12. Woche) dar, wobei in der 4. Woche Werte von  $16 \pm 1,18$  g/dl erreicht werden. Bei den Gruppen Ro 50 2,5 und 7,5 kommt es zu einem starken Anstieg der Hämoglobinkonzentration von  $13 \pm 1,0$  g/dl (0. Woche) auf  $21-22 \pm 1,0$  g/dl (4. Woche). Bis zum Versuchsende bleibt die Hämoglobinkonzentration der beiden hochdosierten Ro 50-Gruppen 2,5 und 7,5 konstant bei etwa  $23 \pm 2,17$  g/dl (6.-8. Woche). Die Entwicklung des Hämatokrits (Abb. 40) und der Anzahl der roten Blutkörperchen (Abb. 41) korreliert mit dem Verlauf des Hämoglobingehaltes (Abb. 39).

Das Resultat der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Entwicklung des Hämatokrits der Substanzen Ro und EPO zeigt eine statistisch hochsignifikante Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe sowie einen statistisch hochsignifikanten globalen Zeit- und Gruppeneffekt ( $p < 0,0001$ ). Das bedeutet, dass die Verläufe im Ganzen gesehen nicht parallel sind. Alle Gruppen mit der Medikation Ro 50 zeigen gegenüber der Gruppe EPO 0,75 einen stärkeren Anstieg. Dabei weisen die hohen Dosierungsgruppen einen stärkeren Anstieg auf als die niedrig dosierten Gruppen EPO und Ro 50 0,75 und sie verharren bis zum Ende der Beobachtungszeiträume auf hohem Niveau.

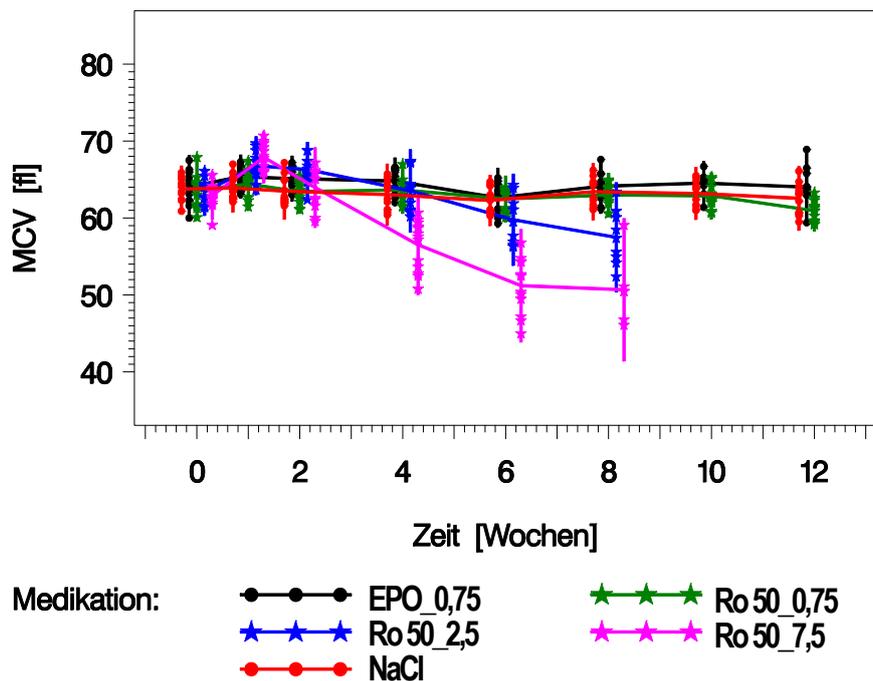
**Abb. 39:** Entwicklung der Hämoglobinkonzentration in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)**Abb. 40:** Entwicklung des Hämatokrits in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)

**Abb. 41:** Entwicklung der Anzahl der roten Blutkörperchen in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)



**Mittleres korpuskuläres Zellvolumen:** In Abb. 42 ist zu erkennen, dass das mittlere korpuskuläre Zellvolumen der Kontrollgruppe (NaCl), der mit EPO behandelten Gruppen und der Gruppe Ro 50 0,75 einen ähnlichen, gleichbleibenden Verlauf haben. Die Werte dieser Gruppen liegen während der gesamten Versuchszeit zwischen 61-64 Femtoliter (fl). Nur die Gruppen Ro 50 2,5 und Ro 50 7,5 zeigen, nach einem Peak in der ersten Woche (67-68 fl), einen dosisabhängig starken Abfall des mittleren korpuskulären Zellvolumens. Das mittlere korpuskuläre Zellvolumen fällt in der Gruppe Ro 50 2,5 von 64 fl (4. Woche) auf 58 fl (8. Woche) und in der Gruppe Ro 50 7,5 von 57 fl (4. Woche) auf 51 fl (8. Woche).

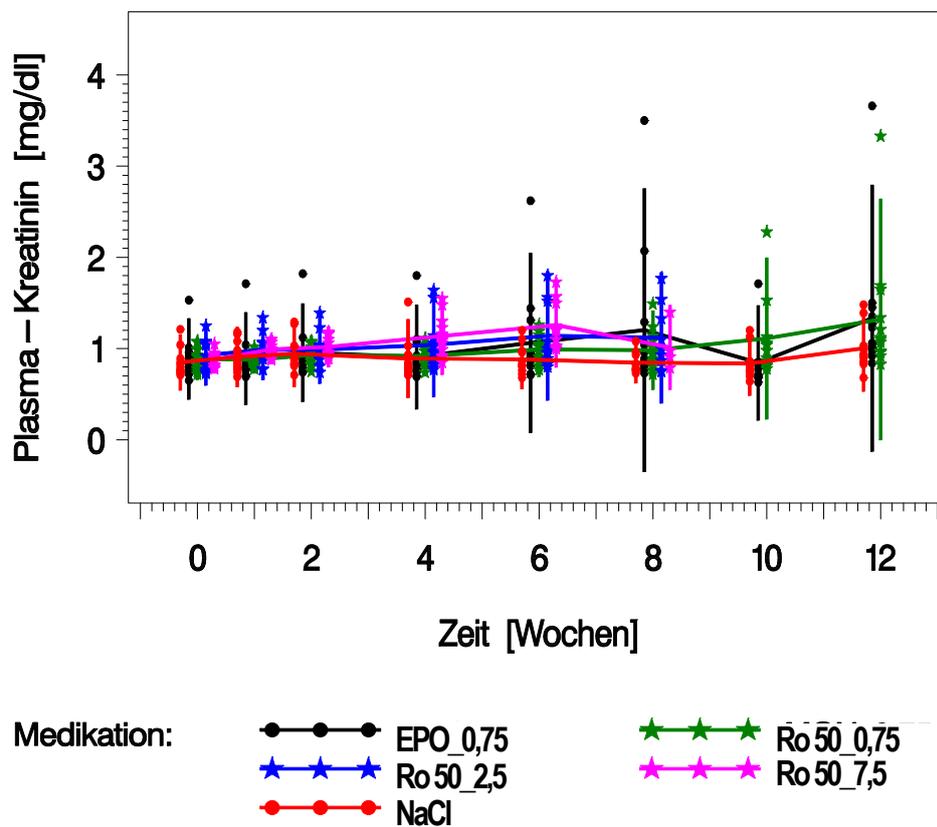
**Abb. 42:** Entwicklung des mittleren korpuskulären Zellvolumens (MCV) in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)



In Abb. 43 wird die Entwicklung der **Kreatininkonzentration** dargestellt. Die Kreatininkonzentrationen der gesamten Versuchsgruppen zeigen während der gesamten Versuchszeit des Experimentes 3 etwa gleichbleibende Werte, die zwischen  $0,83 \pm 0,17$  und  $1,33 \pm 0,73$  mg/dl schwanken.

Das Resultat der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Entwicklung der Kreatininkonzentration der Substanzen Ro und EPO zeigt einen statistisch hochsignifikanten Zeiteffekt ( $p < 0,0001$ ), jedoch keine signifikante Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe und keinen signifikante globalen Gruppeneffekt ( $p = 0,61$  und  $p = 0,46$ ). Das heißt, es kann nur nachgewiesen werden, dass ein genereller Anstieg der Kreatininkonzentration unabhängig von den Gruppen über die Zeit vorhanden ist.

Abb. 43: Entwicklung der Kreatininkonzentration in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)



Die Abbildungen der Entwicklung aller nachfolgend aufgeführten Blutparameter finden sich im Anhang, da sie im Experiment 3 keine Veränderungen zeigten: Thrombozytenzahl, Leukozytenzahl, mittleres korpuskuläres Zellhämoglobin, mittlere korpuskuläre Zellhämoglobinkonzentration, Leberenzyme (GOT, GPT und ALP), Lipide (Cholesterin, Triglyzeride), Nierenfunktionsparameter (Harnstoff und Phosphat), Protein und Glukose.

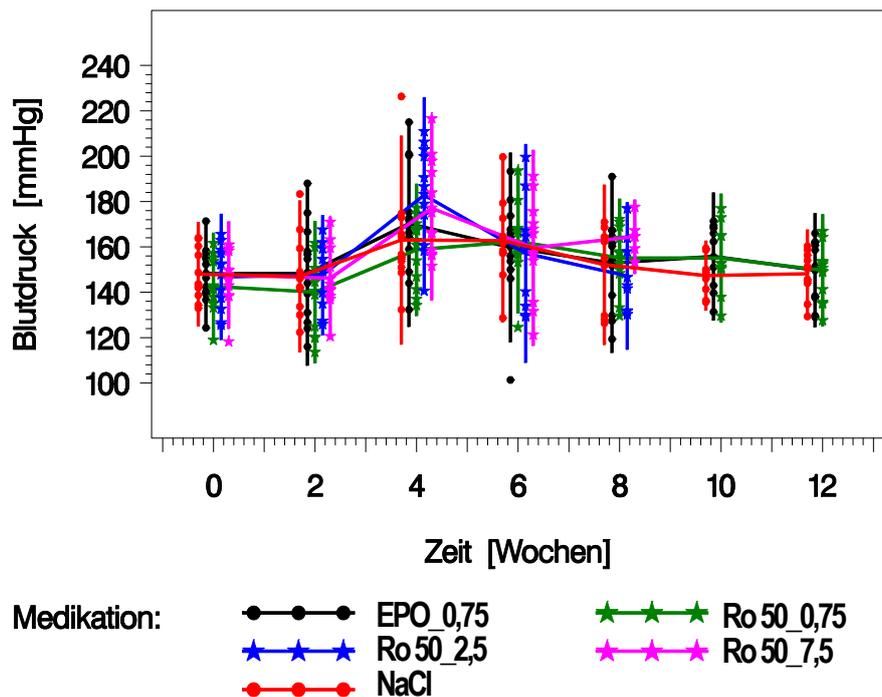
#### 4.3.2. Blutdruck

In Abb. 44 ist die **Entwicklung des systolischen Blutdrucks** während der Versuchszeit von acht bzw. zwölf Wochen dargestellt. Bei allen Gruppen kommt es zwischen der zweiten und der vierten Woche zum Anstieg des systolischen Blutdrucks. Die Höhe des Anstiegs ist jedoch in den Gruppen unterschiedlich: während die Kontrollgruppe und die Gruppe Ro 50 0,75 um ca. 17 mm Hg (von  $\sim 144 \pm 16$  mm Hg auf  $\sim 161 \pm 22$  mm Hg) und die Gruppe EPO um 22 mm Hg (von  $148 \pm 20$  mm Hg auf  $170 \pm 22$  mm Hg) ansteigen, ist bei den hochdosierten Ro 50-Gruppen ein Anstieg von 32 mm Hg (von  $\sim 148 \pm 13$  mm Hg auf  $\sim 180 \pm 20$  mm Hg) zu beobachten. In allen Gruppen sinken diese Spitzenwerte in der sechsten Woche aber wieder ab, wenn auch nicht auf den Ausgangswert, so dass sich die Blutdruckwerte aller

Gruppen in der sechsten Woche mit etwa  $160 \pm 21$  mm Hg nicht mehr voneinander unterscheiden. Mit Ausnahme der Gruppe Ro 50 7,5, deren Blutdruckwerte in der achten Woche bei  $165 \pm 8$  mm Hg liegen, sind ab der 6. Woche in allen Gruppen gleichmäßige, leicht absinkende Blutdruckwerte zu beobachten. Bei den Gruppen, die bis zur 12. Woche weitergeführt wurden (Ro 50 0,75, EPO und Kontrolle), wurden zum Versuchsende nur noch Werte gemessen, die den Ausgangswerten vergleichbar waren (etwa  $150 \pm 12$  mm Hg).

Das Resultat der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen der Entwicklung des systolischen Blutdruck der Substanzen Ro und EPO zeigt einen statistisch hochsignifikanten Zeiteffekt ( $p < 0,0001$ ), jedoch keine signifikante Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe und globalen Gruppeneffekt ( $p = 0,08$  und  $p = 0,63$ ). Das heißt, es kann nur nachgewiesen werden, dass ein genereller Anstieg des systolischen Blutdrucks unabhängig von den Gruppen über die Zeit vorhanden ist.

**Abb. 44:** Entwicklung des systolischen Blutdrucks in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)



### 4.3.3 Antikörperbestimmung

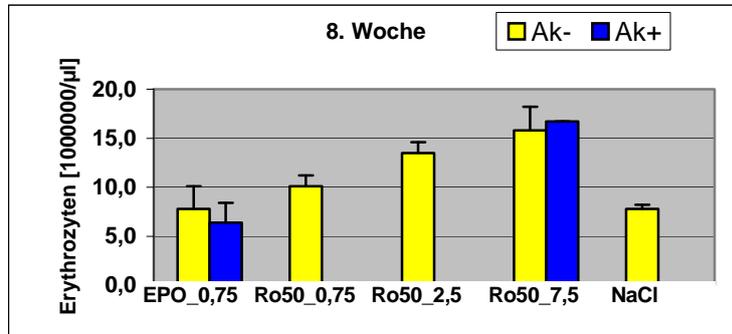
Eine **Antikörperbestimmung** wurde in der achten, zehnten und in der zwölften Woche durchgeführt. Es wurde für den eingesetzten ELISA festgesetzt, dass eine positive Immunantwort dann vorliegt, wenn bei einem Tier in vitro eine Hemmung von EPO > 50% festgestellt werden kann. Dieses Tier wurde dann als Ak+ beurteilt (Tab. 21). Die Ergebnisse des ELISA's, dargestellt in der Tabelle 21, zeigen, dass bei der Gruppe EPO in der achten Woche eine beträchtliche Produktion von Antikörpern vorliegt. Diese Antikörperproduktion in der Gruppe EPO bleibt in der zehnten und zwölften Woche bestehen und ist laut Fisher's-exact-Test signifikant ( $p < 0,0001$ ). Nur ein Tier zeigt auch in der Gruppe Ro 50 7,5 eine Antikörperproduktion. Alle anderen Tiere zeigen keine positive Immunantwort, wobei die Ergebnisse des ELISA's in der überwiegenden Anzahl der Fälle keine Ak-Produktion und nur bei wenigen Tieren (Gruppe Ro 50 2,5 und Ro 50 7,5) eine Hemmung von mehr als 10% aufweisen (Ergebnisse sind in Tab. 23 im Anhang aufgeführt).

**Tabelle 21:** Anzahl der antikörperpositiven (Ak+) und antikörpernegativen (Ak-) Tiere nach 8-, 10- und 12-wöchiger Substanzapplikation in Experiment 3 (Ro 50 0,75 = 0,75 µg/kg; Ro 50 2,5 = 2,5 µg/kg; Ro 50 7,5 = 7,5 µg/kg; EPO 0,75 = 0,75 µg/kg EPO; NaCl = physiologische Kochsalzlösung; - = die Dosierungsgruppen Ro 50 2,5 µg/kg und Ro 50 7,5 µg/kg wurden nach acht Wochen aus dem Experiment genommen; \* = signifikantes Ergebnis des Fisher's-exact-Test  $p < 0,0001$ )

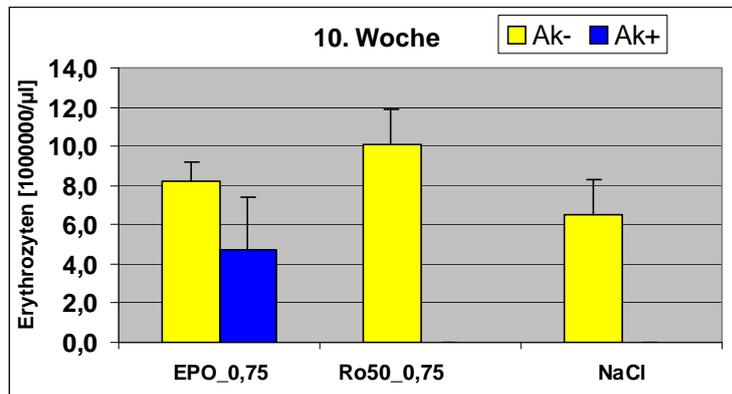
Zeit nach Beginn der Medikation	Antikörper- reaktion	Ro 50 0,75 (13 Tiere)	Ro 50 2,5 (8. Woche: 7 Tiere)	Ro 50 7,5 (8. Woche: 9 Tiere)	EPO 0,75* (8. Woche: 14 Tiere; ab 10. Woche 12 Tiere)	NaCl (11 Tiere)
8. Woche	Ak+	0	0	1	9	0
	Ak-	13	7	8	5	11
10. Woche	Ak+	0	-	-	9	0
	Ak-	13	-	-	3	11
12. Woche	Ak+	0	-	-	9	0
	Ak-	13	-	-	3	11

**Die mittlere Erythrozytenzahl bei Ak+ (blau) und Ak- (gelb) reagierenden Seren der Tiere** während der Versuchszeit ist in Abb. 45 dargestellt. Das einzige Tier, das in der Gruppe Ro 50 7,5 in der 8. Woche (a) eine Antikörperproduktion zeigt, hat eine höhere Erythrozytenkonzentration ( $16,7 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) im Vergleich zu der durchschnittlichen Erythrozytenkonzentration ( $15,8 \pm 2,2 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) der restlichen Tiere seiner Gruppe. Bei den neun Tieren der Gruppe EPO mit Antikörperproduktion ist dagegen zu allen Meßzeitpunkten die Erythrozytenzahl ( $4,7-6,4 \pm 2,0 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) niedriger als bei den EPO-Tieren ( $7,9 \pm 2,3 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) ohne Immunitätsentwicklung. Darüber hinaus wird der substanz- und dosisabhängige Effekt auf die Erythrozytenkonzentration vor allem in der 8. Woche deutlich. Im Vergleich zu den Ro 50-Gruppen zeigt die Gruppe EPO von der achten bis zur zwölften Woche niedrigere Erythrozytenkonzentration ( $4,7-7,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Dagegen wird in der achten Woche in der Gruppe Ro 50 0,75 eine Erythrozytenzahl von  $10 \pm 1,1 \times 10^6/\mu\text{l}$ , in der Gruppe Ro 50 2,5 eine Erythrozytenzahl von  $13,5 \pm 1,1 \times 10^6/\mu\text{l}$  und in der Gruppe Ro 50 7,5 eine mittlere Erythrozytenzahl von  $15,8 \pm 2,4 \times 10^6/\mu\text{l}$  gemessen.

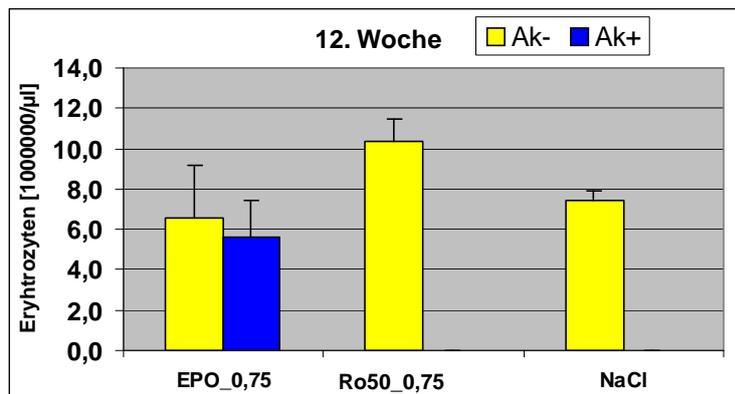
**Abb. 45:** Mittlere Erythrozytenzahl in Experiment 3: a) in der 8. Woche, b) 10. Woche und c) 12. Woche (siehe Legende Tab. 21, n = Anzahl der Tiere) in Experiment 3 bei Ak+ (blau) und Ak- (gelb) reagierenden Seren der Tiere ( $n = \bar{x} \pm SD$ )



a) n = 5 9 13 7 8 1 11



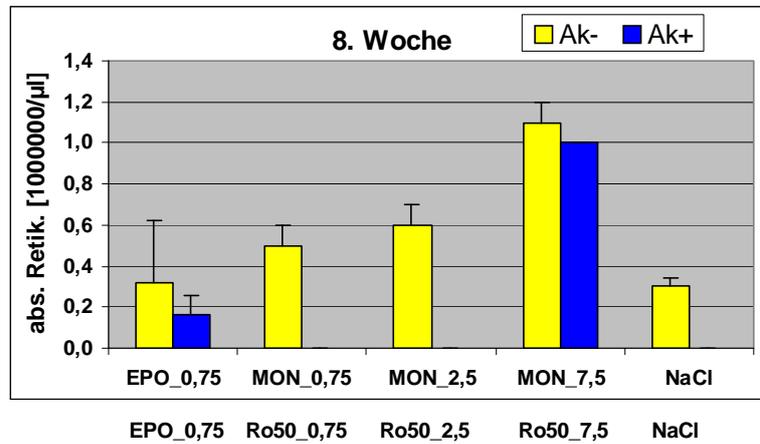
b) n = 3 9 13 11



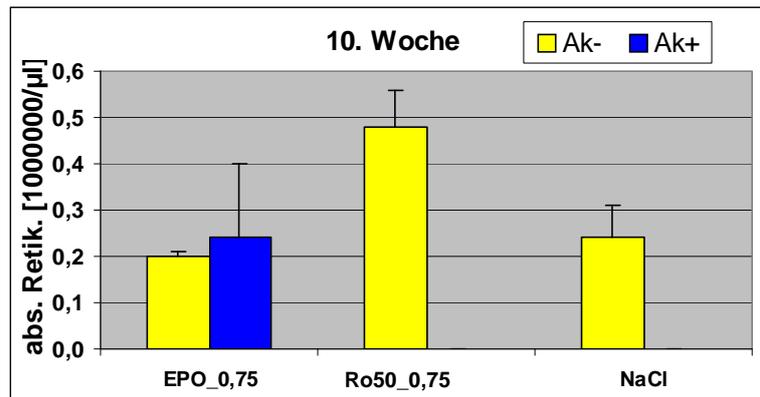
c) n = 3 9 13 11

**Mittlere absolute Retikulozytenzahl bei Ak+ (blau) und Ak- (gelb) reagierenden Seren der Tiere** werden in Abb. 46 dargestellt. Im Vergleich zeigt das Tier der Gruppe Ro 50 7,5 mit Antikörperbildung in der 8. Woche (a) eine niedrigere absolute Retikulozytenzahl ( $0,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) als die restlichen Tiere seiner Gruppe ( $1,1 \pm 0,1 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Auch in der Gruppe EPO sind bei den neun Tieren mit Antikörperproduktion niedrigere Retikulozytenkonzentrationen ( $0,16 \pm 0,1 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) zu beobachten als bei den EPO-Tieren ohne Immunitätsentwicklung ( $0,32 \pm 0,3 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Dies ist jedoch lediglich in der achten Woche der Fall, in den darauffolgenden Wochen zeigen die antikörperproduzierenden Tiere höhere Retikulozytenwerte, als die Antikörper-negativen Tiere der Gruppe EPO. Die absolute Retikulozytenzahl der neun Tiere der Gruppe EPO mit Ak+ reagierenden Seren liegen in der 10. (b) und 12. (c) Woche bei etwa  $0,25 \pm 0,2 \times 10^6/\mu\text{l}$ , die Werte der Tiere der Gruppe EPO mit Ak- reagierenden Seren dagegen fallen von  $0,2 \pm 0,02 \times 10^6/\mu\text{l}$  (10. Woche) auf  $0,17 \pm 0,05 \times 10^6/\mu\text{l}$  (12. Woche).

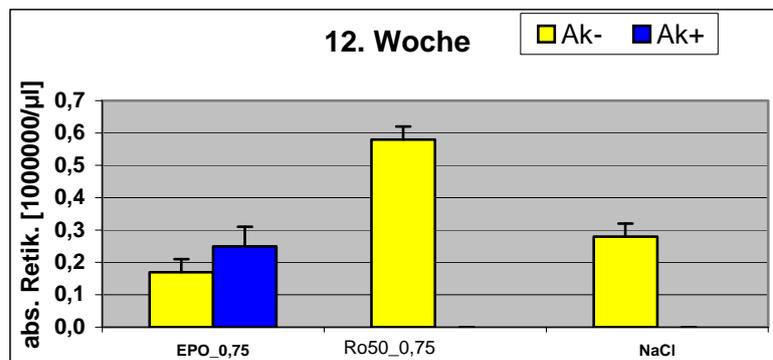
**Abb. 46:** Mittlere absolute Retikulozytenzahl in Experiment 3 a) in der 8. Woche, b) 10. Woche und c) 12. Woche bei Ak+ (blau) und Ak- (gelb) reagierenden Seren der Tiere (siehe Legende: Tab. 21; abs. Retik. = absolute Retikulozytenzahl; n = Anzahl der Tiere,  $n = \bar{X} \pm SD$ )



a) n = 5 9 13 7 8 1 11



b) n = 3 9 13 11

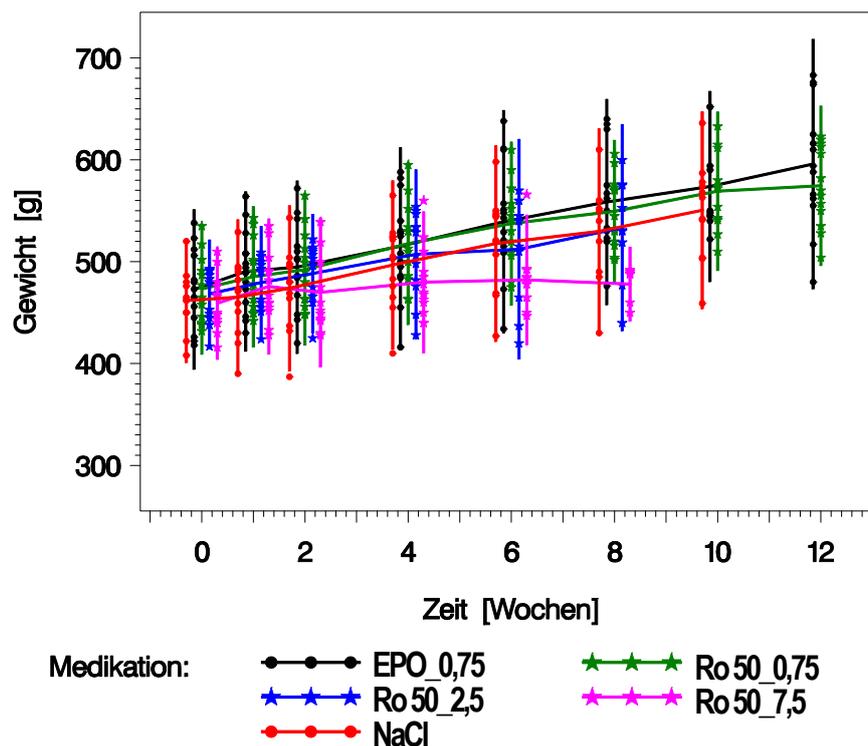


c) n = 3 9 13 11

#### 4.3.4 Körpermasse

In Abb. 47 sind die Verlaufskurven der **Körpermassen** aller Dosierungsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. Alle Gruppen zeigen über den gesamten Versuchszeitraum eine Zunahme der Körpermasse. Während die Gruppen Ro 50 0,75 und EPO den steilsten Anstieg der Körpermasse von durchschnittlich  $470 \pm 32$  g (0. Woche) auf  $550 \pm 35$  g (8. Woche) zeigen, verläuft die Gewichtszunahme der Gruppe Ro 50 2,5 von  $470 \pm 26$  g (0. Woche) auf  $530 \pm 50$  g (8. Woche) etwas moderater und liegt damit im Bereich der Kontrollgruppe (NaCl). Die Masse der Kontrollgruppe steigen von  $470 \pm 37$  g (0. Woche) auf  $530 \pm 48$  g (8. Woche). Die Körpermassen in der Gruppe Ro 50 7,5 steigen bis zur vierten Woche von  $459 \pm 27$  g auf  $480 \pm 36$  g kaum an und erreichen ab der sechsten Woche ein Plateau (etwa  $490 \pm 33$  g), das bis zur achten Woche anhält.

**Abb. 47:** Entwicklung der Körpermasse in Experiment 3 (Dosierung s. S. 70)



#### 4.3.5 Histologie

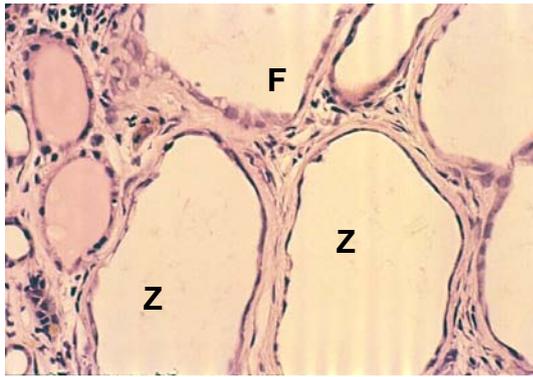
**Patho-histologische Nierenveränderungen:** In der Niere finden sich als Folge der fünfsechstel-Nephrektomie in unterschiedlichen Schweregraden interstitielle entzündliche Zellinfiltrate, eine interstitielle Fibrose, Tubulusdilatationen, Zystenbildungen, tubulär gelagertes Protein, basophile Tubuli, eine Glomerulopathie und in einigen Fällen eine Pyelitis

und Kapsel-fibrosen (Abb. 48 a-d). Anhand der Tab. 22 wird deutlich, dass bei allen Tieren aller Dosierungsgruppen und der Kontrollgruppe eine meist gering- bis mittelgradige (Grad 2 bis 3) interstitielle Infiltration von Entzündungszellen und eine Glomerulopathie sowie Kapsel-fibrosen vorkommen. Eine interstitielle Fibrose, basophile Tubuli und tubuläres Protein treten bei allen Tieren aller Gruppen auf, jedoch mit einer breiten Streuung bezüglich der verschiedenen Schweregrade (Grad 1 bis 4). Die Bildung von Zysten kann bei 3-6 Tieren jeder Dosierungsgruppe sowie bei der Kontrollgruppe (Grad 1 und 2) beobachtet werden. Eine Pyelitis wird bei zwei Tieren der Kontrollgruppe (Grad 2 und 4) und bei einem Tier der Gruppe EPO 0,75 (Grad 3) beobachtet.

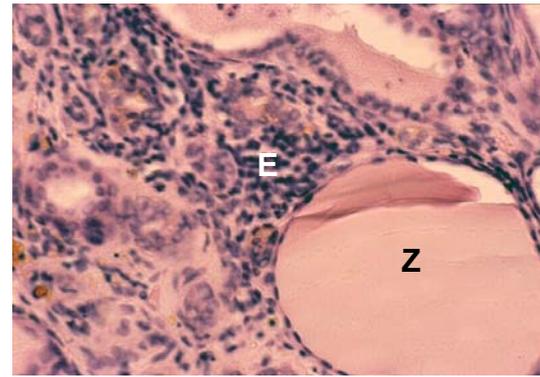
Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung von interstitiellen Zellinfiltraten und Tubulusdilatationen, abgestuft in die Grade 0 – 4, sind mit  $p = 0,029$  bzw.  $p < 0,0001$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (Tab. 15). Besonders auffällig sind die Gruppen Ro 50 0,75 und EPO 0,75 mit hoher Anzahl von Grad 2 und 3 bzw. Grad 3 und 4 (Tubulusdilatationen). Darüber hinaus zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der interstillen Fibrose ( $p = 0,047$ , Tab. 15).

**Abb. 48 a)–d):** Patho-histologische Veränderungen in der Niere in Experiment 3: **a)** = dilatierter Tubulus (**dT**), **b)** = mehrere dilatierte Tubuli (**dT**) mit interstitieller Fibrose (**F**), **c)** = tubuläre Zysten (**Z**) mit interstitieller Fibrose (**F**), **d)** = tubuläre Zyste (**Z**) mit Proteinzyylinder, hochgradige Fibrose (**F**) mit zahlreichen Entzündungszellen (**E**); Färbung HE, Vergrößerung 160×

**a)****b)**



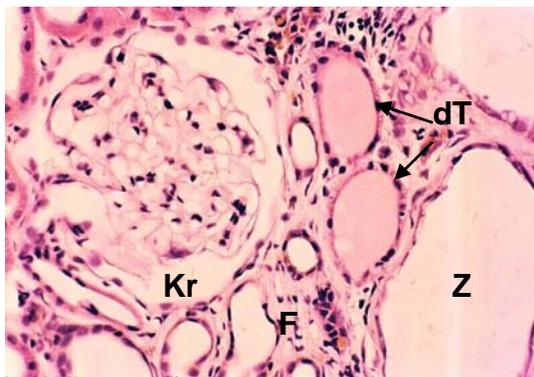
c)



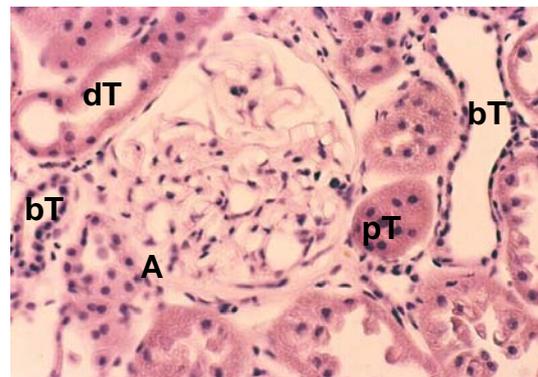
d)

Verschiedene Stadien der **Glomerulopathie** werden in Abb. 49 a)–d) exemplarisch dargestellt. Abb. 49 a) zeigt ein minimal verändertes Glomerulum mit fast vollständig vorhandenem Kapselraum, das in einem fibrotisch veränderten Gewebe (**F**) mit angrenzenden tubulären Zysten (**Z**) und mit proteinreicher Flüssigkeit gefüllten, etwas dilatierten Tubuli (**dT**) liegt. In Abb. 49 b) ist ein geringgradig verändertes (Grad 2) Glomerulum zu sehen, in dem Kapillarschlingen an der Bowman'sche Kapsel (zwischen 17 und 20 Uhr) adhären sind (**A**). Im Umfeld des Glomerulum liegen unveränderte proximale Tubuli (**pT**) und dilatierte (**dT**), bzw. basophile (**bT**) Tubuli. Das Interstitium ist weitgehend unauffällig. Abb. 49 c) zeigt ein mittelgradig verändertes Glomerulum (Grad 3). Die Adhäsion der Kapillarschlingen an die Bowman'sche Kapsel erstreckt sich über die Hälfte des Glomerulums einschließlich des Gefäßpols (**G**) und der Kapselraum (**Kr**) verliert an Lumen. Die Tubuliquerschnitte sind dilatiert (**dT**). In Abb. 49 d) wird das vorangeschrittene hochgradig veränderte Stadium der Glomerulopathie mit vollständiger Adhäsion der Kapsel an die Kapillarschlingen und Auslöschung des Kapselraums dargestellt (Grad 4). Das Glomerulum, dessen Mesangium (**M**) vollständig sklerosiert ist und homogen eosinophil erscheint, ist nur noch schemenhaft zu erkennen (Pfeile). Es liegt benachbart von basophilen, dilatierten Tubuli (**bdT**) im fibrotisch veränderten Interstitium (**F**). Hochgradige lymphoplasmazelluläre Infiltrate (**E**) sind in der Umgebung des Glomerulums vorhanden.

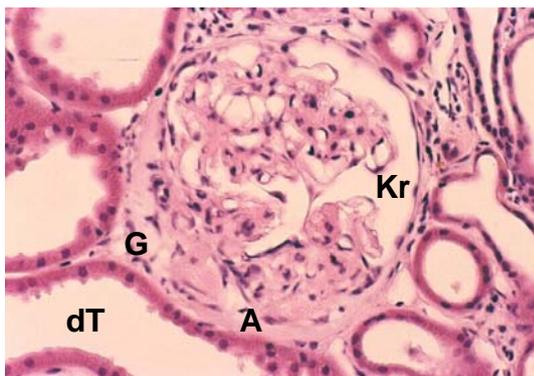
**Abb. 49 a)–d):** Verschiedene Stadien der Glomerulopathie in Experiment 3: **a)** = Grad 1, **b)** = Grad 2, **c)** = Grad 3, **d)** = Grad 4 (**F** = interstitielle Fibrose, **Z** = tubuläre Zysten, **dT** = dilatierter Tubulus, **A** = Adhäsion von Kapillarschlingen, **pT** = proximale Tubuli, **bT** = basophile Tubuli, **G** = Gefäßpol, **Kr** = Kapselraum, **M** = Mesangium, **bdT** = basophile, dilatierte Tubuli; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



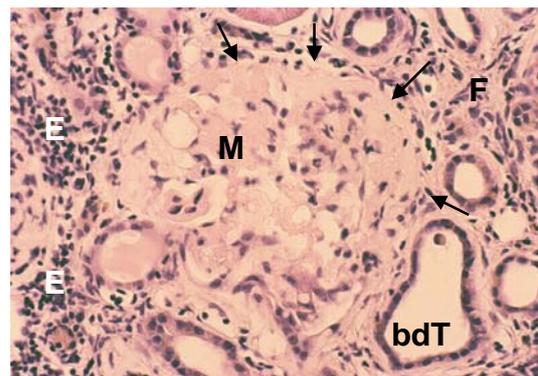
a)



b)



c)

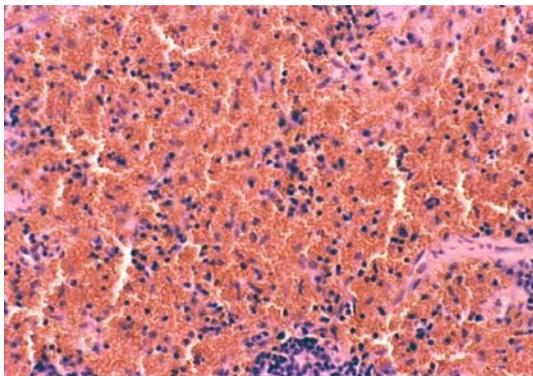


d)

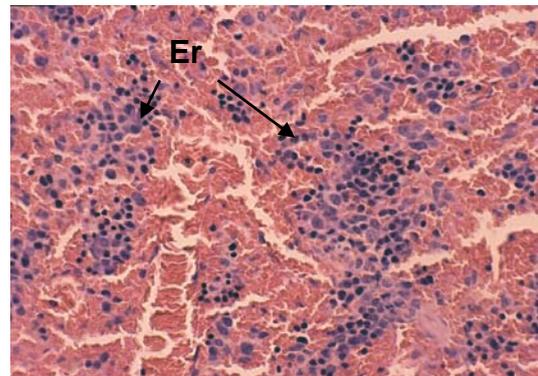
**Patho-histologische Milzveränderungen:** Eine folliculäre Milzhyperplasie tritt bei allen Dosierungsgruppen und der Kontrollgruppe in vergleichbarer Ausprägung gering- bis mittelgradig auf (Grad 2 und 3), es sind keine unterschiedlichen medikamentenabhängigen Wirkungen nachweisbar (Tab. 22,  $p = 0,29$ ). Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der extramedulläre Erythropoiese in der Milz sind mit  $p < 0,0001$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (Tab. 15). Während in der hochdosierten Gruppe Ro 50 7,5 (7,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KM) zwölf Ratten eine mittelgradige (Grad 3) extramedulläre Erythropoiese zeigen, entwickelt sich auch bei 10 Tieren der Gruppe Ro 50 2,5 (2,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KM) eine geringgradige extramedulläre Erythropoiese (Grad 2), und ein Tier dieser Gruppe zeigt eine mittelgradige (Grad 3) extramedulläre Erythropoiese. Bei 2 von 12 Tieren der Gruppe EPO 0,75 wird eine minimale

bzw. geringgradige extramedulläre Erythropoiese (Grad 1 und 2) beobachtet. In der Kontrollgruppe (NaCl) und der Gruppe Ro 50 0,75 wird keine extramedulläre Erythropoiese festgestellt. Die Abb. 50 a) – d) zeigt exemplarisch die verschiedenen Grade der extramedullären Erythropoiese (**Er**) in der Milz, die in Experiment 3 beobachtet werden. Abb. 50 a) stellt normales Milzgewebe dar (Grad 0), in der roten Milzpulpa liegen Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Makrophagen vor. Abb. 50 b) zeigt eine minimale extramedulläre Erythropoiese (**Er**; Grad 1). Die einzelnen Stadien der Vorläuferzellen der Erythrozyten liegen in Nestern zusammen. Grad 2 wird in der Abb. 50 c) dargestellt, neben den erythropoietischen Reihen sind hier auch zwei Megakaryozyten (**M**), Mutterzellen der Thrombozyten, vorhanden. Abb. 50 d) weist eine mittelgradige extramedulläre Erythropoiese (Grad 3) in der kaum noch zu erkennenden roten Milzpulpa auf.

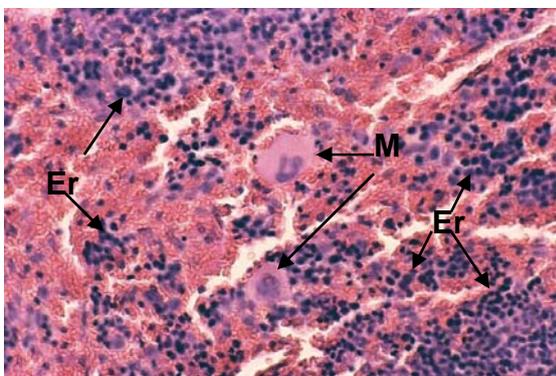
**Abb. 50 a)–d):** Milz, extramedulläre Erythropoiese in Experiment 3: **a)** = Grad 0, **b)** = Grad 1, **c)** = Grad 2, **d)** Grad = 3 (**Er** = extramedulläre Erythropoiese, **M** = Megakaryozyten; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



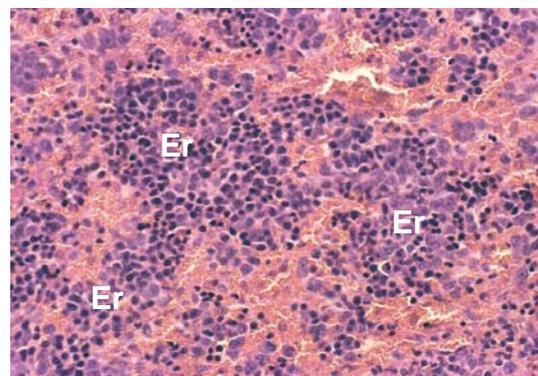
a)



b)



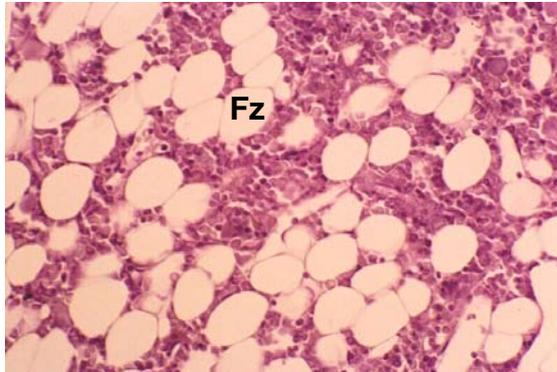
c)



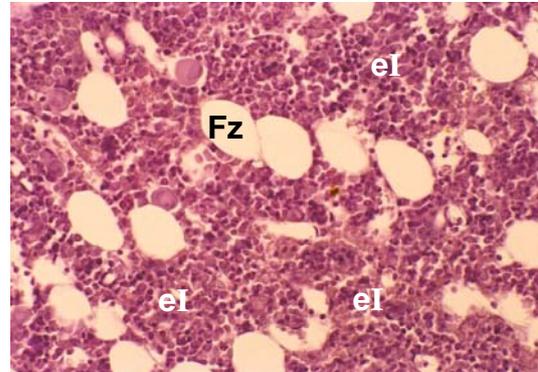
d)

**Patho-histologische Knochenmarkveränderung:** Bei allen Versuchsgruppen kann eine gesteigerte medulläre Erythropoiese im Knochenmark demonstriert werden, die bei den Ro 50-Gruppen dosisabhängig ist (Tab. 22). Die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der medullären Erythropoiese im Knochenmark sind mit  $p < 0,0001$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (Tab. 15). Besonders auffällig ist, dass alle Tiere der hohen Dosis Gruppen Ro 50 2,5 und 7,5 hochgradig (Grad 4) gesteigerte Erythropoiese zeigen. In der Gruppe Ro 50 0,75 zeigten 2 Tiere eine minimal (Grad 1), 7 Tiere eine geringgradig (Grad 2) und 2 Tiere eine mittelgradig (Grad 3) gesteigerte medulläre Erythropoiese. Bei einem Tier der EPO-Gruppe 0,75 kann keine, bei 6 Tieren wird eine minimal, bei 4 Tieren eine geringgradig und bei 2 Tieren eine mittelgradig gesteigerte Erythropoiese festgestellt. In der Kontrollgruppe zeigen 2 Tiere eine minimal und ein Tier eine geringgradig gesteigerte medulläre Erythropoiese. Abb. 51 a)–e) veranschaulichen exemplarisch die medulläre Erythropoiese im Knochenmark der Versuchstiere. In Abb. 51 a) kann der hohe Anteil an Fettzellen (**Fz**) im inaktiven Knochenmark beobachtet werden (Grad 0). Abb. 51 b) illustriert eine minimal gesteigerte medulläre Erythropoiese (Grad 1), bei der sich kleine erythropoietische Inseln (**eI**) bilden und der Anteil der Fettzellen (**Fz**) reduziert ist. Bei der geringgradig gesteigerten Erythropoiese (Abb. 51 c), Grad 2) kommt es zur weiteren Abnahme der Fettzellen und zu einer Zunahme der basophilen erythropoietischen Inseln (**eI**). In Abb. 51 d) hat das aktive Knochenmark die Fettzellen weitgehend verdrängt (Grad 3). Die basophilen Vorläuferzellen der erythropoietischen Reihe liegen dicht aneinandergedrängt. Die hochgradig gesteigerte medulläre Erythropoiese (Grad 4) ist in Abb. 51 e) verdeutlicht. Das gesamte Knochenmark ist von den einzelnen Stadien der erythropoietischen Zellen ausgefüllt, Fettzellen sind nicht mehr vorhanden.

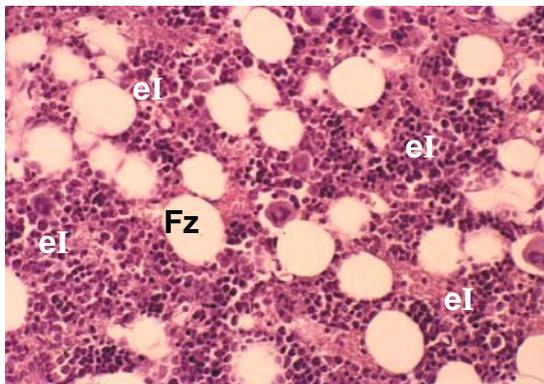
**Abb. 51 a)–e)** Knochenmark, medulläre Erythropoiese in Experiment 3: **a)** = Grad 0, **b)** = Grad 1, **c)** = Grad 2, **d)** = Grad 3, **e)** = Grad 4 (**Fz** = Fettzellen, **eI** = erythropoietischen Inseln; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



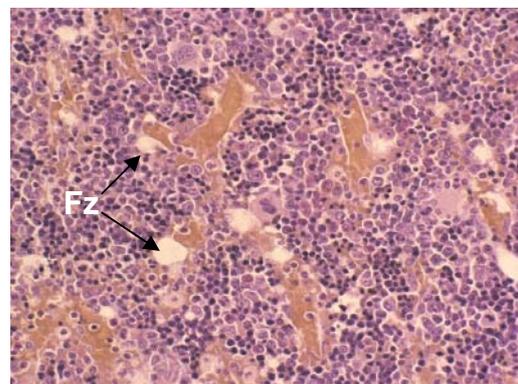
a)



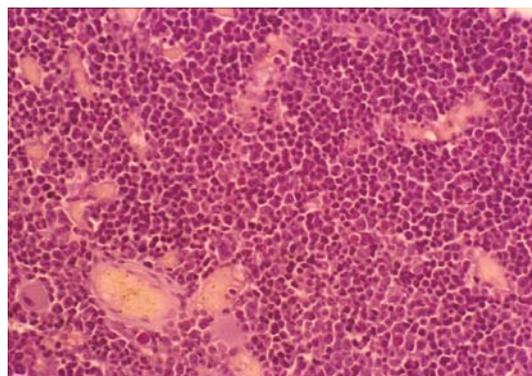
b)



c)



d)

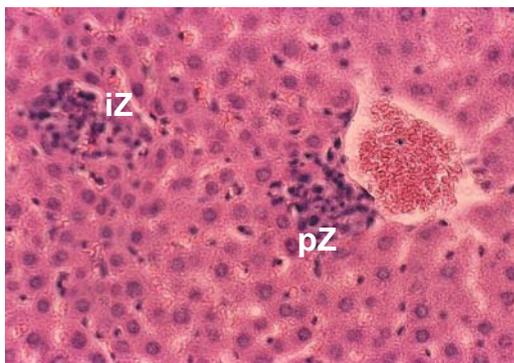


e)

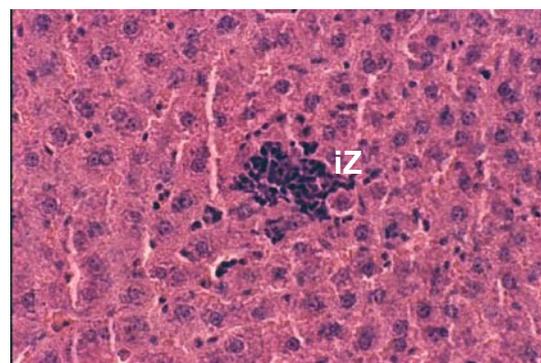
**Patho-histologische Leberveränderungen:** Wie im Experiment 1 und 2 wird auch im dritten Experiment bei allen Tieren minimale bis geringgradige (Grad 1 und 2) interstitielle und perivaskuläre Zellinfiltrate gefunden (Abb. 52 a) und b)). Die zellulären Infiltrate setzen sich aus Lymphozyten, Histiozyten und Plasmazellen zusammen. Bei jeweils einem Tier aus der Kontrollgruppe und der Ro 50-Gruppe 0,75 zeigen sich multiple Granulome (Grad 1-2). Die

Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der perivaskulärer Zellinfiltrate sind mit  $p < 0,0001$  statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test) zwischen den vier betrachtenden Behandlungsgruppen (Tab. 15). Besonders auffällig sind die Gruppen Ro 50 2,5 und 7,5 mit hoher Anzahl von Grad 1 und 2.

**Abb. 52 a) und b):** Perivaskuläres und interstitielles Zellinfiltrat in der Leber in Experiment 3 (**pZ** = perivaskuläres Zellinfiltrat, **iZ** = interstitielles Zellinfiltrat; Färbung HE, Vergrößerung 160×)



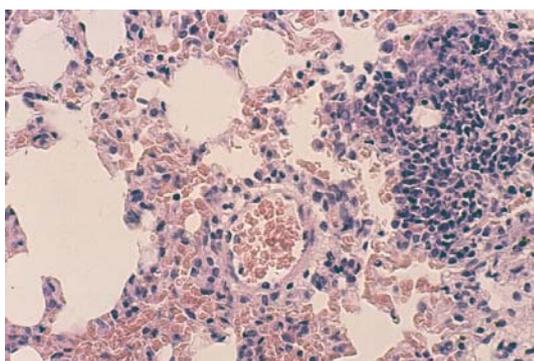
a)



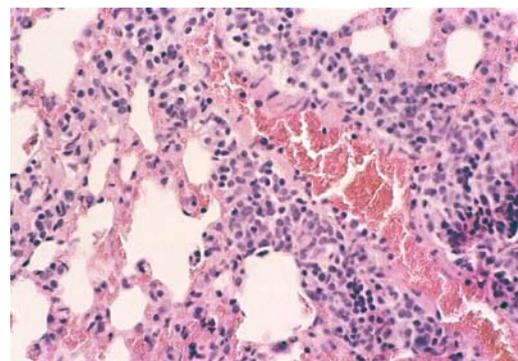
b)

**Patho-histologische Lungenveränderungen:** Sämtliche Tiere zeigen, wie auch in den Experimenten 1 und 2, minimale bis geringgradige interstitielle und perivaskuläre entzündliche Zellinfiltrate in der Lunge (Grad 1 und 2, Abb. 53 a) und b)). Die zellulären Infiltrate setzen sich aus Lymphozyten, Histiocyten und Plasmazellen zusammen. Es sind keine unterschiedlichen medikamentenabhängigen Wirkungen nachweisbar (Tab. 22,  $p = 0,73$  und  $p = 0,089$ ).

**Abb. 53:** Lunge mit a) interstitiellen und b) perivaskulären und Entzündungszellinfiltraten in Experiment 3 (Färbung HE, Vergrößerung 160×)



a)



b)

**Tabelle 22:** In der Inzidenztabelle sind die patho-histologischen Auswertungen der einzelnen Dosierungsgruppen und die Resultate des Kruskal-Wallis Tests (KW-Test; nur Vergleich für die Substanzen EPO und Ro) von Niere, Milz, Knochenmark, Leber und Lunge des Experimentes 3 dargestellt. Die Gruppen sind wie folgt eingeteilt:

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50 0,75	Ro 50 2,5	Ro 50 7,5	EPO 0,75
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	11	12	12	13	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 1	3	2	6	3	1
- Grad 2	5	6	6	8	7
- Grad 3	2	4	-	2	3
- Grad 4	1	-	-	-	1
KW-Test	p = 0,029				
<u>interstitielle Fibrose</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 2	4	3	6	2	3
- Grad 3	4	2	6	10	5
- Grad 4	3	7	-	1	4
KW-Test	p = 0,047				
<u>Tubulusdilataion</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 2	-	-	6	2	-
- Grad 3	3	4	6	10	7
- Grad 4	8	8	-	1	5
KW-Test	p < 0,0001				
<u>Zystenbildung</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>6</u>
- keine (Grad 0)	8	9	9	9	6
- Grad 1	1	1	3	4	1
- Grad 2	2	2	-	-	5
KW-Test	p = 0,27				

Dosierungsgruppe	NaCl	Ro 50	Ro 50	Ro 50	EPO
		0,75	2,5	7,5	0,75
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	11	12	12	13	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>tubuläres Protein</u>	<u>9</u>	<u>11</u>	<u>9</u>	<u>12</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	2	1	3	1	1
- Grad 1	4	3	6	9	4
- Grad 2	2	3	1	2	4
- Grad 3	2	-	2	1	-
- Grad 4	1	5	-	-	3
KW-Test	p = 0,051				
<u>basophile Tubuli</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 1	3	-	-	-	2
- Grad 2	4	6	6	3	4
- Grad 3	2	1	6	9	2
- Grad 4	2	5	-	1	4
KW-Test	p = 0,65				
<u>Glomerulopathie</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	-	-
- Grad 1	3	4	-	1	1
- Grad 2	4	1	5	7	7
- Grad 3	4	4	5	5	2
- Grad 4	-	3	2	-	2
KW-Test	p = 0,21				
<u>Pyelitis</u>	<u>2</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>1</u>
- keine (Grad 0)	9	12	12	13	11
- Grad 2	1	-	-	-	-
- Grad 3	-	-	-	-	1
- Grad 4	1	-	-	-	-
KW-Test	p = 0,38				

Dosierungsgruppe	NaCl	Ro 50	Ro 50	Ro 50	EPO
		0,75	2,5	7,5	0,75
<b>Anzahl untersuchter Nieren:</b>	11	12	12	13	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>Kapselfibrose</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	-	-	1	-
- Grad 1	1	1	1	-	-
- Grad 2	3	1	-	4	2
- Grad 3	4	7	9	7	9
- Grad 4	3	3	2	1	1
KW-Test	p = 0,33				
<b>Anzahl untersuchter Milzen:</b>	11	11	12	13	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>follikuläre Milzhyperplasie</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	1	-	-	-	-
- Grad 2	5	4	6	2	3
- Grad 3	5	7	6	11	9
KW-Test	p = 0,29				
<u>extramedulläre Erythropoiese</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>2</u>
- keine (Grad 0)	11	11	1	1	10
- Grad 1	-	-	-	-	1
- Grad 2	-	-	10	-	1
- Grad 3	-	-	1	12	-
KW-Test	p < 0,0001				
<b>Anzahl untersuchter Knochenmarkpräparate (Femur und Tibia):</b>	11	12	12	12	13
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>gesteigerte Erythropoiese</u>	<u>3</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	8	1	-	-	1
- Grad 1	2	2	-	-	6
- Grad 2	1	7	-	-	4
- Grad 3	-	2	-	-	2
- Grad 4	-	-	12	12	-
KW-Test	p < 0,0001				

<b>Dosierungsgruppe</b>	NaCl	Ro 50	Ro 50	Ro 50	EPO
		0,75	2,5	7,5	0,75
<b>Anzahl untersuchter Lebern:</b>	11	12	12	13	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	<u>9</u>	<u>12</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>11</u>
- keine (Grad 0)	2	-	4	3	1
- Grad 1	8	7	7	7	9
- Grad 2	1	5	1	3	2
KW-Test	p = 0,076				
<u>perivaskuläre Zellinfiltrate</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>11</u>	<u>13</u>	<u>10</u>
- keine (Grad 0)	8	7	1	-	2
- Grad 1	2	5	6	6	10
- Grad 2	1	-	5	7	-
KW-Test	p = 0,0001				
<u>multiple Granulome</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
- keine (Grad 0)	10	11	12	13	12
- Grad 1	-	1	-	-	-
- Grad 3	1	-	-	-	-
KW-Test	p = 0,38				
<b>Anzahl untersuchter Lungen:</b>	11	12	12	13	12
	<b>Anzahl betroffener Tiere:</b>				
<u>interstitielle Zellinfiltrate</u>	<u>11</u>	<u>10</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
- keine (Grad 0)	-	2	2	2	-
- Grad 1	3	2	5	5	6
- Grad 2	8	8	5	6	6
KW-Test	p = 0,73				
<u>perivaskuläre Zellinfiltrate</u>	<u>5</u>	<u>7</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>7</u>
- keine (Grad 0)	6	5	1	1	5
- Grad 1	-	3	5	3	3
- Grad 2	5	4	6	9	4
KW-Test	p = 0,089				

## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, verschiedene neue erythropoietische Wirkstoff-Modifikationen (Ro 50 und MIX) im Vergleich zu dem rekombinanten humanen Erythropoietin im Hinblick auf die Erythropoiese im chronischen Nierenversagen von männlichen Sprague-Dawley-Ratten zu untersuchen. Die Studie wurde in drei Abschnitte unterteilt. Im Experiment 1 wurde die Effektivität der beiden zu testenden EPO-Modifikationen im Vergleich zu EPO und einer Kontrollgruppe bezüglich der Stimulierung der Erythropoiese untersucht. Im Experiment 2 wurden die Wirkung der im Experiment 1 erfolgreicheren EPO-Modifikation im Vergleich zu EPO und einer Kontrollgruppe bei unterschiedlicher Applikationsfrequenz beobachtet. Im Experiment 3 wurde dann eine Dosis-Wirkungskurve für die erfolgreiche EPO-Modifikation aufgestellt und die Entwicklung einer immunologischen Antwort auf die Medikation untersucht. Das Auftreten von Nebenwirkungen wurde in allen 3 Experimenten geprüft. Zur Erzeugung eines chronischen Nierenversagens wurde bei allen Ratten zu Beginn des Versuches das geeignete Tiermodell der fünfsechstel-Nephrektomie durchgeführt [67; 68; 69; 151]. Während der gesamten Zeitspanne eines Versuchs wurden Messungen von relevanten Nieren- und Leberfunktionsparametern, Messungen des Blutdrucks und der Körpermasse vorgenommen. Außerdem wurde im Experiment 3 die Antikörperproduktion gegen die EPO-Modifikation und EPO gesondert untersucht. Die Tiere wurden bei Beendigung der Experimente seziiert und ein Organspektrum wurde histologisch aufgearbeitet.

Die Resultate lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

### 1. Effektivität:

1. Der neue erythropoietische Wirkstoff Ro 50 zeigte anhand der Blutparameter und der statistisch signifikanten Wechselwirkung zwischen Substanz und Zeit eine deutlichere Stimulierung der Erythropoiese als die Mischung modifizierter Moleküle (MIX)
2. Die dreimal wöchentliche Applikation von EPO zeigt eine stärkere Wirkung auf die Erythropoiese als die Einzelgabe der Summe der drei EPO-Dosen pro Woche und als die Ro 50 Dosen unabhängig von deren Applikation. Dagegen konnte in den Ro 50 Gruppen kein Unterschied festgestellt werden zwischen 1-mal wöchentlicher und 3-mal wöchentlicher Applikation.

3. Im Knochenmark der Gruppen Ro 50 und EPO wurde eine substanz- (Experiment 2) und dosisabhängige (Experiment 3) Stimulierung der Erythropoiese beobachtet.
4. In der Milz konnte durch Ro 50 eine dosisabhängige Steigerung der Erythropoiese (Experiment 3) beobachtet werden.

### 2. Antikörperbildung:

5. Es wurde eine statistisch signifikante Antikörperreaktion gegen EPO beobachtet, nicht jedoch gegen Ro 50.

### 3. Nebenwirkungen:

6. In den hochdosierten Gruppen Ro 50 (2,5 und 7,5 µg/kg KM) wurden bei 9 von insgesamt 26 Tieren folgende Symptome beobachtet: Auftreten von Krämpfen (zwei Tiere), partielle Lähmungen der Vorder- und/oder Hinterhand (zwei Tiere), hoher Gewichtsverlust (> 10% bei drei Tieren) und hochgradig verschlechtertes Allgemeinbefinden (zwei Tiere).
7. Bei allen Tieren der höchstdosierten Gruppe Ro 50 (7,5 µg/kg, 1-mal wöchentlich s.c.) wurde Bluthochdruck dokumentiert.
8. Die höchstdosierte Gruppe Ro 50 (7,5 µg/kg, 1-mal wöchentlich s.c.) zeigte nach acht Wochen Behandlung eine reduzierte Körpermassenzunahme von durchschnittlich  $459 \pm 27$  g (0. Woche) auf  $490 \pm 33$  g (8. Woche) im Vergleich zu den restlichen Gruppen, deren Zunahme mehr als durchschnittlich 60 g betrug.
9. Anhand histologischer Untersuchungen von Niere, Leber und Lunge konnten keine einheitlichen substanzabhängigen patho-histologischen Veränderungen zwischen den Gruppen festgestellt werden.

### **Effektivität und Wirkungssteigerung bei verschiedenen neuen erythropoietischen Wirkstoffen:**

Die folgenden Blutparameter wurden zur Untersuchung der Wirkung der Substanzen auf die Erythropoiese verglichen: Hämatokrit, Retikulozytenkonzentrationen, Hämoglobin und Anzahl der roten Blutkörperchen. Alle Parameter bieten nachweislich ein gutes Bild der erythropoietischen Situation bei Anämien, wie sie auch bei chronischen Nierenversagen (fünfsechstel-nephrektomierten Ratten) vorliegt. Um einen adäquaten Vergleich für die Stimulation der Erythropoiese durch die Gabe der neuen erythropoietischen Wirkstoffe zu erlangen, wurde das rekombinante humane Erythropoietin (EPO) mit der empfohlenen Höchstdosierung (150 U/kg/Woche beim Menschen) im Modell des chronischen

Nierenversagens mitgeführt [10]. Diese Dosierung entspricht bei Ratten 0,25 µg/kg KM dreimal wöchentlich (150 U = 0,75 µg Protein). Die Resultate der vorliegenden Studie zeigten, dass Ro 50 in gleicher Dosierung bei fünfsechstel-nephrektomierten männlichen Ratten eine stärkere Stimulation der Erythropoiese bedingt als MIX und als EPO. Dabei wurde Ro 50 und MIX einmal pro Woche subkutan in einer Dosierung von 0,25 und 2,5 µg/kg Körpermasse appliziert und EPO mit 0,25 µg/kg Körpermasse dreimal pro Woche.

Unter der Therapie zeigte die Gruppe EPO über den Zeitraum von vier Wochen einen Anstieg des Hämatokrits von  $43 \pm 3$  % auf  $59 \pm 6$  %, während die hochdosierte Gruppe Ro 50 (2,5 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) einen stärkeren Anstieg des Hämatokrits von  $45 \pm 5$  % auf  $67 \pm 6$  % zeigte. Dabei ist zu beachten, dass Ro 50 im Gegensatz zu EPO (0,25 µg/kg KM, 3-mal pro Woche) nur einmal pro Woche appliziert wurde, jedoch in einer insgesamt ca. 3-fach höheren Dosierung als EPO. In der hochdosierten Gruppe MIX (2,5 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) konnte ein Anstieg des Hämatokrits von  $47 \pm 3$  % auf  $62 \pm 3$  % festgestellt werden. Somit stieg der Hämatokrit in der Gruppe EPO und in der Gruppe MIX um 15 % und in der Gruppe Ro 50 um 22 %. Dieses Resultat demonstriert eine statistisch signifikante höhere Stimulation der Erythropoiese ( $p < 0,05$ ) mit der Testsubstanz Ro 50. Im Gegensatz zu den therapierten Gruppen zeigten die Hämatokritwerte der Kontrollgruppe nur einen sehr leichten Anstieg von  $44 \pm 4$  % auf  $46 \pm 2$  %. Der Ausgangswert von etwa 44 % zeigt, dass bei der Operation offensichtlich nur ein geringer Blutverlust auftrat, da dies ein physiologischer Wert ist.

In der Literatur wurde die Stimulierung der Erythropoiese mit Hilfe von EPO bereits mehrfach untersucht [7; 66; 158]. Bereits 1977 bewiesen Anagnostou et al. die Wirksamkeit von EPO mit Untersuchungen an fünfsechstel-nephrektomierten weiblichen SD-Ratten [7]. In der Studie von Anagnostou et al. zeigte die Gruppe, die über drei Wochen EPO erhielt, einen Anstieg des Hämatokrits von 38 % auf 56 %, während bei der Kontrollgruppe, denen physiologischer Kochsalzlösung appliziert wurde, ein Anstieg des Hämatokrits von 38 % auf 44 % festgestellt wurde. Veränderungen im Bereich der Retikulozyten wurden in dieser Studie nicht untersucht. Der Anstieg des Hämatokrits der mit EPO-behandelten Gruppe korreliert mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie. Der Anstieg um 6 % bei der Kontrollgruppe muß als Normalisierung des sehr niedrigen Ausgangswertes von 38 % angesehen werden, der wahrscheinlich durch einen hohen Blutverlust bei der fünfsechstel-Nephrektomie bedingt wurde.

Im Gegensatz zu der Studie von Anagnostou et al. wurde in der Untersuchung von Van Stone und Max die Wirksamkeit von EPO über zwölf Tage an bilateral nephrektomierten Ratten, die einer Peritonealdialyse unterzogen wurden, nicht bestätigt [158]. Die urämisch gewordenen Tiere zeigten weder unbehandelt noch unter der EPO-Therapie einen Anstieg der Hämatokritwerte. Aufgrund der hier vorliegenden Studie und der empfohlenen Untergrenze (50 U/kg/Woche beim Menschen) ist die Dosierung (2 U/Tag), die in Van Stone und Max's Studie eingesetzt wurde, als zu niedrig zu bewerten. Des Weiteren könnten sowohl Urämie-Toxine, aufgrund einer unzureichenden Peritonealdialyse [41], oder die Bildung von Antikörpern gegen EPO die Erythropoiese gehemmt haben.

In einer Studie von Gretz et al. konnte ein signifikanter Anstieg der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte nach der EPO-Therapie bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten beobachtet werden [66]. In der EPO-Gruppe (6 U/Tag) stieg der Hämatokrit von 38 % auf 44 % (19.-29. Tag). Jedoch wurde am Ende der Untersuchung, nach 33 Tagen, ein Abfall der Werte (Hämatokrit: ~ 40 %) festgestellt. Gretz et al. vermuteten die Bildung von Antikörpern und/oder die Progression des Nierenversagens. Auch in der vorliegenden Studie konnte, im dritten Experiment, über den Zeitraum von zwölf Wochen ein Abfall des Hämatokrits von 43 % auf 38 % in der Gruppe EPO (0,75 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) festgestellt werden. Ursache für den Abfall der Hämatokritwerte nach zwölf Wochen bei der Gruppe, die EPO verabreicht bekam, könnte die Entwicklung einer Immunität gegen EPO mit dadurch nachlassender Stimulation der Proliferation und Differenzierung der erythropoietischen Vorläuferzellen sein. Die Ro 50-Gruppen hingegen zeigten diesen Abfall nicht, hier war über den Zeitraum von acht bzw. zwölf Wochen ein dosisabhängiger Anstieg der Hämatokritwerte zu beobachten: in der niedrig dosierten Gruppe Ro 50 (0,75 µg/kg KM) stieg der Hämatokrit von  $46 \pm 1$  % auf  $63 \pm 7$  %, in der Gruppe Ro 50 2,5 (2,5 µg/kg KM, s.c.) von  $44 \pm 3$  % auf  $78 \pm 4$  % und bei der hochdosierten Gruppe Ro 50 (7,5 µg/kg KM, s.c.) stieg der Hämatokrit von  $45 \pm 3$  % auf  $80 \pm 7$  %. Dieser Befund demonstriert eine effektive substanz- und dosisabhängige Wirkung auf die Stimulation der Erythropoiese, ohne offensichtliche Induzierung immunologischer Vorgänge gegen Ro 50.

Im Gegensatz zu den Hämatokritwerten, zeigen die Retikulozytenkonzentrationen bei der Anwendung von EPO einen früheren Anstieg und können daher zum frühzeitigen Erkennen von Veränderungen während der Therapie von Nutzen sein. In der hier vorliegenden Studie wurden in den nephrektomierten Ratten geringe Retikulozytenkonzentrationen vor dem Start

der Medikation (im Mittel  $\sim 5,4$  %) und bei der Kontrollgruppe während der gesamten Versuchszeit (im Mittel  $\sim 5,5$  %) gemessen. Dies deutet bei diesen fünfsechstenephrektomierten Tieren, die aufgrund der NX-OP einen Erythropoietinmangel haben müssen, auf eine geringe Erythropoiese hin. Alle therapierten EPO-, MIX- und Ro 50-Gruppen zeigten dagegen einen dosisabhängigen Anstieg der Retikulozytenzahl innerhalb der ersten Woche, was auf die Effektivität der Medikationen schließen läßt. Jedoch kam es nach der ersten Woche ( $10,6 \pm 0,8$  %) zu einem stetigen Abfall der Retikulozytenzahl in der Gruppe EPO ( $4,9 \pm 2,3$  in der 4. Woche). Dieser Befund könnte eventuell mit der Bildung von Antikörpern zusammenhängen. Ferner wird auch eine geringe Halbwertszeit von EPO vermutet, bei der es nach der Applikation von EPO nur zu einem kurzfristigen Anstieg der Retikulozyten kommt. Bei zu großen Dosisintervallen bei der Gabe von EPO ergeben die Messungen der Blutparameter einen ansteigenden Hämatokrit mit jedoch abfallenden Retikulozytenwerten. Im Gegensatz zu der Gruppe EPO zeigt die Entwicklung der Retikulozytenwerte der Gruppe Ro 50 im ersten Experiment ( $2,5 \mu\text{g/kgKM}$ , 1-mal wöchentlich s.c.), nach einem Abfall der Werte von  $12,4 \pm 2,2$  % (1. Woche) auf  $7,6 \pm 2,7$  % (2. Woche), ansteigende Werte zum Versuchsende bis auf  $9,3 \pm 1,3$  % in der 4. Woche.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie korrespondieren mit den Resultaten von Maeda und Shiga, die jedoch bei hoher, frequenter i.v. Gabe von EPO einen signifikanten dosisabhängigen Anstieg der Retikulozytenanzahl während der EPO-Therapie beobachteten [111]. Gesunde Sprague-Dawley-Ratten wurden in drei Gruppen unterteilt. Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurde EPO in die Schwanzvene injiziert (täglich  $180 \text{ U/kg}$  und  $1800 \text{ U/kg}$ ). Die Kontrollgruppe zeigte einen Abfall der Retikulozytenwerte von etwa 5 % auf 3 %. Dagegen zeigte die niedrigdosierte EPO-Gruppe (täglich  $180 \text{ U/kg}$ ) zunächst einen Anstieg der Retikulozyten von etwa 5 % auf 8 % in der ersten Woche, dann jedoch einem Abfall der Werte in der zweiten Woche auf 6 %. In der hochdosierte EPO-Gruppe (täglich  $1800 \text{ U/kg}$ ) stiegen die Retikulozytenzahlen von etwa 5 % (0. Woche) auf 16 % (1. Woche) und fielen in der 2. Woche auf 13 %. Auch in dieser Studie wurde demnach ein Abfall der Retikulozytenwerte nach anfänglichem Anstieg beobachtet. Der ähnliche Verlauf der Retikulozytenkonzentration in den beiden Studien könnte sowohl mit einer Sättigung der EPO-R der roten Blutkörperchen als auch mit noch unbekanntem Regulationsmechanismen der Erythropoiese zusammenhängen.

Die Entwicklung des Hämoglobingehaltes sowie die Anzahl der roten Blutkörperchen korrelieren mit dem Verlauf des Hämatokrits. Die Gruppe Ro 50 (2,5 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) zeigten einen Anstieg der Hämoglobinwerte von  $13 \pm 1,4$  g/dl (0. Woche) auf  $20 \pm 1,8$  g/dl (4. Woche), dagegen stiegen die Hämoglobinwerte der Gruppe EPO (0,25 µg/kg KM, 3-mal wöchentlich s.c.) und der Gruppe MIX (2,5 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) lediglich auf  $17 \pm 1,5$  bzw.  $18 \pm 1,0$  g/dl (4. Woche). Die Anzahl der roten Blutkörperchen in der Gruppe Ro 50 (2,5 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) stiegen von  $7 \pm 0,6 \times 10^6/\mu\text{l}$  (0. Woche) auf  $11 \pm 1,0 \times 10^6/\mu\text{l}$  (4. Woche), dagegen stieg die Anzahl der roten Blutkörperchen der Gruppe EPO (0,25 µg/kg KM, 3-mal wöchentlich s.c.) und der Gruppe MIX (2,5 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) nur auf  $9 \pm 0,9 \times 10^6/\mu\text{l}$  (4. Woche). Diese Ergebnisse zeigen eine statistisch signifikant höhere Stimulation der Erythropoese mit der Testsubstanz Ro 50 im Vergleich zu MIX und EPO bei allen gemessenen Blutparametern.

**Prüfung der Applikationsfrequenzen der Substanzen bei s.c. Applikation einmal bzw. dreimal pro Woche:** Sowohl bei einmaliger wie auch bei dreimaliger wöchentlicher subkutaner Applikation wurde eine vergleichbare Effektivität von Ro 50 auf die Erythropoese gefunden. Der Hämatokrit stieg sowohl in der einmal pro Woche therapierten Gruppe Ro 50 (0,75 µg/kg KM, s.c.) als auch in der dreimal wöchentlich therapierten Gruppe Ro 50 (0,25 µg/kg KM, s.c.) um 8 % in der vierten Woche. Diese Ergebnisse demonstrieren über einen Zeitraum von vier Wochen, dass Ro 50 bei einmaliger wöchentlicher subkutaner Injektion (0,75 µg/kg KM, s.c.) die Erythropoese gleichermaßen effektiv stimuliert, wie bei dreimal wöchentlicher Injektion (0,25 µg/kg KM, s.c.). Folglich könnte in Zukunft ein weniger frequentes subkutanes Behandlungsregime mit Ro 50 eingesetzt werden. In der darauffolgenden Langzeitstudie über drei Monate zeigte Ro 50 bei einmaliger Applikation ebenfalls eine deutliche stabile und effektive Stimulation der Erythropoese. Die Resultate der vorliegenden Studie zeigen auch, dass dieser Sachverhalt nicht für EPO zutrifft. Die dreimalige wöchentliche s.c. Gabe (0,25 µg/kg KM, s.c.) von EPO im Experiment 2 war deutlich effektiver (Anstieg um 14 %) als die einmalige s.c. Gabe (0,75 µg/kg KM; s.c., Anstieg um 7 %), also stehen die Ergebnisse im Einklang mit den Anwendungsrichtlinien für den Menschen [10].

Diese Erkenntnisse unterstützen die Entscheidung, Ro 50 effektiv nur einmal wöchentlich zu applizieren. Solch ein verlängertes Dosisintervall könnte einen großen klinischen Vorteil gegenüber EPO bedeuten, denn EPO muß im klinischen Einsatz dreimal wöchentlich

subkutan oder intravenös verabreicht werden. Dabei stellten verschiedene Studien [5; 17; 19; 85; 98; 119; 138] fest, dass eine subkutane Verabreichung von EPO anstatt der zuerst angewandten intravenösen Gabe ausreichen würde, um den Hämatokrit effektiv zu erhöhen. Die Pharmakokinetik bei s.c. Injektion von EPO beim Patienten ist trotz unvollständiger Verfügbarkeit (ca. 20 %) und geringerer Plasmakonzentrationen von EPO im Körper vorteilhafter als bei einer i.v. Applikation [5; 109; 119]. Verschiedene Studien stellten fest, dass die wöchentliche, durchschnittlich benötigte Dosis bei den Patienten, die EPO s.c. verabreicht bekamen bis zu 32 % geringer sein müsste, als bei i.v. Applikation. Denn auch wenn es zu einem geringeren Peak der EPO-Konzentration im Serum nach s.c. Gabe kommt, fällt zum einen die EPO-Konzentration nach i.v. Gabe schnell ab, und zum anderen kann EPO nach s.c. Injektion langsam aus dem subkutanen Raum absorbiert und die Konzentration von EPO so lange Zeit über einem Schwellenwert aufrecht erhalten werden [19; 84; 130]. Ein Vorteil der subkutanen Anwendungsform gegenüber der intravenösen ist die Vermeidung einer wiederholten intravenösen Applikation, die fachgemäße Betreuung verlangt und eine Selbstadministration ausschließt. Die heute üblichen Behandlungsregime bevorzugen eine frequente Administration, da die dreimal wöchentliche s.c. Applikation von EPO effektiver ist als eine einmal wöchentliche s.c. Injektion [10]. Erprobte Dosierungspläne von EPO ordnen sowohl i.v. als auch s.c. therapeutische Injektionen z.B. bei renaler Anämie dreimal wöchentlich an [123]. Nach der vorliegenden Studie könnte Ro 50 ebenfalls s.c. verabreicht werden, es würde jedoch eine Injektion pro Woche ausreichen, um eine Stimulation der Erythropoese zu erzielen im Vergleich zu einer dreimaligen Injektion von EPO.

**Histologische Untersuchungen medullärer Erythropoese:** Eine statistisch signifikante Steigerung der Erythropoese wurde auch histologisch im Knochenmark von Femur und Tibia verifiziert ( $p < 0,0001$ ). In der vorliegenden Studie konnte im Experiment 2 über vier Wochen und im Experiment 3 über zwölf Wochen eine substanzabhängige gesteigerte Erythropoese von EPO histologisch demonstriert werden. Im Vergleich zu der gering- bis mittelgradig gesteigerten Erythropoese der dreimal wöchentlich therapierten EPO-Tiere (0,25 µg/kg KM, s.c., über vier Wochen), zeigten die EPO-Ratten mit einmal wöchentlicher s.c. Gabe (0,75 µg/kg KM, s.c., über vier und zwölf Wochen) nur eine minimal bis geringgradig gesteigerte Erythropoese. Lediglich ein Tier der Gruppe EPO 0,75 (1-mal wöchentlich s.c.) zeigte über den Versuchszeitraum von zwölf Wochen keine gesteigerte medulläre Erythropoese. Dieser Befund bestätigt die Annahme, dass EPO effizienter wirkt, wenn die empfohlene Dosierung in einer Woche verteilt wird, statt diese nur einmal pro Woche zu applizieren. Im Gegensatz

dazu zeigten die histologischen Ergebnisse der mit Ro 50-behandelten Ratten, dass sowohl die einmalige wie auch die dreimalige subkutane Injektion von Ro 50 gleichermaßen effektiv auf die medulläre Erythropoese wirken. Dreimal wöchentlich s.c. (0,25 µg/kg KM, s.c.) verabreicht, führte Ro 50 nach vier Wochen zu einer gering- bis mittelgradig gesteigerten Erythropoese, einmal wöchentlich s.c. (jeweils 0,75 µg/kg KM, s.c.) injiziert zu einer mittel- bis hochgradig gesteigerten Erythropoese (vierwöchige Therapie) und zu einer gering- bis mittelgradig gesteigerten Erythropoese in der zwölfwöchigen Therapie. Die hochdosierten Gruppen Ro 50 (2,5 und 7,5 µg/kg KM, 1-mal wöchentlich s.c.) zeigten eine hochgradig gesteigerte Erythropoese nach acht Wochen Behandlung.

Studien in vitro mit EPO belegen die Stimulation der Erythropoese im Knochenmark [125]. Bereits 1971 untersuchten Mizoguchi et al. in vitro die Knochenmarkantwort auf aus dem menschlichen Urin gewonnenen und weiterverarbeiteten Erythropoietin. Dazu wurden Knochenmarkzellen aus dem Sternum oder dem Darmbeinkamm von neun Patienten mit Knochenmarkdefekt entnommen. Nach Aufbereitung der Zellen und 72stündiger Inkubation mit 0,2 bis 0,4 U/ml EPO zeigten sechs Zellkulturen eine um das vierfache gesteigerte Erythropoese gegenüber der Kontrolle. Jedoch wurde bei drei Zellkulturen keine gesteigerte Erythropoese beobachtet. Für diese Resultate wurde eine nicht adäquate Antwort der Vorläuferzellen auf Erythropoietin verantwortlich gemacht [125]. Die Ergebnisse von Mizoguchi et al. korrelieren mit den hier gemachten Beobachtungen, wobei die Gabe von EPO, mit Ausnahme eines Tieres, zu einer gesteigerten Erythropoese im Knochenmark führte.

Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Studie und der Untersuchung von Mizoguchi et al. [125], konnten Piron et al. an normalen, männlichen Wistar-Ratten nach der EPO Therapie keine gesteigerte Erythropoese im Knochenmark feststellen. In diesem Versuch wurde den Ratten über 20 Tage EPO in einer täglichen Dosierung von 150 U/Tag intravenös verabreicht. Zur Feststellung der Stimulation in der Milz und im Knochenmark wurde nach der Euthanasie aus den Organen eine Einzelzellsuspension zubereitet. Die Resultate der EPO-behandelten Ratten ergaben im Vergleich zu den Kontrolltieren einen Abfall der erythropoietischen Vorläuferzellen im Knochenmark um 50 % [134]. Als Ursache des Abfall wurde ein Knochenmarkdefekt verantwortlich gemacht, denn Piron et al. konnten gegen die erythrozytären Zelllinien weder eine inhibitorische Aktivität noch Antikörper nachweisen.

**Histologische Untersuchungen extramedullärer Erythropoiese:** Die extramedulläre Erythropoiese in der Milz ist laut Kruskal-Wallis Test signifikant. Im vorliegenden Experiment wurde lediglich in der Milz eine Ro 50-induzierte deutliche substanz- und dosisabhängige Stimulation der Erythropoiese beobachtet. In der niedrig dosierten 1-mal pro Woche behandelten Gruppe Ro 50 (0,75 µg/kg KM, s.c.) wurde bei sechs Tieren eine minimale und bei einem Tier eine geringgradige extramedulläre Erythropoiese nur nach der vierwöchigen Versuchszeit beobachtet. Nach zwölf Wochen wurde hingegen keine extramedulläre Erythropoiese in der niedrig dosierten Gruppe Ro 50 (0,75 µg/kg KM, s.c.) festgestellt, jedoch konnte eine geringgradige extramedulläre Erythropoiese in der höherdosierten Gruppe Ro 50 2,5 (2,5 µg/kg) und eine mittelgradige Erythropoiese in der Gruppe Ro 50 7,5 (7,5 µg/kg) beobachtet werden. Die Befunde zeigen eine dosis- und substanzabhängige extramedulläre Erythropoiese in den mit Ro 50-therapierten Gruppen. Jedoch ist eine solche extramedulläre Erythropoiese nur bei kurzer Therapie bei der niedrig dosierten Ro 50-Gruppe zu beobachten. Nach 12 Wochen ist möglicherweise der Organismus bei niedriger Dosierung von Ro 50 so an die Substanz gewöhnt, dass das Knochenmark die gesteigerte Erythrozytenproduktion ausschließlich übernehmen kann und keine extramedulläre Erythropoiese mehr notwendig ist. Dagegen konnte in der Gruppe EPO 0,75 (1-mal wöchentlich s.c.) während der vierwöchigen Versuchszeit lediglich bei einem Tier eine minimale und bei der zwölfwöchigen Versuchszeit bei einem Tier eine minimale und bei einem Tier eine geringgradige extramedulläre Erythropoiese festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu, demonstrierten Piron et al. einen dramatischen Anstieg der erythropoetischen Vorläuferzellen in der Milz von Ratten, die EPO verabreicht bekamen [134]. In der Studie von Piron et al. war vermutlich die Dosierung von EPO so hoch (150 U/Tag, dies entspricht einer Dosierung von 0,75 µg/Tag) gewählt, dass es zu einem starken Anstieg der Vorläuferzellen in der Milz kam.

**Eine EPO-Antikörperbestimmung** wurde in der vorliegenden Studie nur im dritten Experiment nach acht, zehn und zwölf Wochen mittels eines ELISA durchgeführt. In der Gruppe EPO (0,75 µg/kg KM, 1-mal pro Woche s.c.) zeigten neun von vierzehn Tieren eine positive Immunantwort gegen EPO. Bei den antikörperproduzierenden SD-Ratten wurden bis zur zwölften Woche geringere Erythrozytenkonzentration (im Mittel  $\sim 5 \pm 2 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) als bei den Antikörper-negativen Tieren (im Mittel  $\sim 7,5 \pm 2 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) gemessen. Darüber hinaus zeigten die Ak-positiven EPO-Ratten in der 8. Woche geringere Retikulozytenzahlen (im

Mittel  $\sim 0,16 \pm 0,1 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) als die Ak-negativen Tiere (im Mittel  $\sim 0,32 \pm 0,3 \times 10^6/\mu\text{l}$ ), jedoch wurden in der 10. und 12. Woche in der Ak-positiven EPO-Gruppe höhere Retikulozytenzahlen (im Mittel  $\sim 0,25 \pm 0,2 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) gemessen als in den noch verbleibenden drei Ak-negativen EPO-Tieren (im Mittel  $\sim 0,19 \pm 0,04 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Eine Antikörperbildung durch die Verabreichung von humanen Polypeptiden ist bei Tieren häufig beschrieben. Untersuchungen von Kato et al. belegen auch eine Immunantwort von Sprague-Dawley-Ratten bei wiederholter Gabe von EPO: Bei einer Dosierung von  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  KM (1-mal wöchentlich, subkutan) konnte bei allen zehn SD-Ratten dieses Versuches eine maximale Ak-Produktion bereits nach 12 Stunden nach der Injektion festgestellt werden, wobei acht der zehn Ratten eine rasche Elimination des Antigens aus der Zirkulation und die übrigen zwei Ratten eine stabile Ag-Konzentration aufwiesen [84]. Piercy et al. berichteten von zwei Pferden, die während einer EPO-Therapie eine hochgradige Anämie entwickelten, der eine direkte Hemmung der Erythropoiese durch spezifische Ak gegen EPO zu Grunde lag [133]. Konträr zu diesen Beobachtungen, konnten Piron et al. in männlichen Wistar-Ratten während der Dauer des Experiments von 20 Tagen keine Antikörper gegen EPO entdecken [134]. In der zuletzt genannten Studie kann dies mit der kurzen Versuchsdauer von 20 Tagen in Zusammenhang gebracht werden. In der vorliegenden Studie wurde eine signifikante Ak-Produktion gegen EPO ( $p < 0,0001$ ) bei den SD-Ratten nach einer wesentlich längeren Zeit (8, 10 und 12 Wochen) gefunden. Vorher wurden allerdings keine Proben entnommen, so dass die Resultate von Piron et al. mit diesem Versuch nicht bestätigt oder widerlegt werden können.

Die oben aufgeführten Befunde der hier vorliegenden Studie bestätigen die Resultate von Kato et al., dass die Antikörperproduktion biphasisch auf die Pharmakokinetik von EPO wirkt und daher, obwohl es zur Bildung von Antikörpern kommt, eine Stimulation der Erythropoiese noch stattfinden kann [84]. Kato et al. vermuten, dass EPO im Plasma an Ak in der monomeren bzw. dimeren Form gebunden werden kann und dadurch dem Eliminationsmechanismus entkommt, aber auch als Trimer-Immunkomplex vorliegt und dann rasch über die Leber eliminiert wird. Der genaue Mechanismus, wie es trotz der humoralen Immunantwort gegen EPO im Organismus zu einer Stimulation der Erythropoiese kommen kann, bleibt weiterhin ungeklärt. Nemoto et al. diskutieren einen EPO-induzierten Anstieg der Retikulozyten durch deren frühe Produktion und schnelle Freisetzung aus dem Knochenmark [128]. Eine weitere Hypothese besagt, dass sich die Lebenszeit der Retikulozyten aufgrund der EPO-Hemmung verlängert und dies den Anschein erweckt, dass sich die

Retikulozytenanzahl geringfügig vermehrt. Möglich wäre auch, dass EPO vor dem Abbau geschützt ist, da entweder die Antikörper die Fähigkeit verloren haben, EPO zu neutralisieren, oder keine neutralisierenden Ak gebildet werden.

Nur wenige Untersuchungen berichteten auch über Antikörperbildung gegen EPO beim Menschen. Peces et al. wiesen Anti-EPO-IgG-Antikörper unter Verwendung eines ELISA in einem Patientenserum nach. Es wurde gezeigt, dass die IgG dieses 38jährigen Patienten sowohl an Epoetin- $\alpha$  als auch an Epoetin- $\beta$  Moleküle bindet [132]. Ferner wurden bei einem 63 Jahre alten Mann, nach zweijähriger Behandlung mit EPO, Antikörper gegen EPO mit Hilfe des Radioimmuno-Präzipitation-Assays nachgewiesen. Dieser Patient hatte eine EPO-resistente Anämie entwickelt [135]. Die im vorliegenden Experiment offensichtliche Reduzierung der Immunogenität von Ro 50 gegenüber EPO, bedingt durch die chemische Modifikation, könnte weitreichende Vorteile bieten.

In den Ro 50-Gruppen dieser Studie wurde lediglich bei einem Tier der höchstdosierten Gruppe Ro 50 7,5 (7,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KM, s.c.) eine Antikörperproduktion festgestellt. Im Vergleich zeigte dieses einzige Ak-positive Tier der Gruppe Ro 50 7,5 in der 8. Woche eine höhere Erythrozytenkonzentration ( $16,7 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) als die restlichen Tiere seiner Gruppe ( $15,8 \pm 2,2 \times 10^6/\mu\text{l}$ ). Weiterhin wurde in der 8. Woche bei dem Ak-positiven Tier ein niedrigerer absoluter Retikulozytenwert ( $0,9 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) im Vergleich zu den restlichen Tieren seiner Gruppe ( $1,1 \pm 0,1 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) festgestellt. Diese Resultate zeigen, dass die Verabreichung von Ro 50 an Ratten über die gesamte Versuchszeit eine substanz- und dosisabhängige Stimulation der Erythropoiese ohne Erzeugung einer ausgeprägten Immunantwort auf die Substanz bewirkt. Bereits Lee et al. diskutierten 1981, ob diese verminderte Immunogenität auf der Pegylierung beruht [102]. Aufgrund eines PEG-Mantels um das Protein wird eine Reaktion des Proteins mit Immunzellen verhindert. Die Resultate von Lee et al. belegen eine, durch die Proteinmodifizierung mit PEG, aufgehobene IgE Antwort, die vermutlich durch die fehlende Endozytose des Moleküls durch die Makrophagen bedingt ist. Diese Hypothese wird gestützt von der Feststellung, dass die Aktivierung von T-Helferzellen erst möglich ist, wenn das Antigen von den Makrophagen phagozytiert wurde. In der hier vorliegenden Studie konnte der positive Effekt einer Reduzierung der Immunogenität bestätigt werden.

**In der Literatur wird über eine Anzahl von Nebenwirkungen** sowohl beim Menschen [46; 165] als auch bei der Ratte [66] während einer EPO-Therapie berichtet. In den Studien von Eschbach et al. [46] und Winearls et al. [165] werden Thrombenbildungen im arteriovenösen

Shunt, hypertensive Enzephalopathien, Anfallsleiden und gesteigerter Appetit als Nebenwirkungen der EPO-Therapie bei Menschen genannt. Diese Beschreibungen entsprechen den Beobachtungen von Gretz et al. [66], die bei fünfsechstel-nephrektomierten Ratten, denen EPO verabreicht wurde, ein akutes Nierenversagen und Lähmungen festgestellt hatten. Gretz et al. vermuteten, dass die Ursache des akuten Nierenversagens und der Lähmungen Embolien sein könnten [66], da es aufgrund des stark erhöhten Hämatokrits zu einer erhöhten Blutviskosität [110] und zu Erythrozytenaggregation kommen kann. Damit ist die Gefahr einer Thrombose mit anschließender Embolie gegeben. Auch Bor-Kucukatay et al. stellten fest, dass die hämorheologischen Effekte der EPO-Therapie durch den erhöhten Hämatokrit, die steigende Anzahl an Retikulozyten und das veränderte Lebensalter der zirkulierenden Erythrozyten hervorgerufen werden [20]. Jedoch besteht noch Unklarheit über den Umfang und die spezifischen Mechanismen der rheologischen Wirkungen der EPO induzierten Erythropoese, die zu den unerwünschten klinischen Effekten führen.

Im Gegensatz zu diesen beschriebenen Nebenwirkungen bei Tieren und Menschen, konnten Lim et al. während der EPO-Therapie von Patienten mit einer Dosierung von 50 U/kg KM, 100 U/kg KM und 150 U/kg KM bei dreimal wöchentlicher intravenöser Injektion keine Nebenwirkungen beobachten. Sie berichten stattdessen über eine sehr gute Toleranz mit einer Steigerung des Wohlbefindens, des Appetits und der körperlichen Aktivität [103].

In der vorliegenden Studie wurden ähnliche Symptome beobachtet, wie oben für EPO beschrieben: Krämpfe, Lähmungen, verschlechtertes Allgemeinbefinden und gesteigerter Gewichtsverlust. Allerdings wurden die Symptome in der vorliegenden Studie nur bei 7 von 35 Tieren der hochdosierten Gruppen Ro 50 (2,5 µg/kg KM und 7,5 µg/kg KM, s.c.) beobachtet. Die Resultate der Studien von Bor-Kucukatay et al. und Maeda et al. zeigen, dass die Nebenwirkungen der hochdosierten Gruppen Ro 50 mit den rheologischen Veränderungen des Blutes im Zusammenwirken mit dem fortschreitenden Nierenversagen zusammenhängen.

In den Gruppen MIX (0,25 µg/kg KM, s.c.) und EPO (0,25 µg/kg KM, s.c.) wurde kein Tier aufgrund von Krämpfen oder Lähmungen euthanasiert. Es wurden jedoch insgesamt vier Tiere aufgrund erhöhter Harnstoffwerte bei erhöhtem Gewichtsverlust (> 10 %) vorzeitig euthanasiert. Zur Überprüfung der Nierenfunktion wurden die Blutparameter Kreatinin und Harnstoff während der gesamten Versuchszeit gemessen. Die Kreatininwerte zeigten im Experiment 3 bei allen Tieren aller Dosierungsgruppen und der Kontrollgruppe einen Anstieg

von  $0,9 \pm 0,2$  mg/dl (0. Woche) auf etwa  $1,1 \pm 0,8$  mg/dl (8. Woche). Vergleichsweise stieg der Harnstoff bei der Kontrollgruppe nach acht Wochen von  $80 \pm 16$  mg/dl (0. Woche) auf  $89 \pm 17$  mg/dl (8. Woche), in den Gruppen Ro 50 0,75 und 2,5 von  $86 \pm 18$  mg/dl (0. Woche) auf etwa  $104 \pm 30$  mg/dl (8. Woche), in der Gruppe EPO 0,75 von  $80 \pm 19$  mg/dl (0. Woche) auf  $114 \pm 53$  mg/dl (8. Woche) und in der hochdosierten Gruppe Ro 50 7,5 von  $88 \pm 12$  mg/dl (0. Woche) auf  $124 \pm 33$  mg/dl (8. Woche). Bei der in dieser Studie angewandten Operationsmethode (fünfsechstel-Nephrektomie) muß immer damit gerechnet werden, dass einige Tiere vorzeitig in den Zustand der fortschreitenden Niereninsuffizienz mit dekompensierter Retention kommen. Da nicht bei allen Tieren exakt die gleiche Menge Nierenparenchym entfernt wird, ist bei einigen Tieren, denen mehr Gewebe entfernt wurde, schneller das Endstadium Urämie erreicht als bei anderen. Dennoch zeigen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe die Medikationsgruppen eine Verschlechterung der Nierenfunktion.

**Als häufigste Nebenwirkung** kommt es bei 30 % der Human Patienten mit Niereninsuffizienz, die mit EPO behandelt werden, zu einem kompensatorischen Bluthochdruck [55]. Zahlreiche Untersuchungen berichten sowohl beim Menschen als auch bei Tieren über das Auftreten von Bluthochdruck unter EPO-Therapie. In der vorliegenden Untersuchung konnte keine statistisch signifikante Blutdrucksteigerung in den EPO-Gruppen beobachtet werden. Auch der Blutdruckverlauf der Kontrollgruppen und der MIX-Gruppen zeigte weder in der vierwöchigen noch in der zwölfwöchigen Versuchszeit einen signifikanten Anstieg. Die Blutdruckdaten der Ro 50-Gruppen zeigten bei den Tieren mit der Höchstdosierung ( $0,75 \mu\text{g/kg KM}$ ; s.c., 1-mal wöchentlich) nach vier Wochen einen geringen Anstieg von  $136 \pm 8$  mm Hg auf  $143 \pm 12$  mm Hg und über den Zeitraum von zwölf Wochen einen leichten Anstieg von  $142 \pm 12$  mm Hg auf  $150 \pm 12$  mm Hg. In der Gruppe Ro 50 2,5 ( $2,5 \mu\text{g/kg KM}$ , s.c.) konnte keine Erhöhung des Blutdrucks beobachtet werden ( $147 \pm 16$  mm Hg sowohl in der 0. als auch in der 12. Woche). Bei der Gruppe Ro 50 mit der 10-fach höheren Dosierung ( $7,5 \mu\text{g/kg KM}$ , s.c.) wurde dagegen eine deutliche Erhöhung des systolischen Blutdrucks von  $148 \pm 12$  mm Hg auf  $165 \pm 8$  mm Hg festgestellt. Es kann also lediglich in der hochdosierten Ro 50-Gruppe bei einer 10-fach höheren Dosierung von einer Hypertonie gesprochen werden.

In den Untersuchungen von Vaziri et al. und Zhou et al. wurde der Anstieg des Blutdrucks von fünfsechstel-nephrektomierten männlichen SD-Ratten unter der EPO-Therapie bereits nach einer Woche beschrieben [159; 172]. Die Studie von Brochu et al. an fünfsechstel-

nephrektomierten männlichen Wistar-Ratten prüfte verschiedene Endothelin-1-Blocker unter der EPO-Therapie, um die Progression des Bluthochdrucks zu verhindern. Innerhalb von vier Wochen wurde in dieser Studie ein Blutdruckanstieg von 134 mm Hg auf 172 mm Hg durch eine hohe Dosierung von EPO (100 U/kg, subkutan, dreimal wöchentlich) induziert [23]. In einem anderen Experiment, wurde nach der Reduzierung des Nierengewebes bei Ratten, mit anschließendem Teilinfarkt der Niere, ebenfalls von einem Anstieg des Blutdrucks berichtet [106]. Gretz et al. postulieren, dass dieser Anstieg aus einer geringeren Perfusion der am Rande der Infarktzone lokalisierten Glomeruli resultiert. Diese Glomeruli sezernieren vermutlich vasopressorische Substanzen, die einen Blutdruckanstieg bewirken [68]. Lacasse et al. zeigten ebenfalls, dass bei Wistar-Ratten nach einer fünfsechstel-Nephrektomie der Blutdruck von  $119 \pm 10$  mm Hg auf  $151 \pm 5$  mm Hg stieg [94]. Weiterhin illustrierten Muntzel et al., dass chronische subkutane Injektionen von hoch dosiertem EPO (200 U/kg, s.c.) zu einem erhöhten Blutdruck in nicht anämischen, normotensiven Ratten (Wistar-Kyoto-Ratten) und spontan hypertensiven Ratten (SHR-Ratten) führte. Dagegen bewirkte die niedrige Dosierung von EPO (100 U/kg, s.c.) in keinem der beiden Stämme einen Anstieg des Blutdrucks. Die Vermutung lag nahe, dass weder eine Beeinträchtigung der Niere, eine bereits existierende Anämie, noch bestehender Bluthochdruck (SHR-Ratten) eine notwendige Vorbedingung für die Einflußnahme von EPO auf den Blutdruck von Ratten darstellt [127].

**Entwicklung der Körpermasse:** Eine häufig beschriebene Nebenwirkung bei der EPO-Therapie ist der Gewichtsverlust bei Tieren und Menschen. In der vorliegenden Studie zeigten alle Tiere aller Dosierungsgruppen dagegen eine Zunahme der Körpermasse. Diese Zunahme war allerdings unterschiedlich stark. Das durchschnittliche Anfangsgewicht lag bei etwa  $465 \pm 35$  g. Im Experiment 3 wurde bei den Tieren der Gruppen EPO 0,75 und Ro 50 0,75 (0,75 µg/kg KM, s.c.) nach acht Wochen eine Körpermasse von durchschnittlich  $550 \pm 35$  g festgestellt. Die Tiere der Gruppe Ro 50 2,5 (2,5 µg/kg KM, s.c.) wogen im Durchschnitt  $530 \pm 50$  g und die Tiere der Gruppe Ro 50 7,5 (7,5 µg/kg KM, s.c.) wogen durchschnittlich  $490 \pm 33$  g. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten eine Zunahme der Körpermasse auf durchschnittlich  $530 \pm 48$  g. Die Zunahme der Körpermasse kann als Zeichen eines guten Gesundheitszustandes der Tiere gewertet werden. Eine stark verzögerte Zunahme, wie in den hochdosierten Ro 50-Gruppen, dagegen spricht für eine Störung des Allgemeinbefindens. Diese Störung könnte in Zusammenhang mit den vorher beschriebenen Nebenwirkungen, die in der hochdosierten Gruppe Ro 50 beobachtet wurden, stehen.

**Histologische Untersuchungen:** Um eine chronische Niereninsuffizienz zu erzeugen, wurde zu Beginn des Versuches eine fünfsechstel-Nephrektomie durchgeführt. Das Tiermodell der fünfsechstel-Nephrektomie wurde genutzt, um einen vergleichbaren Krankheitsstatus des chronischen Nierenversagens wie beim Menschen auszulösen. Bei dieser Operation wurden ca. 80 % des Nierengewebes entfernt, was nach einer gewissen Zeit zu einer sich verstärkenden Niereninsuffizienz und zu einem Erythropoietinmangel führte. Durch den operativen Eingriff kommt es anfangs aufgrund gesteigerter Belastung des restlichen Nierengewebes zur funktionellen Anpassung. Die dadurch entstehende Erhöhung des glomerulären Drucks und des Blutdurchflusses trägt bei den fünfsechstel-nephrektomierten Tieren zu der fortschreitenden Zerstörung der verbliebenen Glomeruli bei [21], was auch zu einer Veränderung der Nierenparameter im Blut führt. Das morphologische Korrelat der erhöhten Nierenparameter waren eine glomeruläre Sklerose und Tubulusdilatationen mit Abflachen des Tubulusepithels, bis hin zur Zystenbildung. Zusätzlich konnten im Interstitium entzündliche Zellinfiltrate und eine Fibrose beobachtet werden. Seltener wurde eine Pyelitis diagnostiziert. Im ersten und zweiten Experiment der hier vorliegenden Studie konnten über einen Zeitraum von vier Wochen bei allen Gruppen überwiegend minimale bis geringgradige patho-histologische Veränderungen festgestellt werden. Dabei wurde in beiden Experimenten festgestellt, dass die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung der Kapslfibrose statistisch signifikant sind. Besonders auffällig waren die Gruppen Mix 2,5, Ro 50 0,25 und EPO 0,25. Im Vergleich dazu wurden im dritten Experiment über den Zeitraum von bis zu zwölf Wochen minimale bis hochgradige patho-histologische Veränderungen in der Niere beobachtet, jedoch mit einer breiten Streuung bei allen Gruppen. Ausserdem wurde beobachtet, dass die Unterschiede bezüglich der mittleren Ausprägung von interstitiellen Zellinfiltrate, Tubulusdilatationen und interstitieller Fibrose vor allem in den niedrig dosierten Gruppen Ro 50 0,75 und EPO 0,75 statistisch signifikant sind.

Die Resultate der histologischen Untersuchungen von Waldherr und Gretz zeigten, dass sich nach der Durchführung der fünfsechstel-Nephrektomie bei Ratten, eine kompensatorische Hypertrophie des Gewebes und eine Phase der funktionellen Anpassung anschließt. Die histologischen Hauptmerkmale nach der Reduzierung des Nierengewebes korrelieren mit den Resultaten der hier vorliegenden Studie und wurden als fokale und segmentale Glomerulosklerose, tubuläre Atrophie, interstitielle Infiltration von Entzündungszellen, Fibrose und gelegentlichen Gefäßveränderungen wie z.B. subendotheliale Hyalineinlagerungen in den Gefäßwänden charakterisiert. Das Ausmaß dieser

morphologischen Veränderungen in der Studie von Waldherr und Gretz war abhängig von einer beträchtlichen Anzahl von verschiedenen Faktoren, wie vor allem der Menge des entfernten Gewebes, dem Alter der Tiere, dem Blutdruck, von der Art des Futters, dem Geschlecht und dem Stamm der Tiere [160]. Je mehr Gewebe entfernt wurde, je hochgradiger und schneller traten die folgenden histologischen Veränderungen auf. Aufgrund der hohen metabolischen Stoffwechselrate bei jungen Ratten, entstand bei diesen eine stärkere Hypertrophie des Gewebes. Waldherr und Gretz vermuteten, dass auch der Blutdruck das Ausmaß der histologischen Veränderungen beeinflussen könnte. Aber auch der Stamm könnte eine Rolle dabei spielen: Grond et al. beschrieben einen Rattenstamm (PVG/c-Ratten), bei dem sich nach einer unilateralen Nephrektomie keine fokale oder segmentale Glomerulosklerose entwickelte [70]. Im Hinblick auf das Geschlecht wird eine reduzierte Futterraufnahme der Weibchen, mit nachfolgender geringerer Hyperfiltration, als Faktor der geringeren Ausprägung von histologischen Nierenveränderungen nach der Nephrektomie diskutiert [160].

Bellizzi et al. untersuchten an fünfsechstel-nephrektomierten SD-Ratten die strukturellen und funktionellen Effekte unter der chronischen Applikation von EPO (100 U/kg KM, zweimal wöchentlich i.p., über 8 Wochen). Nach Beendigung des Experimentes zeigten sowohl die EPO-Gruppen als auch die Kontrollgruppen (urämische unbehandelte Kontrollen) gleichartige, mittel- bis hochgradige histologische Veränderungen der Niere. Diese beinhalteten: mesangiale Vergrößerung, mesangiale Sklerose, Hyperzellularität im Glomerulum, Verdickung der Bowman'schen Kapsel, Adhäsion der Kapillarschlingen an die Bowman'sche Kapsel, interstitielle Infiltrate und Atrophie und Dilatation der Tubuli [16]. Die Untersuchungen von Bellizzi et al. zeigen auf, dass es im experimentellen chronischen Nierenversagen unter der Therapie mit EPO nicht zum Fortschreiten des Nierenversagens kommt, und korrelieren damit mit den hier vorliegenden Ergebnissen.

**Die Entstehung der follikulären Milzhyperplasie**, die bei allen Tieren aller Gruppen in gering- bis mittelgradigem Ausmaß auftrat, ist als Normalbefund zu werten. In der Literatur wurde die follikuläre Hyperplasie der B-Zellen bei jugendlichen Ratten von Losco als Normalbefund beschrieben, da diese Tiere mit vielen ungewohnten Antigenen in Berührung kommen und darauf mit einer Lymphozytenproliferation reagieren [107]. In dieser Studie waren die SD-Ratten bei ihrer Ankunft etwa 12 Wochen alt, und der Beginn der Medikation begann fünf Wochen nach dem Einzug ins Tierhaus. Die Ratten waren daher zum Zeitpunkt

des Versuchsstartes vier Monate alt, d.h. noch jugendlich. Daher wird bei dem Befund der folliculären Milzhyperplasie der Ratten von einem Normalbefund ausgegangen, zumal der Befund in jeder Gruppe diagnostiziert wurde und der Tierbestand nach den Gesundheitszeugnissen frei von allen heute zu prüfenden rattenspezifischen Infektionserregern ist. Möglich ist jedoch, dass die Milzhyperplasie auch eine Reaktion auf den operativen Eingriff ist. Die Zufuhr von Fremdeiweißen (in diesem Fall in Form des EPO-Proteins) als Ursache der verstärkten immunologischen Reaktion in der Milz ist auszuschließen, da alle Tiere, auch die der Kontrollgruppe, die nie mit EPO oder den EPO-Modifikationen in Kontakt gekommen waren, diese Veränderungen zeigten.

**Bei der patho-histologischen Untersuchung der Leber** wurde bei allen Tieren in allen Gruppen der drei Experimente minimale bis geringgradige, interstitielle und perivaskuläre, hepatische Mikrogranulome festgestellt. Die Verteilung der Veränderungen in den Gruppen tritt so gleichmäßig auf, dass die Resultate als Normalbefund gewertet werden müssen und nicht mit der Therapie von Ro 50 oder EPO in Zusammenhang gebracht werden können. Das Auftreten von perivaskulären und interstitiellen Zellinfiltraten ist in Experiment 2 statistisch signifikant. Besonders auffällig sind die niedrig dosierten Gruppen Ro 50 0,25 und EPO 0,25 mit hoher Anzahl von Grad 2. Im Gegensatz dazu konnte in Experiment 1 keine medikamentenabhängige Wirkung nachgewiesen werden. Im Experiment 3 über 12 Wochen konnte ein statistisch signifikantes Auftreten von perivaskulären Zellinfiltraten festgestellt werden. Besonders auffällig sind hier die hoch dosierten Gruppen Ro 50 2,5 und 7,5 mit hoher Anzahl von Grad 1 und 2. Als Ursache kann hier die Auseinandersetzung des Organismus mit dem operativen Eingriff möglich sein. Desweiteren könnte auch das Einbringen des Hämostyptikumfaser, Tabotamp® (Fa. Johnson & Johnson, Norderstedt), in die Bauchhöhle immunologische Reaktionen auslösen. Die Ursachen infektiöser Genese können jedoch nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Obwohl der Bestand nach den Gesundheitszeugnissen frei von allen heute zu prüfenden rattenspezifischen Infektionserregern ist, ist die Infektion mit einem bis dato noch unbekanntem Erreger theoretisch vorstellbar. Beispielsweise sind ähnliche Veränderungen nach neuesten Veröffentlichungen mit *Helicobacter hepaticus* beschrieben, einer Infektion auf die in diesem Tierbestand noch nicht untersucht wurde [53; 171]. In der Leber von gesunden Labortieren können auch in Abwesenheit von nachweislichen bakteriellen und viralen Infektionen multifokale Entzündungsherde gefunden werden [63; 65]. Spencer et al. stellten fest, dass die zugrunde gegangenen Hepatozyten in diesen Nekrosenherden meistens durch Infiltration von

Makrophagen wie auch von einigen Lymphozyten ersetzt werden [149]. Die umgebenden Hepatozyten zeigten dabei keine patho-histologischen Veränderungen.

**In der vorliegenden Studie zeigten die patho-histologischen Befunde der Lunge** in allen drei Experimenten, übereinstimmend mit den Resultaten der Leber, minimale bis geringgradige, perivaskuläre und interstitielle Zellinfiltrate, die in allen Gruppen regelmäßig vorkamen. Lediglich das Auftreten von interstitiellen Zellinfiltraten ist im Experiment 2 statistisch signifikant. Besonders auffällig ist, dass bei allen Tieren der Gruppe EPO 0,25 interstitielle Zellinfiltrate mit Grad 2 beobachtet wurden. Die Infiltrate bestanden aus Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen. Daher wird vermutet, dass es sich hierbei um Normalbefunde von Labortieren dieses Alters handelt. Ursächlich wird z.B. das Einatmen von gasförmigen, toxischen (Ammoniak) oder partikulären (Futterpartikel) Stoffen und die darauffolgende Auseinandersetzung der Lunge mit diesen Faktoren diskutiert. Aber auch eine infektiöse, vor allem virale, Genese mit noch unbekanntem Erregern ist theoretisch vorstellbar. Greaves und Faccini berichteten, dass trotz der großen Vielfalt an potentiellen entzündlichen Veränderungen, die in der Lunge von Ratten auftreten können, am häufigsten geringfügige Ansammlungen von Lymphozyten um die kleinen Blutgefäße und Atemwege als minimale fokale chronische Entzündung vorkommen [64]. Die Ätiologie dieser Veränderungen ist ungeklärt. Infektiöse Ursachen können nicht ausgeschlossen werden [100]. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass diese als physiologische Abwehr toxischer Stoffe in der Atemluft anzusehen sind.

**Schlußfolgernd** ergeben die Untersuchungen dieser Arbeit folgende Resultate:

1. Der neue erythropoietische Wirkstoff Ro 50 zeigte eine deutlichere Stimulierung der Erythropoiese im Vergleich zu der Mischung verschiedener Moleküle (MIX).
2. Dabei zeigte Ro 50 bei 1-mal wöchentlicher Applikation eine vergleichbar gesteigerte Effektivität wie bei der 3-mal wöchentlichen Applikation.
3. Es wurde eine signifikante Antikörperproduktion gegen EPO beobachtet, nicht jedoch gegen Ro 50.
4. Die längerfristige Behandlung mit EPO als auch mit Ro 50 führt nicht zu einer beschleunigten Verschlechterung des Nierenversagens.
5. Substanzabhängige und toxische Veränderungen können weder mit EPO noch mit Ro 50 beobachtet werden.

6. Die Überdosierung der Medikation führte teilweise zur Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit geringerer Gewichtszunahme, Entstehung von Bluthochdruck sowie Entstehung von Krämpfen und Lähmungen führen.

## 6. Zusammenfassung

Die Ursache der renalen Anämie bei chronischem Nierenversagen beruht in den meisten Fällen auf einem Mangel an Erythropoietin. Zurzeit werden weltweit etwa 300.000 Dialysepatienten, die infolge eines chronischen Nierenversagens an einem absoluten Erythropoietinmangel leiden, mit rekombinantem humanem Erythropoietin (EPO) behandelt. Bei dem heute üblichen Therapieregime wird EPO dreimal wöchentlich subkutan oder intravenös verabreicht. In der Literatur wird immer wieder von Patienten mit einer EPO-resistenten Anämie aufgrund der Antikörperbildung gegen EPO berichtet.

Ziel der vorliegenden Studie war es, verschiedene neue erythropoietische Wirkstoffe (Ro 50 und MIX) im Vergleich zu dem herkömmlichen EPO im Hinblick auf die Erythropoese im chronischen Nierenversagen an der Ratte zu untersuchen. Zudem wurde die Antikörperproduktion gegen diese neue Wirkstoffe und EPO gesondert untersucht.

Die Studie wurde in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Experiment wurde die Effektivität der beiden neuen erythropoietischen Wirkstoffe (Ro 50 und MIX) im Vergleich zu EPO und einer Kontrollgruppe bezüglich der Stimulierung der Erythropoese untersucht. Im zweiten Experiment wurde die Wirkung des im Experiment 1 besseren Wirkstoffes im Vergleich zu EPO und einer Kontrollgruppe bei unterschiedlicher Applikationsfrequenz beobachtet. Im dritten Experiment wurde dann eine Dosis-Wirkungskurve für den neuen erythropoietischen Wirkstoff Ro 50 aufgestellt und die Entwicklung einer immunologischen Antwort auf die Medikation untersucht. Das Auftreten eventueller Nebenwirkungen wurde in allen 3 Experimenten geprüft. Zur Erzeugung eines chronischen Nierenversagens wurde bei allen Ratten zu Beginn des Versuches eine fünfsechstel-Nephrektomie durchgeführt. Während der Versuchszeit wurden Messungen von relevanten Nieren- und Leberfunktionsparametern, des Blutdrucks und der Körpermasse vorgenommen. Die Tiere wurden nach Versuchsende seziiert und ein Organspektrum wurde histologisch aufgearbeitet.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der Wirkstoff Ro 50 eine deutlich bessere Stimulierung der Erythropoese im Vergleich zu der Mischung (MIX) bewirkt. Ro 50 zeigte dabei bei einer einmaligen wöchentlichen subkutanen Applikation eine vergleichbare gesteigerte Effektivität wie bei der dreimaligen wöchentlichen Behandlung, die gewöhnlich bei der EPO-Therapie benötigt wird, um eine ausreichende Stimulierung der Erythropoese zu

erreichen. Darüber hinaus konnte keine Antikörperproduktion und somit eine Reduzierung der Immunogenität bei Ro 50, im Gegensatz zu EPO, aufgrund der Polymeranknüpfung festgestellt werden. Für die Anwendung des Wirkstoffes Ro 50 statt EPO beim Menschen bedeuten diese Ergebnisse, dass die Applikation wesentlich vereinfacht würde und dass die Probleme, die durch die Immunogenität von EPO auftreten (Therapieresistenz durch Antikörper gegen EPO), bei einer Therapie mit Ro 50 nicht erwartet werden müssen.

Die Resultate der histologischen Untersuchung der Nieren zeigen, dass im chronischen Nierenversagen die längerfristige Behandlung sowohl mit EPO als auch mit Ro 50 nicht zu einer beschleunigten Verschlechterung des Nierenversagens führt. Die patho-histologische Untersuchung der übrigen Organe, wie Knochenmark, Milz, Leber und Lunge zeigte keine substanzabhängigen bzw. toxisch bedingten Veränderungen, die mit der Medikation in Verbindung gebracht werden könnten. Die Überdosierung der Medikation (10-fache Dosierung) kann jedoch, so zeigt diese Studie, zur Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit gesteigertem Gewichtsverlust, Entstehung von Bluthochdruck, Krämpfen und Lähmungen führen.

Die Auswertungen der hier vorliegenden Studie zeigen, dass Ro 50 erheblich verbesserte Eigenschaften gegenüber EPO besitzt und eine vielversprechende Neuentwicklung eines erythropoietischen Wirkstoffes ist, mit dem Ziel, die Anämie des chronischen Nierenversagens des Menschen zu therapieren.

## 7. Summary

Renal anemia with chronic renal failure is in most cases based on erythropoietin deficiency. At the moment 300.000 dialysis patients who suffer from an absolute erythropoietin deficiency as a result from chronic renal failure are treated world-wide with a recombinant human erythropoietin. With today's usual method of treatment EPO is given subcutaneously or intravenously three times a week. In literature it is reported again and again about patients with an EPO resistant anemia caused by the development of antibody against EPO.

The aim of the present study was to examine the effect of new erythropoietic agents (Ro 50 and MIX) compared to the conventional EPO with regard to the erythropoiesis with chronic renal failure of the rat. Moreover the production of antibody against these agents and EPO has been investigated separately.

The study has been divided into three sections. In the first experiment the effectiveness of the new erythropoietic agents (Ro 50 and MIX) that had to be tested were examined and compared to EPO and a control group in respect of the stimulation of erythropoiesis. In the second section of the experiment, the effects of these new agents of the first section were observed and compared to EPO and a control group with different application-frequencies. In the third experiment a dosis-effect graph has been established for the new erythropoietic agent Ro 50 and the development of an immune response to the medication has been examined. The occurring of possible side effects has been examined in all three sections. To create a renal failure a five-sixth nephrectomy was carried out with all rats at the beginning of the experiment. During the time of the study the parameters for relevant kidney and liver functions were taken, blood pressure was taken and the body weight was controlled. At the end of the experiment the animals were dissected and an organ spectrum was histologically reconditioned.

The results of this study show that the agent Ro 50 had an obviously better stimulation of the erythropoiesis compared to the other agent (MIX). Ro 50 thereby showed that a subcutaneous application once a week had a comparable higher effectiveness than a treatment three times a week, which is usually needed at an EPO therapy, in order to obtain a sufficient stimulation of the erythropoiesis. Furthermore no production of antibody could be found and therefore a reduction of the immunogenicity against Ro 50 in contrary to EPO could be discovered. For the application of the modification Ro 50 instead EPO with human beings these results mean

that the application can be simplified considerably and that the problems, which occur by the immunogenicity of EPO (resistance to treatment through antibodies against EPO) are not to be expected by a therapy with Ro 50.

The results of the histological examination of the kidneys show that in case of chronic renal failure the long-term treatment with EPO as well as with Ro 50 does not cause an accelerated worsening of renal failure. The patho-histological examination of the other organs like bone marrow, spleen, liver and lungs did not show any alteration caused by a substance or toxicity which could be connected to the medication. An overdose of the medication (10 times doses) can however, as the study shows, cause a worsening of the general condition with an increased loss of weight, high blood pressure, spasms and paralysis.

To summarize, the analysis of the present study shows that the new erythropoietic agent Ro 50 has far better characteristics compared to EPO in order to treat anemia with chronic renal failure of the human being.

## 8. Anhang

### Verwendete Lösungen

#### - 4 % gepuffertes Formaldehyd:

1. PBS-Stammlösung:

40 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

66 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

ad 1 liter aqua dest.

2. 100 ml PBS Stammlösung

100 ml 37 % Formaldehyd

ad 1 l Aqua dest. hinzugeben, gut mischen und pH 7.4 einstellen

#### - Entkalkungslösung:

250 ml 98 % Ameisensäure

250 ml 35 % Formaldehyd

4500 ml Aqua dest.

#### - 2 % Paraformaldehyd (PFA):

1. 20 g PFA in 40 ml Aqua dest. Bei ca. 60 °C auf Magnet-Heizplatte solange rühren, bis die Lösung klar ist.

2. 100 ml PBS-Stammlösung zugeben und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

3. Lösung filtrieren

#### - Saccharose 18 %:

180 g D(+)-Saccharose in 1000 ml PBS-gebrauchsfertig lösen.

Lösung wurde, wenn nicht am gleichen Tag verbraucht, bei -20 °C gelagert

#### - Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung):

1. saures Hämalaun nach Mayer:

1g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodatin, 50 g Kalialaun in 1 l Aqua dest. Lösen. Dazu noch 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalline Zitronensäure geben und vor Gebrauch filtrieren

2. 1% wässriges Eosin G

## Verwendete Geräte

- Sphygmanometer (Fa. Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten)
- Blutanalysegerät Cell-Dyn 3500 (Fa. Abbott, Wiesbaden)
- Flowzytometer EPICS XL-MCL (Fa. Coulter Electronics, Krefeld)
- Hitachi Automatic Analyzer (Fa. Roche, Mannheim)
- Waage (Fa. Kern, Balingen-Frommen)
- Trennbandsäge (Fa. Exakt, Norderstedt)
- Mikroskop Olympus BH-2 (Fa. Olympus, Hamburg)
- Taumel-Rollenmischer (Fa. Contraves, Northampton, UK)
- Rotationsschüttler
- Zentrifuge

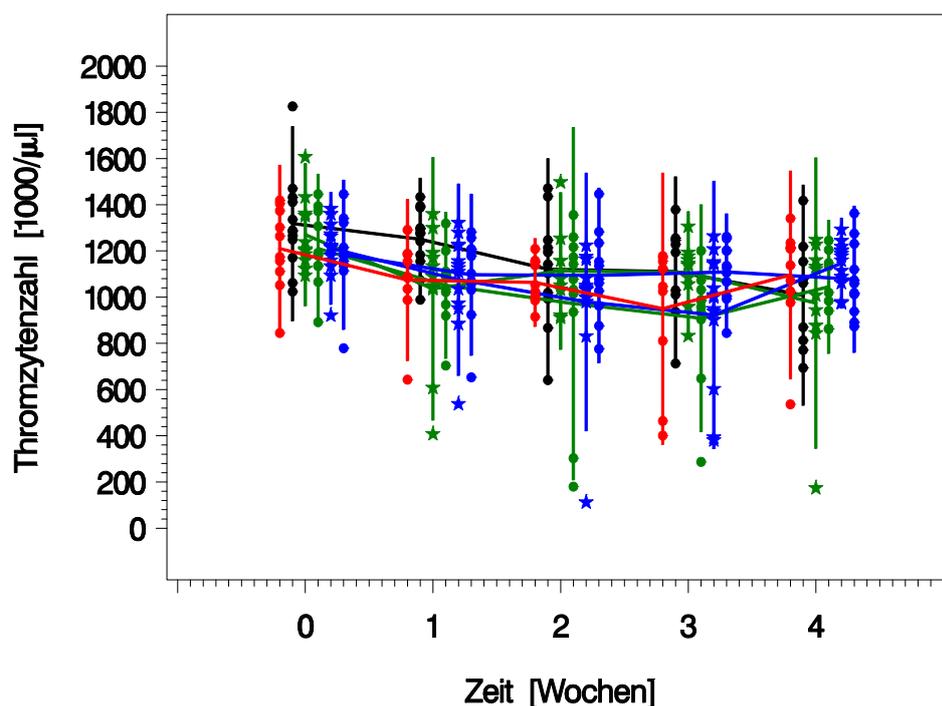
## Experiment 1

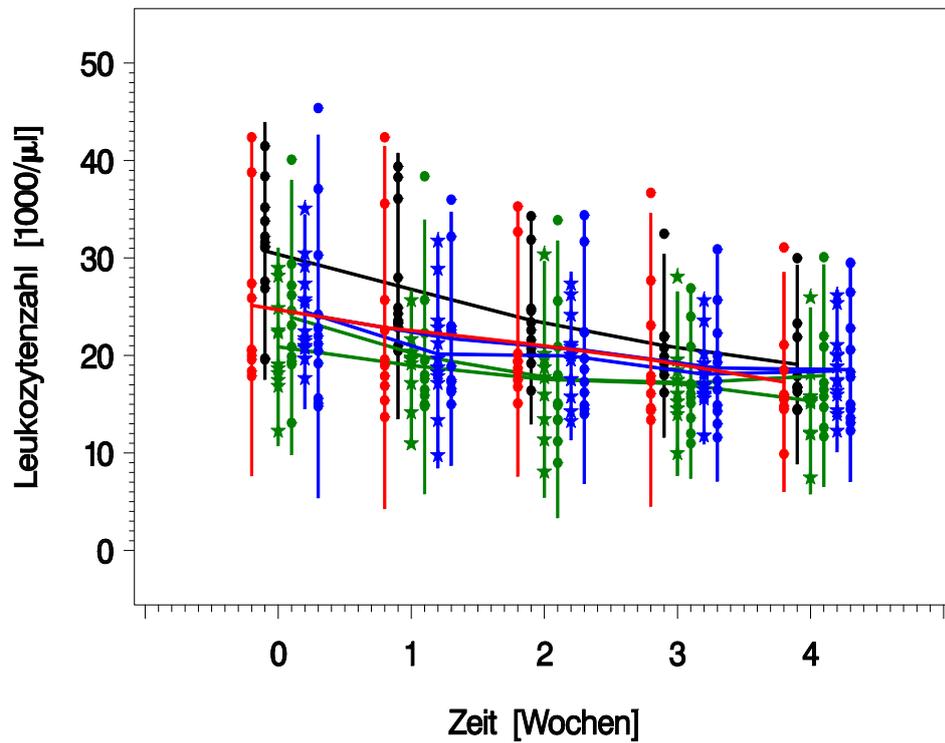
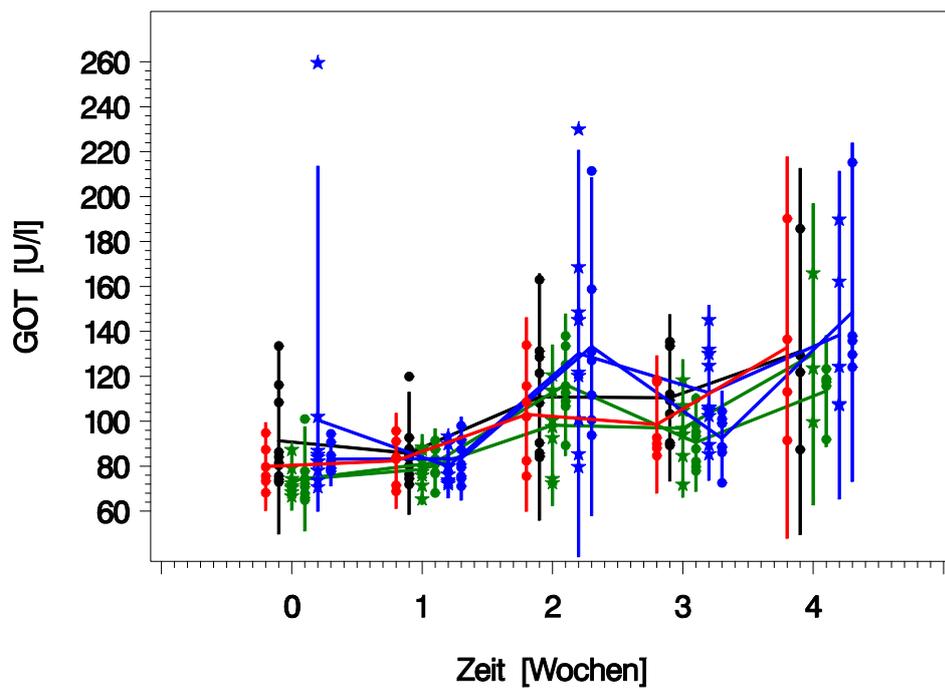
Im Experiment 1 zeigten alle nachfolgenden Parameter keine deutlichen Veränderungen: Thrombozytenzahl (Abb. 54), Leukozytenzahl (Abb. 55), GOT (Abb. 56), GPT (Abb. 57), AP (Abb. 58), Cholesterin (Abb. 59), Triglyzeride (Abb. 60), Phosphatkonzentration (Abb. 61), Harnstoff (Abb. 62), Proteinkonzentration (Abb. 63) und die Glukosekonzentration (Abb. 64). Für die Abbildungen 54 – 64 gilt die folgende Legende:

Medikation:

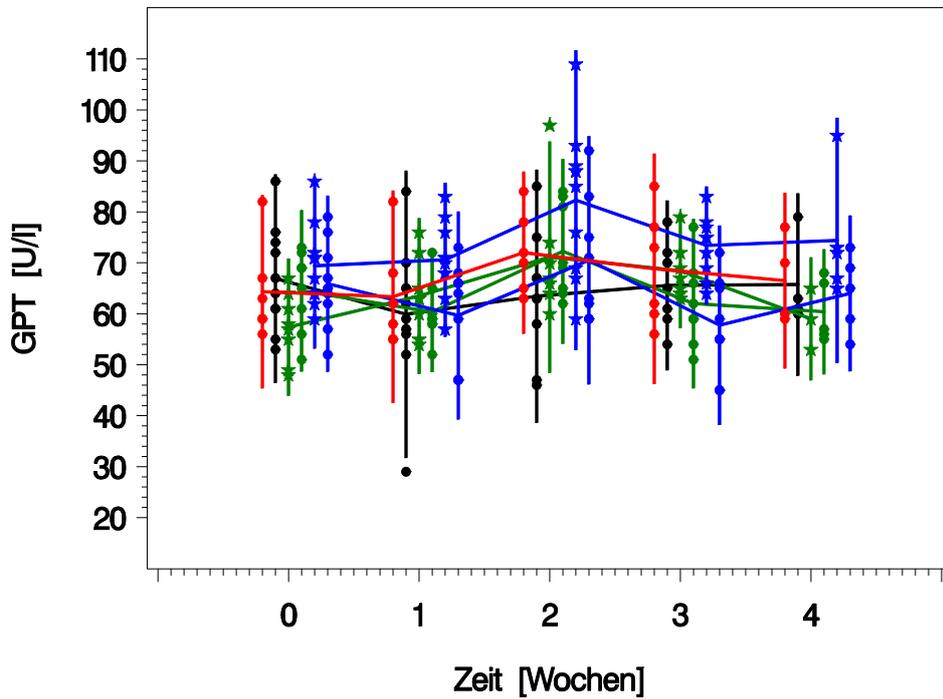
●—●	EPO_0,25	★—★	MIX_0,25
●—●	MIX_2,5	★—★	Ro 50_0,25
●—●	Ro 50_2,5	●—●	NaCl

**Abb. 54:** Entwicklung der Thrombozytenzahl in Experiment 1 (Legende s. oben)

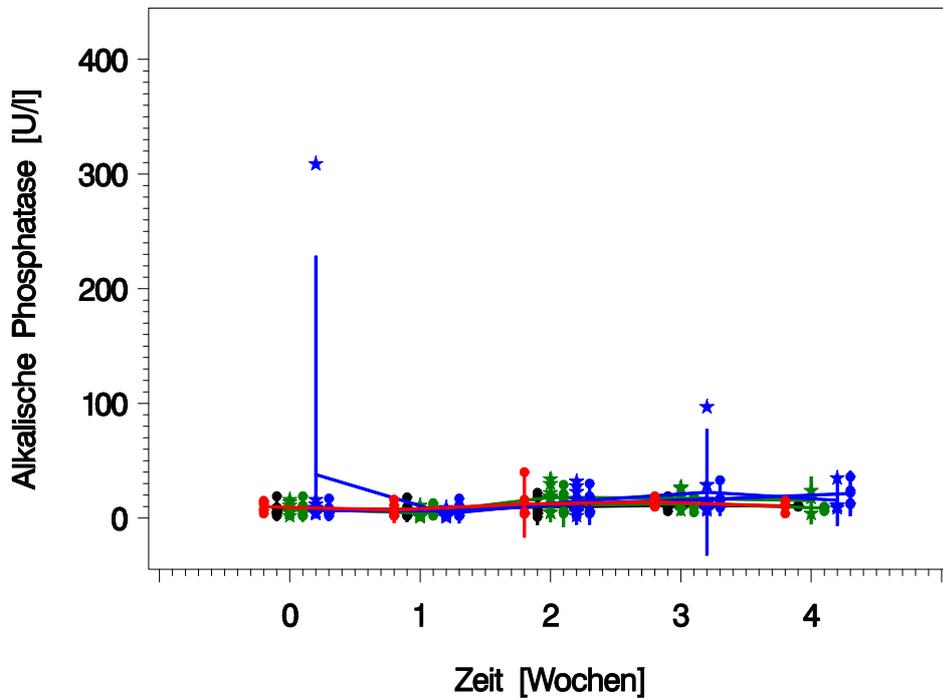


**Abb. 55:** Entwicklung der Leukozytenzahl in Experiment 1 (Legende s. S. 120)**Abb. 56:** Entwicklung der Glutamat-oxalazetat-transaminase (GOT) in Experiment 1 (Legende s. S. 120)

**Abb. 57:** Entwicklung der Glutamat-pyruvat-transaminase (GPT) in Experiment 1 (Legende s. S. 120)



**Abb. 58:** Entwicklung der Alkalischen Phosphatase in Experiment 1 (Legende s. S. 120)



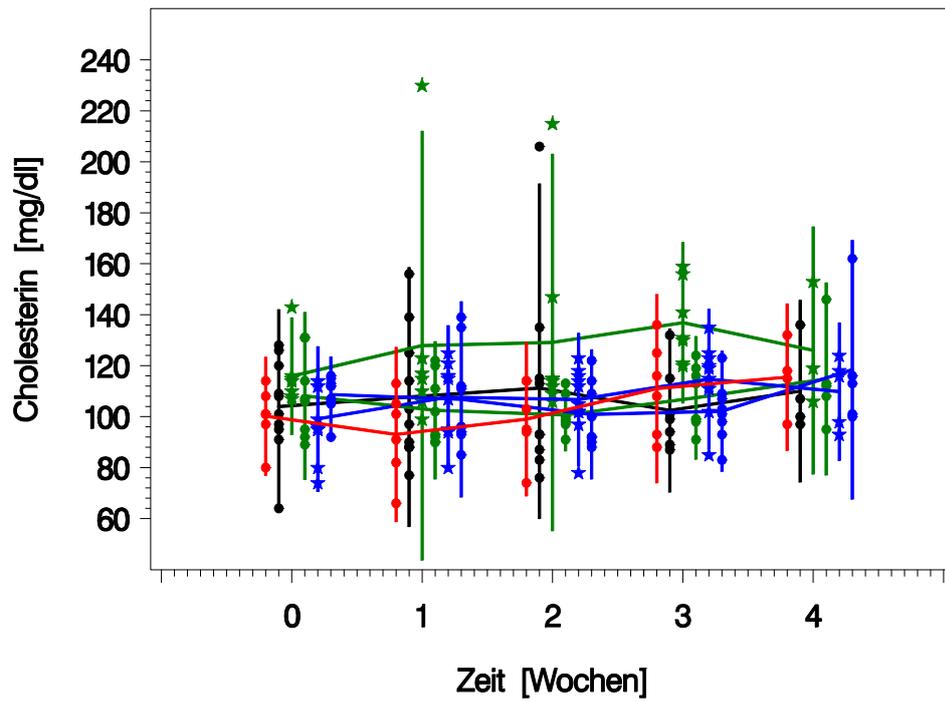
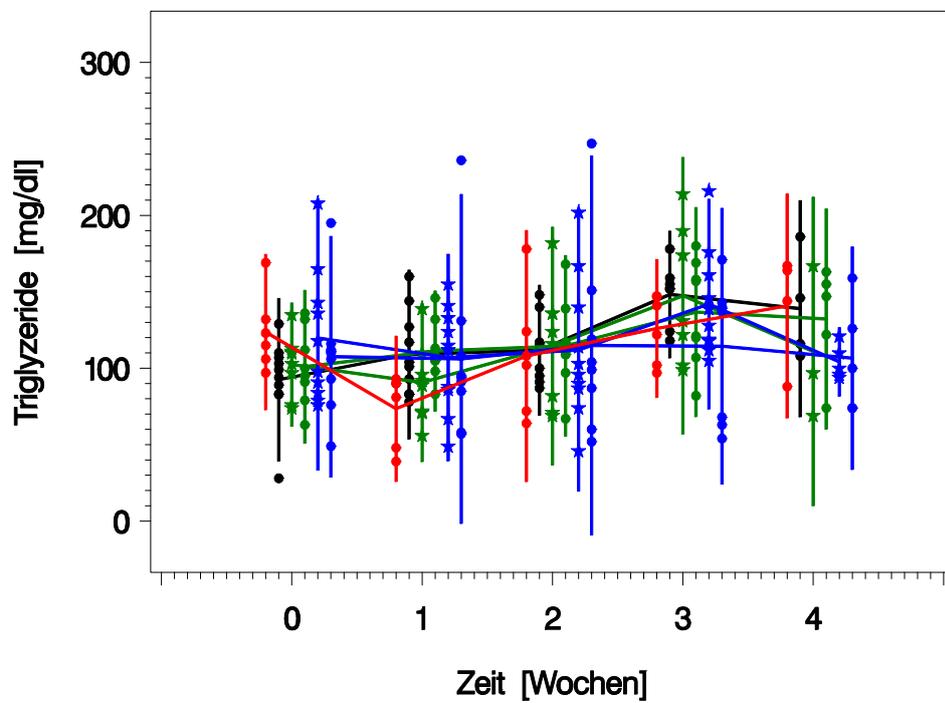
**Abb. 59:** Entwicklung der Cholesterinkonzentration in Experiment 1 (Legende s. S. 120)**Abb. 60:** Entwicklung der Triglyzeridkonzentration in Experiment 1 (Legende s. S. 120)

Abb. 61: Entwicklung der Phosphatkonzentration in Experiment 1 (Legende s. S. 120)

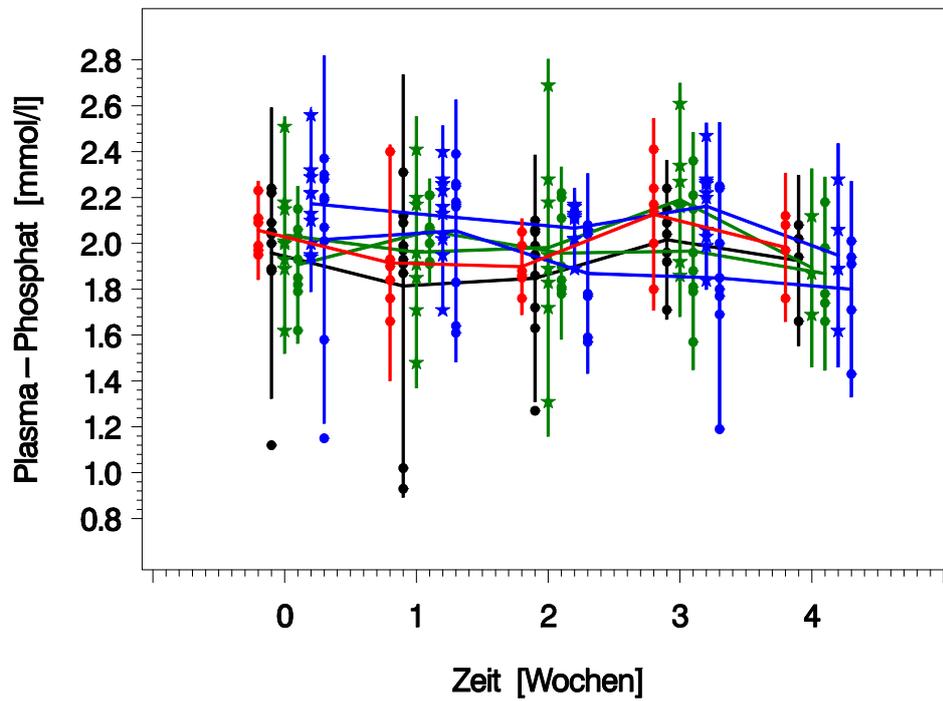
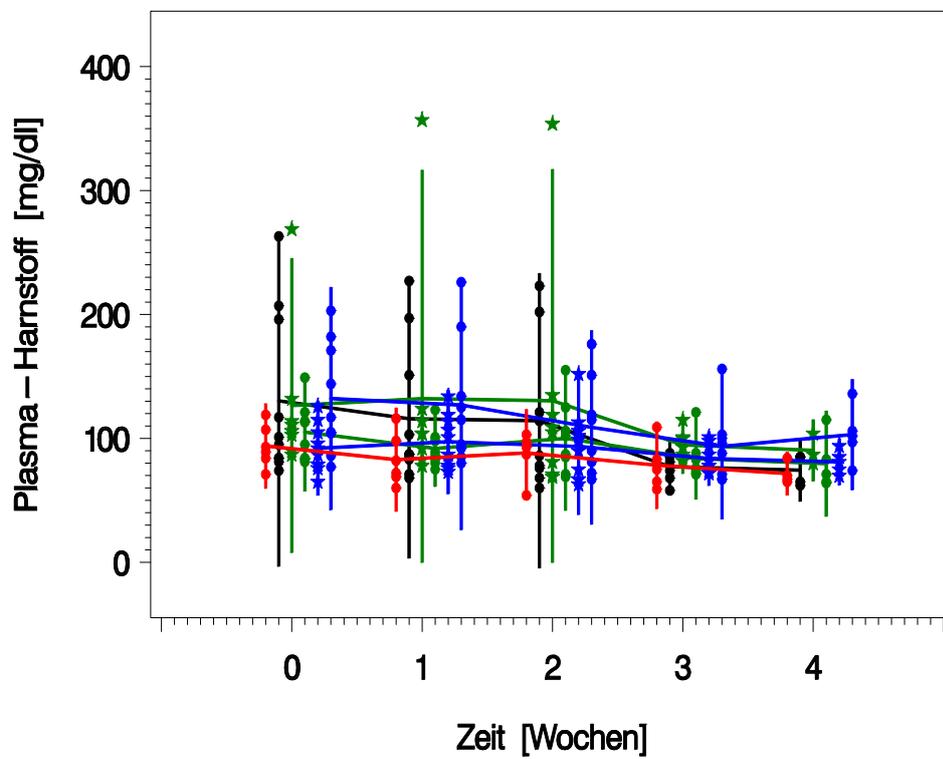
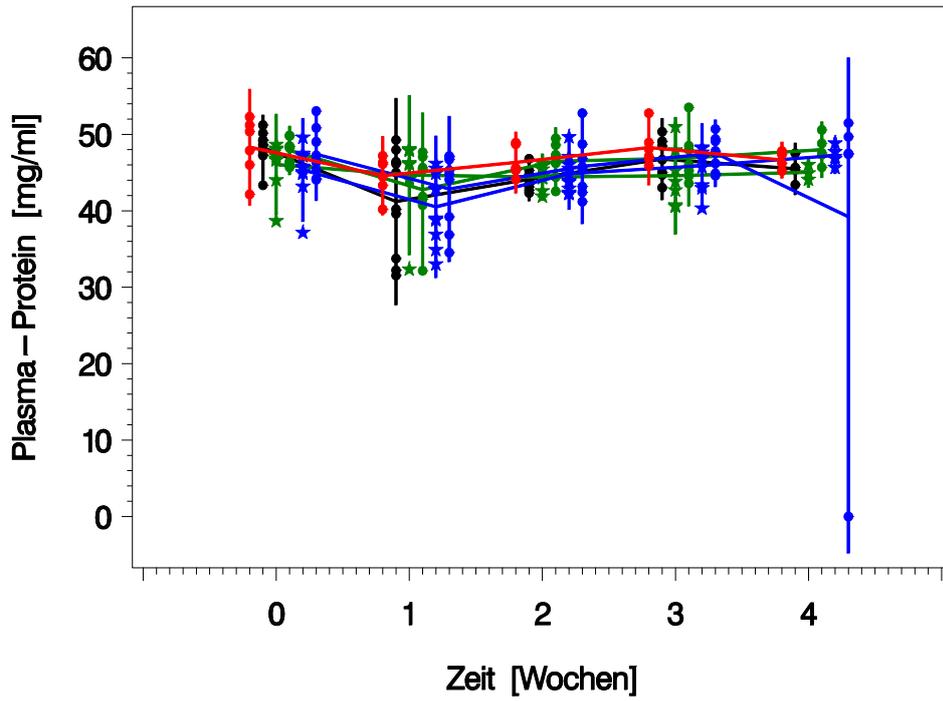
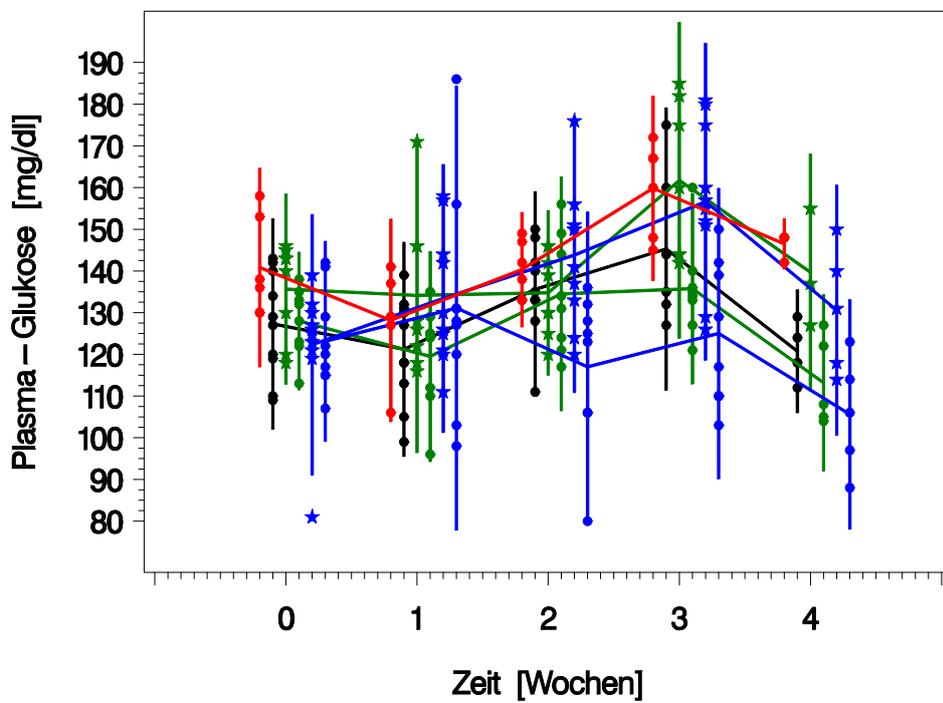


Abb. 62: Entwicklung der Harnstoffkonzentration in Experiment 1 (Legende s. S. 120)



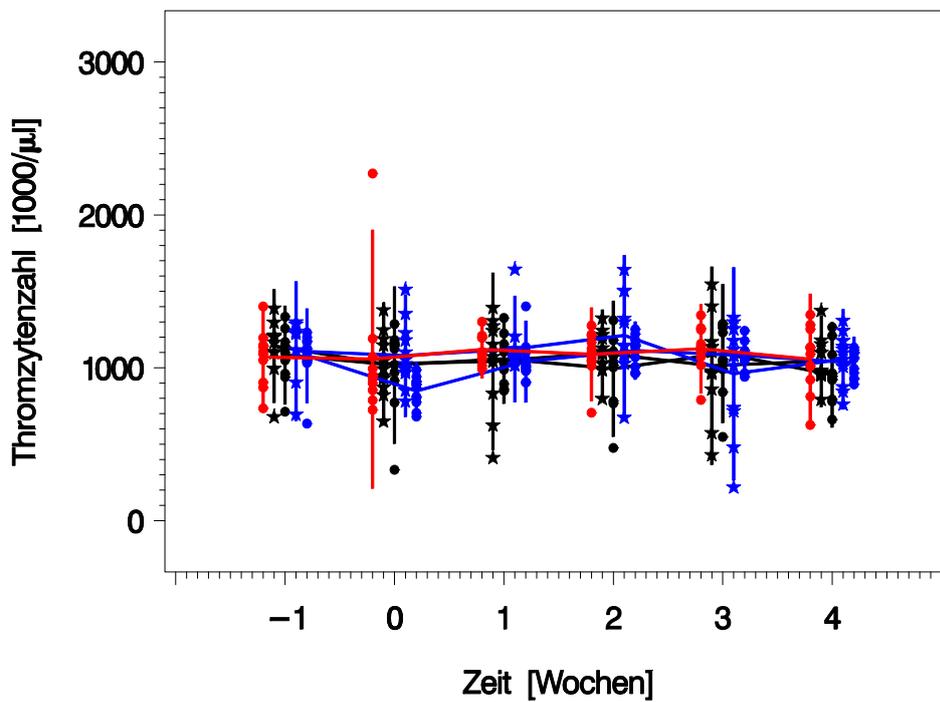
**Abb. 63:** Entwicklung der Proteinkonzentration in Experiment 1 (Legende s. S. 120)**Abb. 64:** Entwicklung der Glukosekonzentration in Experiment 1 (Legende s. S. 120)

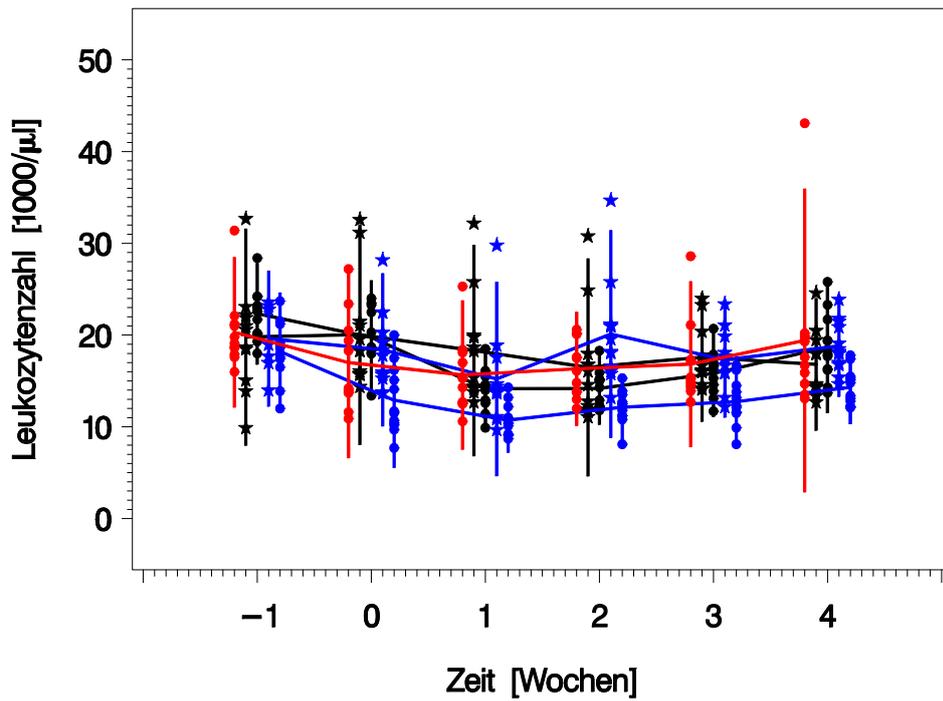
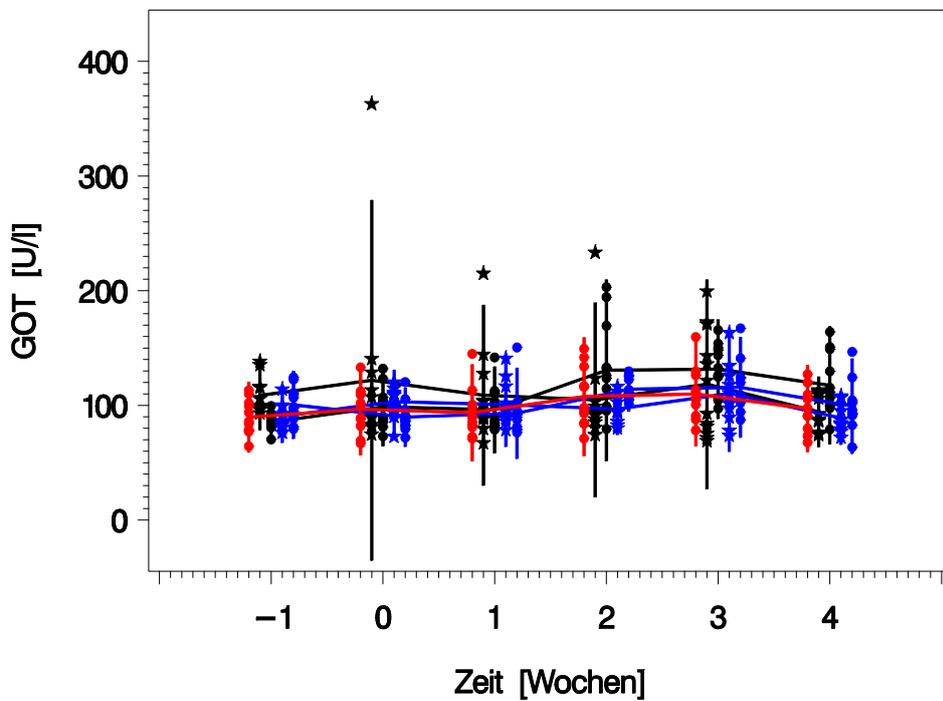
## Experiment 2

Im Experiment 2 zeigten alle nachfolgenden Parameter keine deutlichen Veränderungen: Thrombozytenzahl (Abb. 65), Leukozytenzahl (Abb. 66), GOT (Abb. 67), GPT (Abb. 68), AP (Abb. 69), Cholesterin (Abb. 70), Triglyzeride (Abb. 71), Phosphatkonzentration (Abb. 72), Harnstoff (Abb. 73), Proteinkonzentration (Abb. 74) und die Glukosekonzentration (Abb. 75). Für die Abbildungen 65 – 75 gilt die folgende Legende:

Medikation:      ★—★—★ EPO\_0,25      ●—●—● EPO\_0,75  
                     ★—★—★ Ro 50\_0,25      ●—●—● Ro 50\_0,75  
                     ●—●—● NaCl

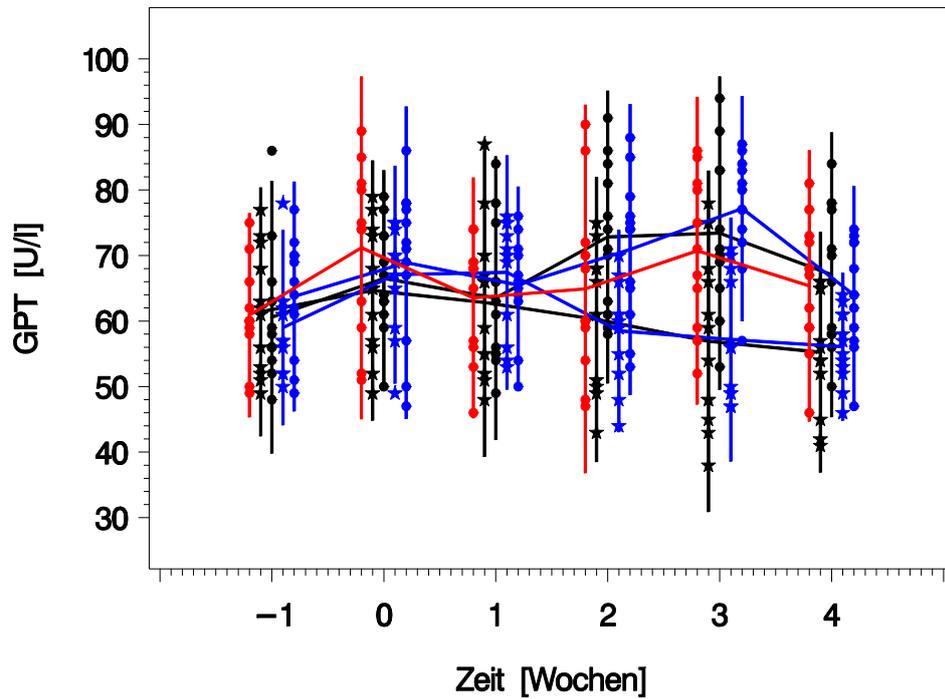
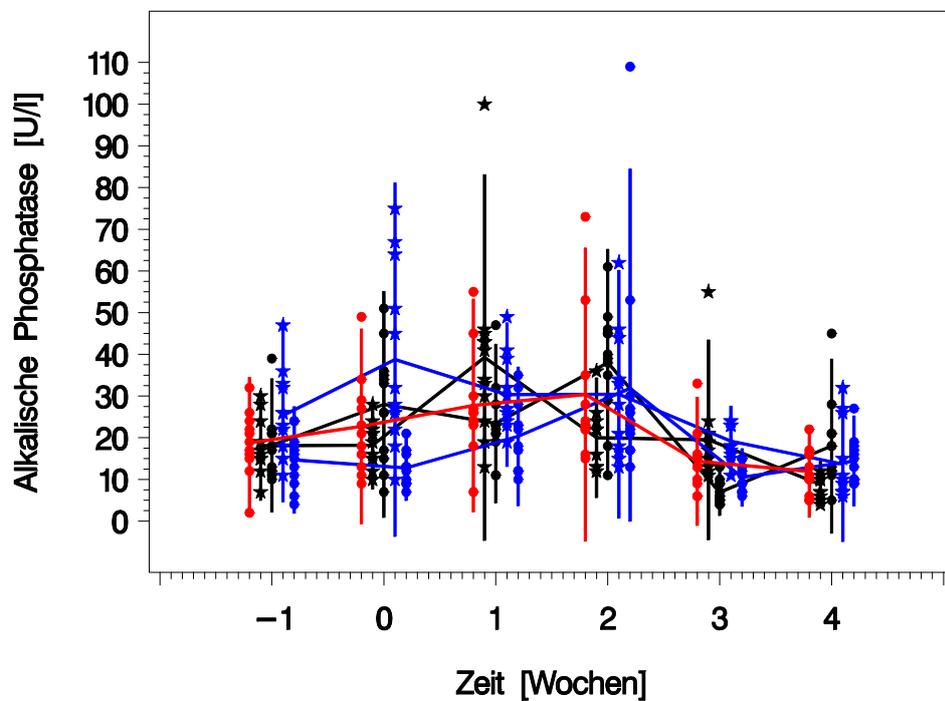
Abb. 65: Entwicklung der Thrombozytenzahl in Experiment 2 (Legende s. oben)



**Abb. 66:** Entwicklung der Leukozytenzahl in Experiment 2 (Legende s. S. 126)**Abb. 67:** Entwicklung der Glutamat-oxalazetat-transaminase (GOT) in Experiment 2 (Legende s. S. 126)

**Abb. 68:** Entwicklung der Glutamat-pyruvat-transaminase (GPT) in Experiment 2

(Legende s. S. 126)

**Abb. 69:** Entwicklung der Alkalischen Phosphatase in Experiment 2 (Legende s. S. 126)

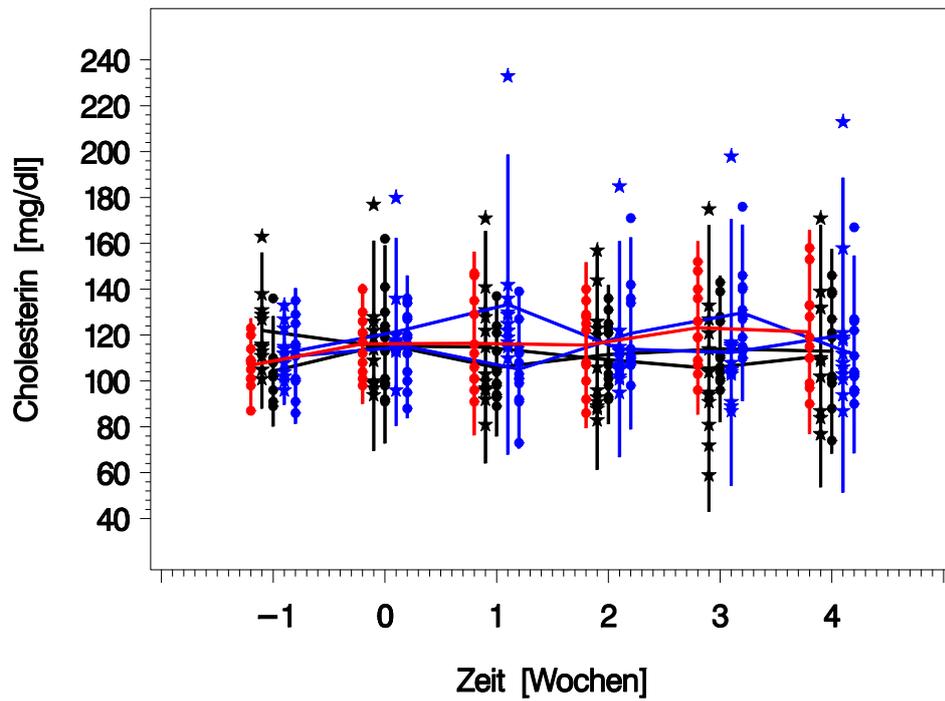
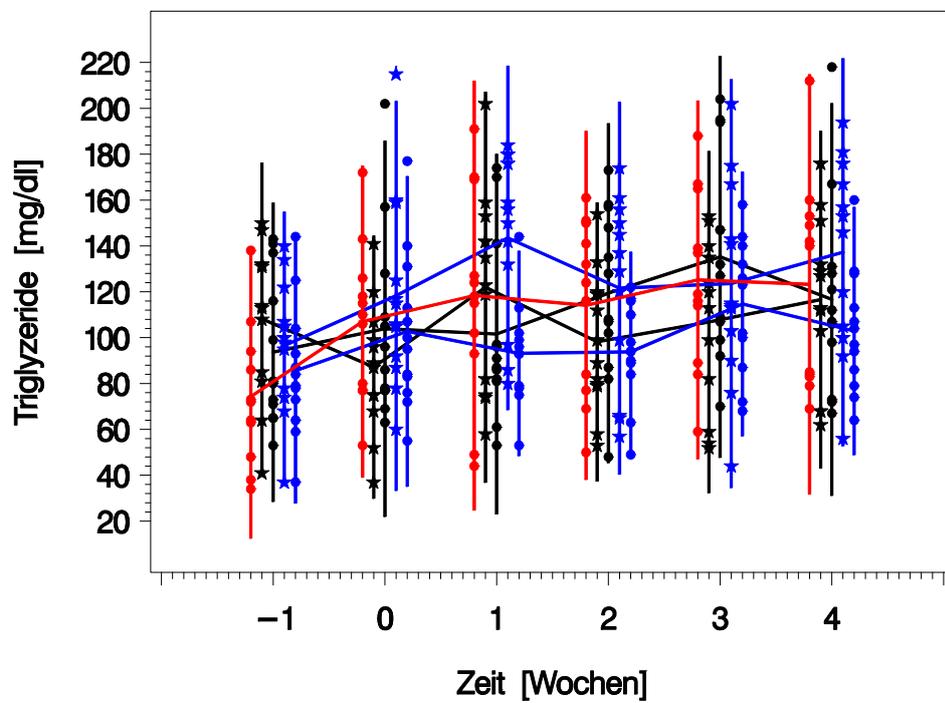
**Abb. 70:** Entwicklung der Cholesterinkonzentration in Experiment 2 (Legende s. S. 126)**Abb. 71:** Entwicklung der Triglyzeridkonzentration in Experiment 2 (Legende s. S. 126)

Abb. 72: Entwicklung der Phosphatkonzentration in Experiment 2 (Legende s. S. 126)

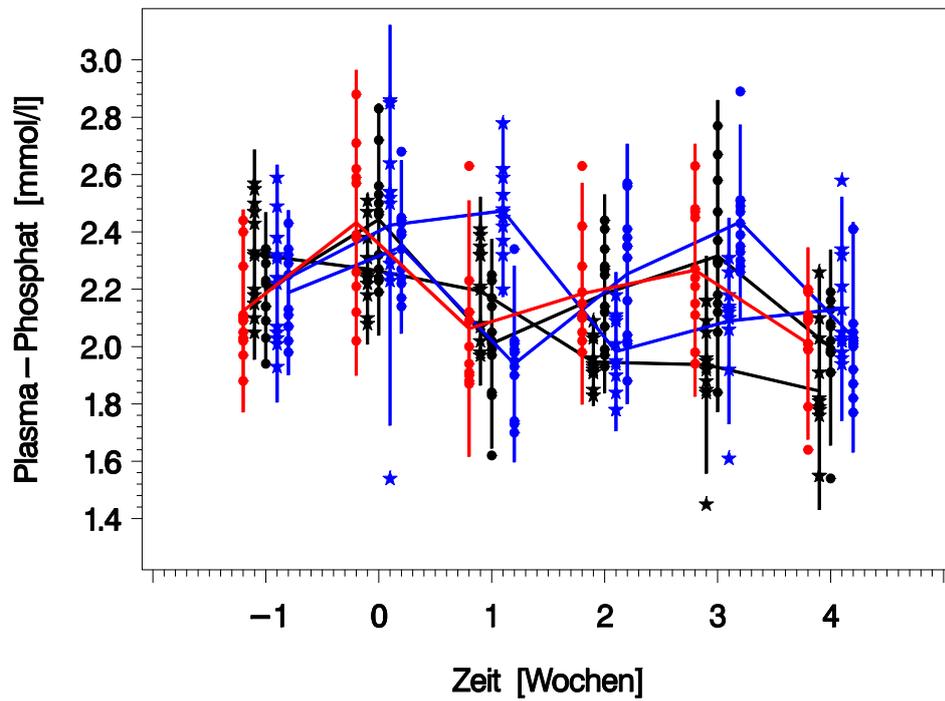


Abb. 73: Entwicklung der Harnstoffkonzentration in Experiment 2 (Legende s. S. 126)

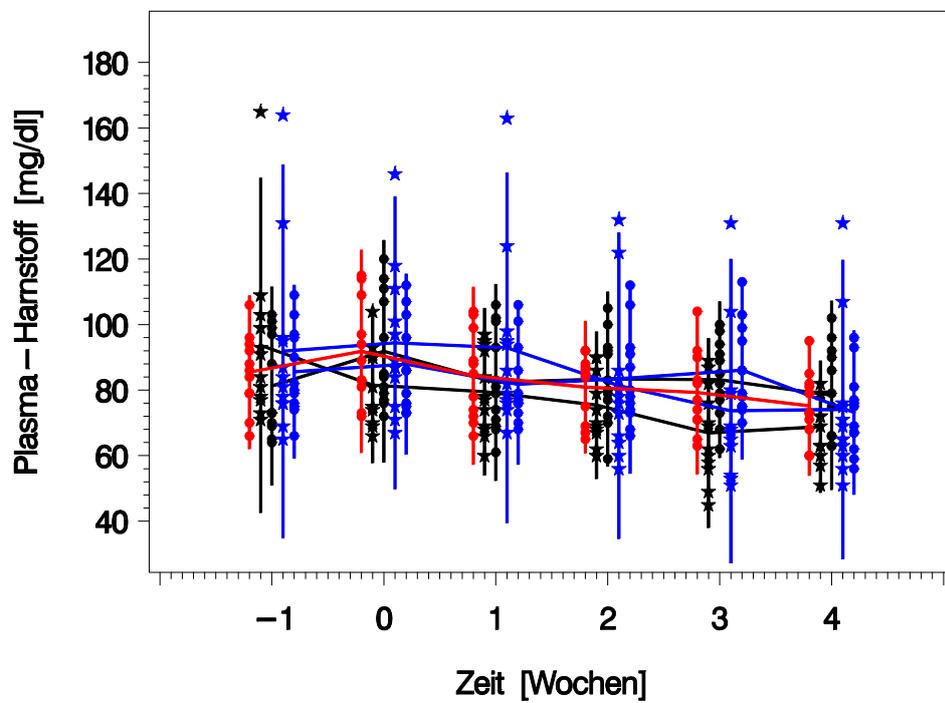


Abb. 74: Entwicklung der Proteinkonzentration in Experiment 2 (Legende s. S. 126)

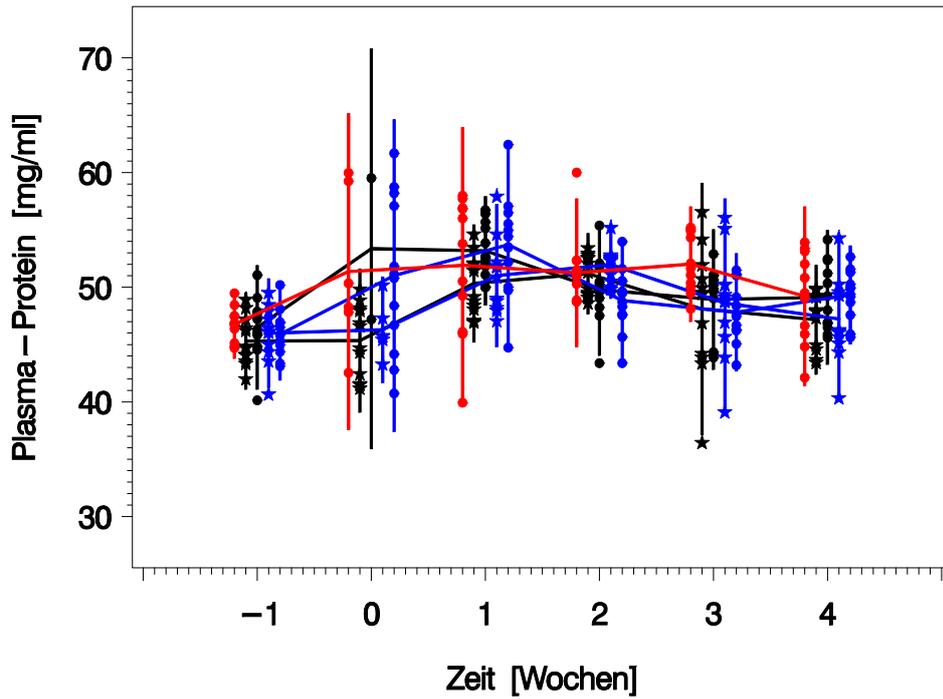
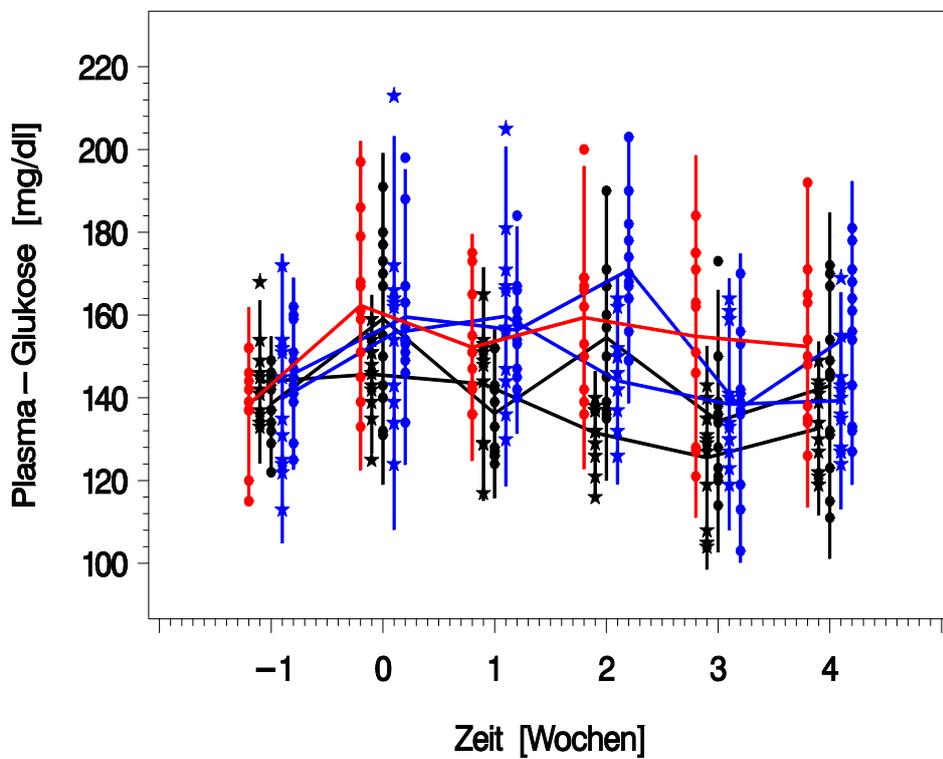


Abb. 75: Entwicklung der Glukosekonzentration in Experiment 2 (Legende s. S. 126)



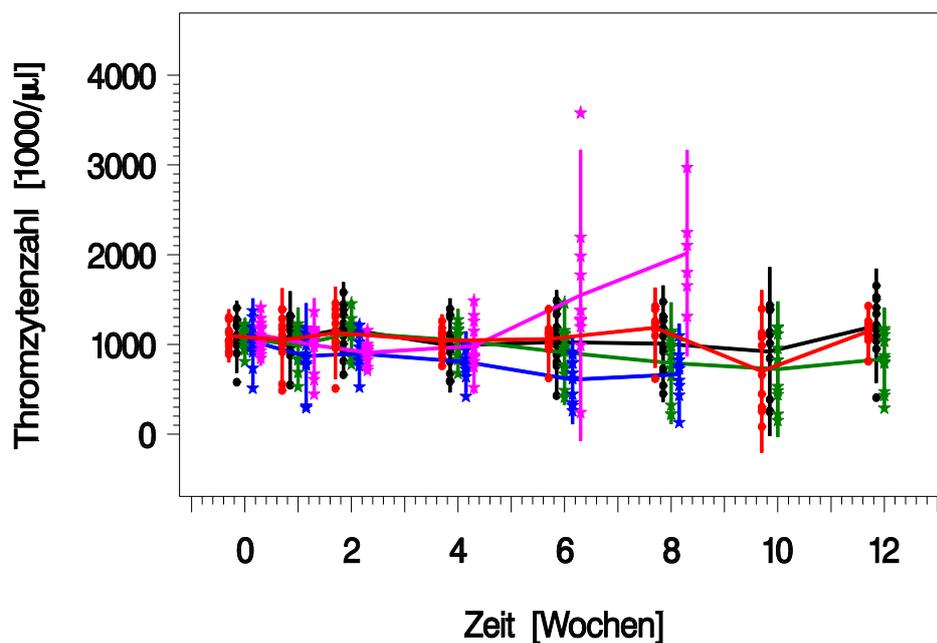
### Experiment 3

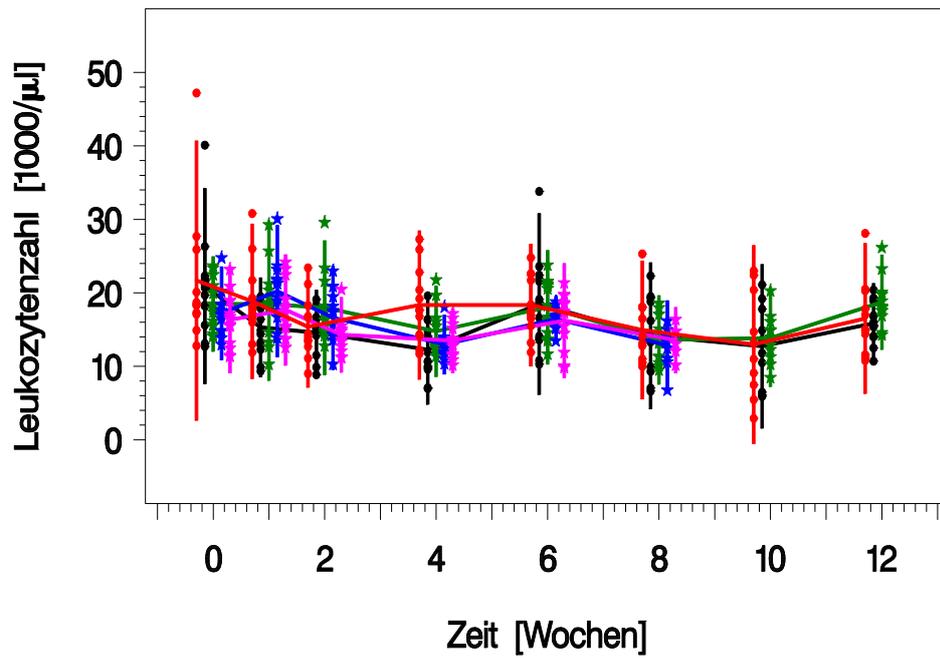
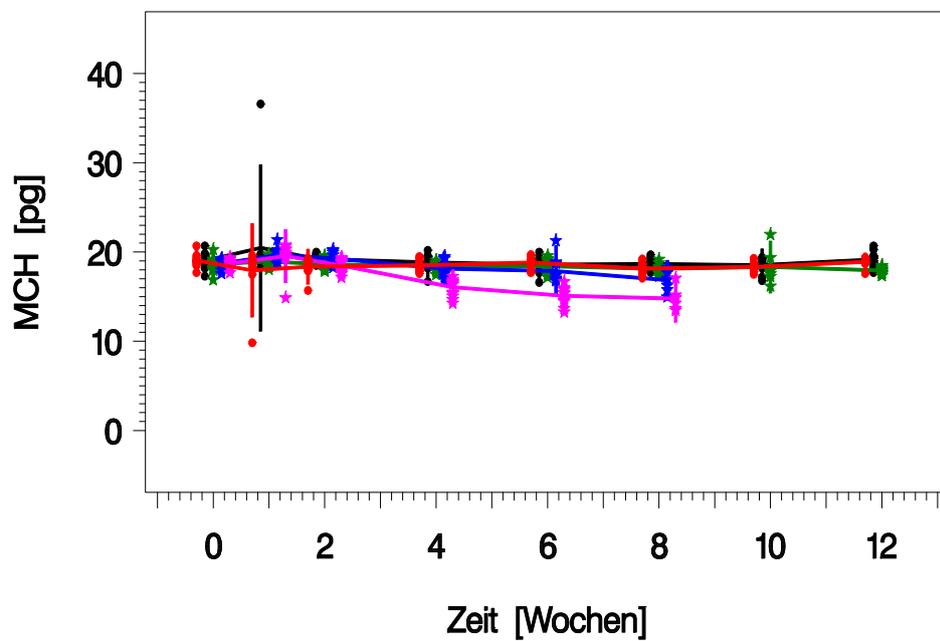
Im Experiment 3 zeigten alle nachfolgenden Parameter keine deutlichen Veränderungen: Thrombozytenzahl (Abb. 76), Leukozytenzahl (Abb. 77), mittleres korpuskuläre Zellhämoglobin (Abb. 78), mittlere korpuskuläre Zellhämoglobinkonzentration (Abb. 79), GOT (Abb. 80), GPT (Abb. 81), AP (Abb. 82), Cholesterin (Abb. 83), Triglyzeride (Abb. 84), Phosphatkonzentration (Abb. 85), Harnstoff (Abb. 86), Proteinkonzentration (Abb. 87) und die Glukosekonzentration (Abb. 88). Für die Abbildungen 76 - 88 gilt die folgende Legende:

Medikation:

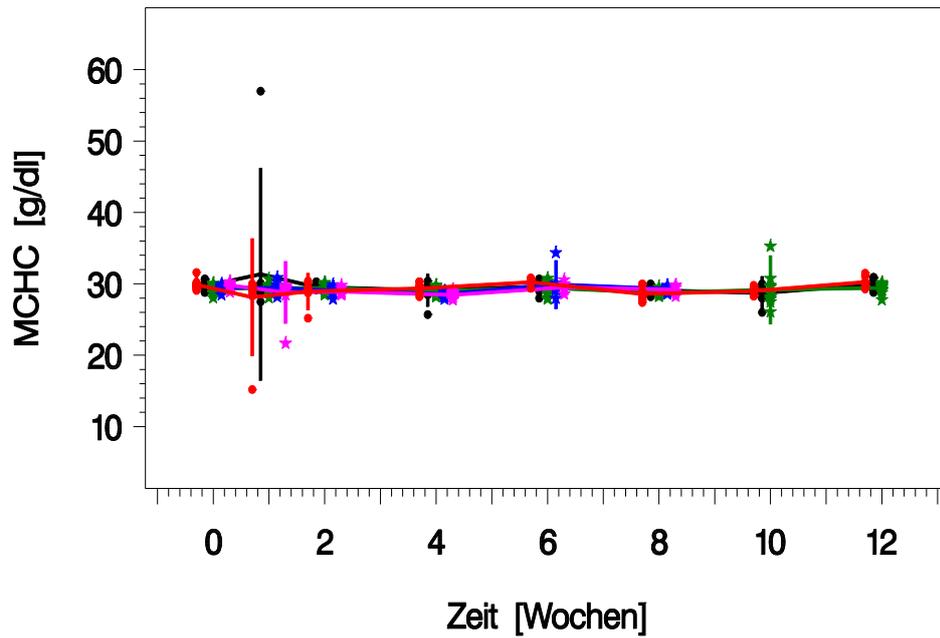
●—●—●	EPO_0,75	★—★—★	Ro 50_0,75
★—★—★	Ro 50_2,5	★—★—★	Ro 50_7,5
●—●—●	NaCl		

Abb. 76: Entwicklung der Thrombozytenzahl in Experiment 3 (Legende s. oben)

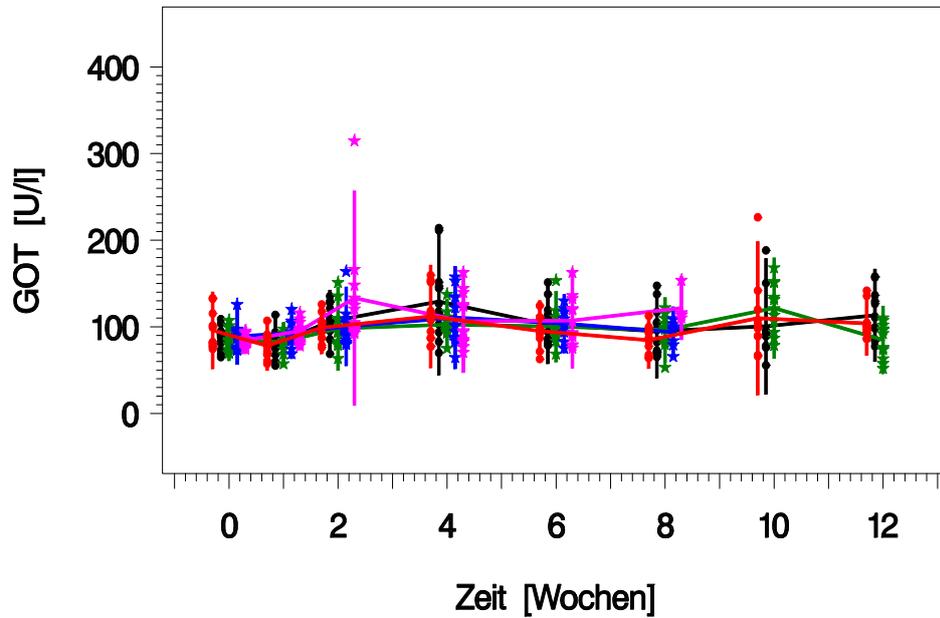


**Abb. 77:** Entwicklung der Leukozytenzahl in Experiment 3 (Legende s. S. 132)**Abb. 78:** Entwicklung der Mittleren korpuskulären Zellhämoglobin (MCH) in Experiment 3 (Legende s. S. 132)

**Abb. 79:** Entwicklung der Mittleren korpuskulären Zellhämoglobinkonzentration ( MCHC) in Experiment 3 (Legende s. S. 132)



**Abb. 80:** Entwicklung der Glutamat-oxidase-transaminase (GOT) in Experiment 3 (Legende s. S. 132)



**Abb. 81:** Entwicklung der Glutamat-pyruvat-transaminase (GPT) in Experiment 3

(Legende s. S. 132)

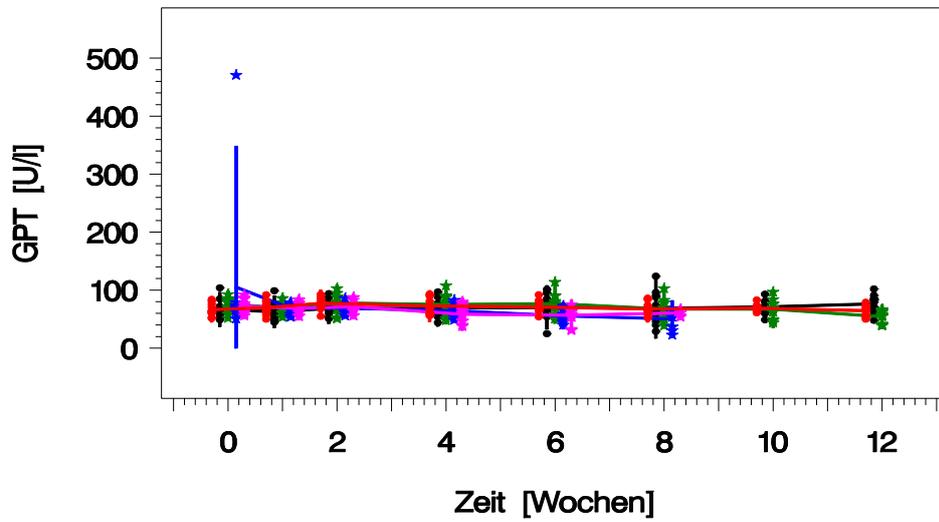
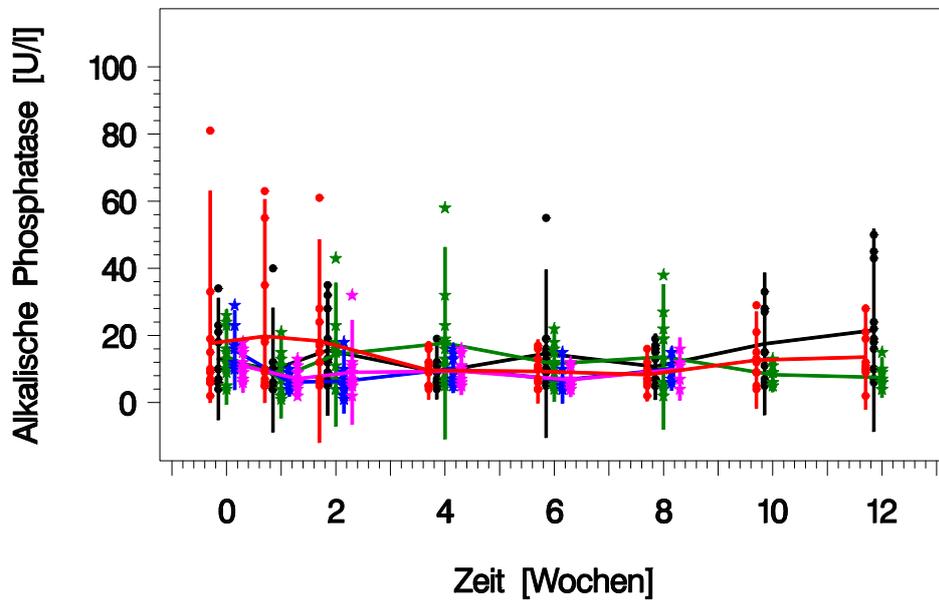
**Abb. 82:** Entwicklung der Alkalischen Phosphatase in Experiment 3 (Legende s. S. 132)

Abb. 83: Entwicklung der Cholesterinkonzentration in Experiment 3 (Legende s. S. 132)

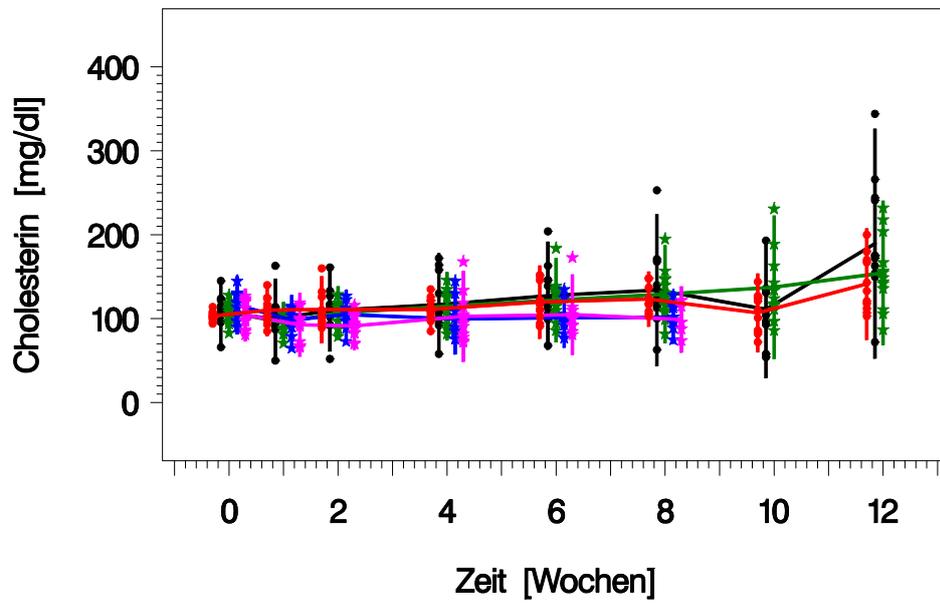


Abb. 84: Entwicklung der Triglyzeridkonzentration in Experiment 3 (Legende s. S. 132)

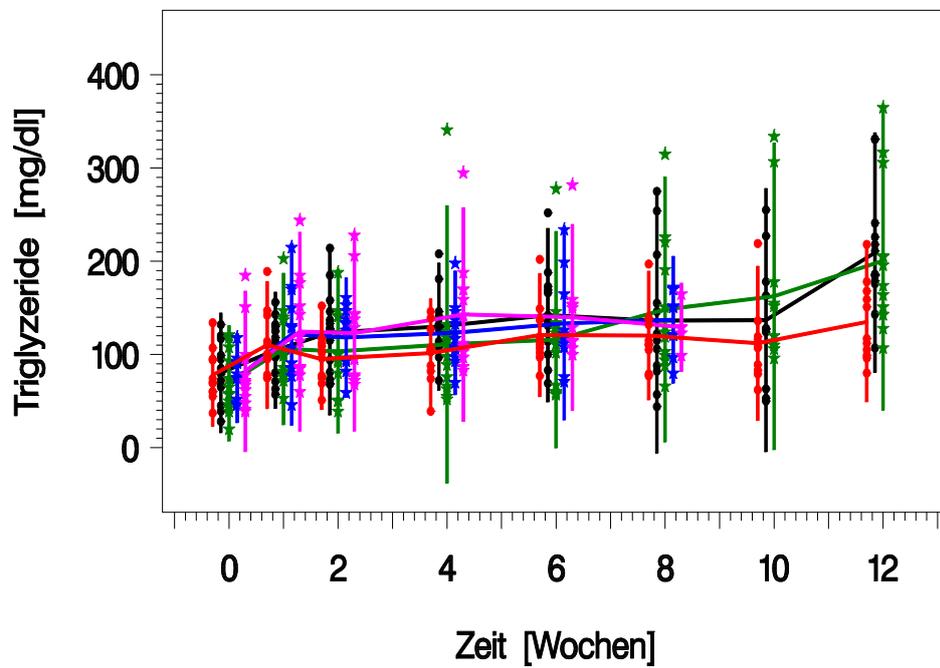


Abb. 85: Entwicklung der Phosphatkonzentration in Experiment 3 (Legende s. S. 132)

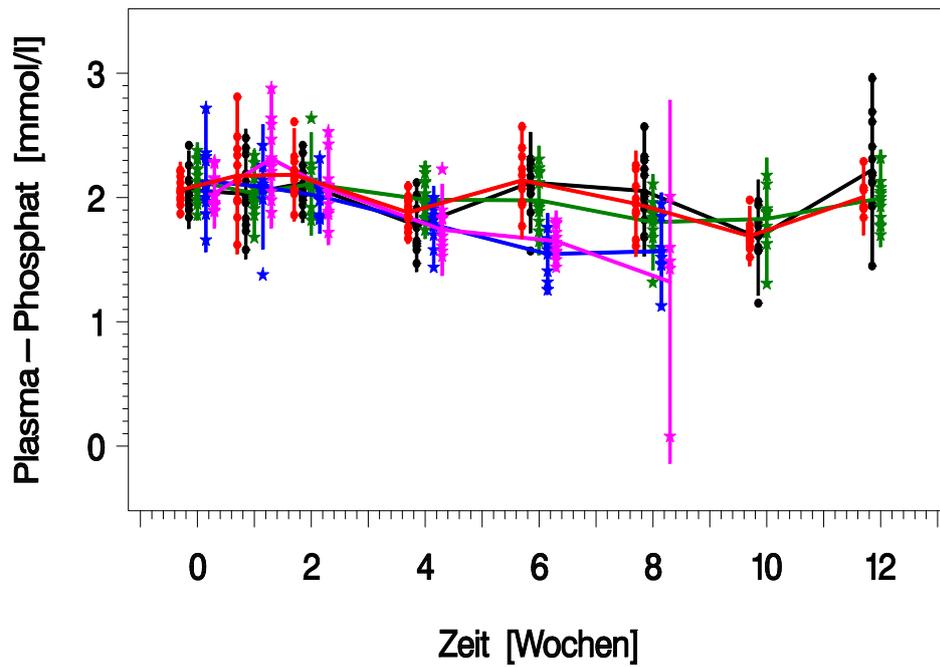


Abb. 86: Entwicklung der Harnstoffkonzentration in Experiment 3 (Legende s. S. 132)

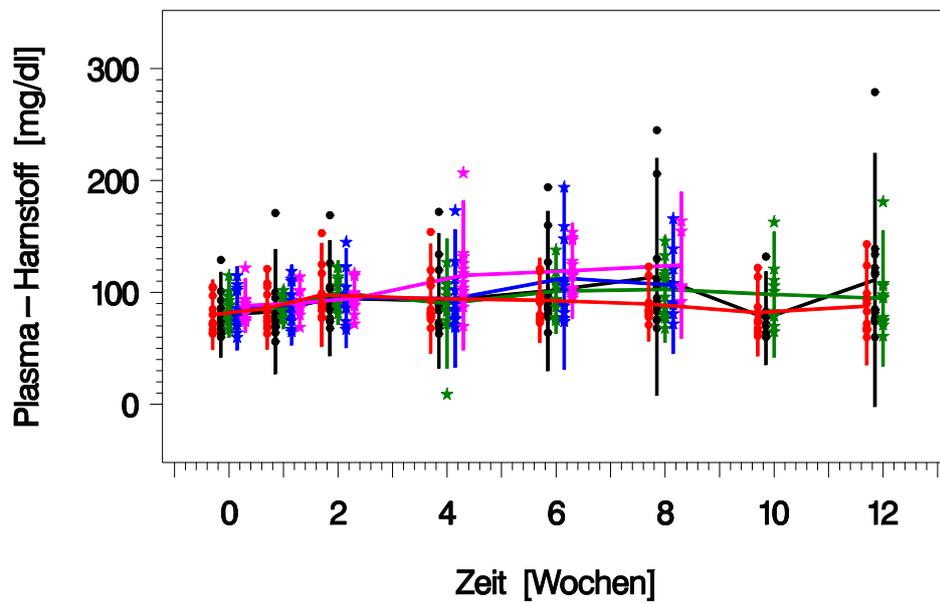


Abb. 87: Entwicklung der Proteinkonzentration in Experiment 3 (Legende s. S. 132)

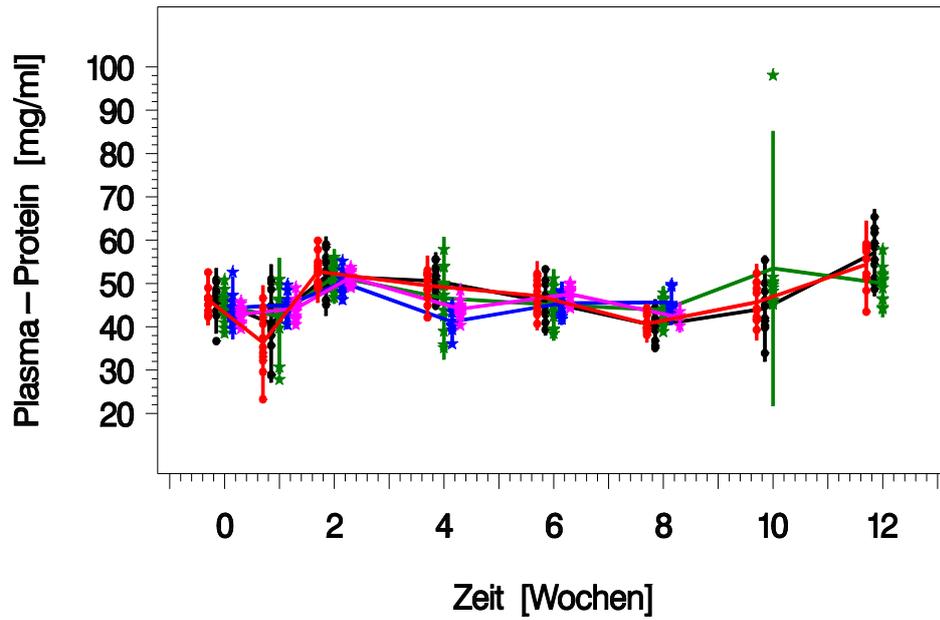
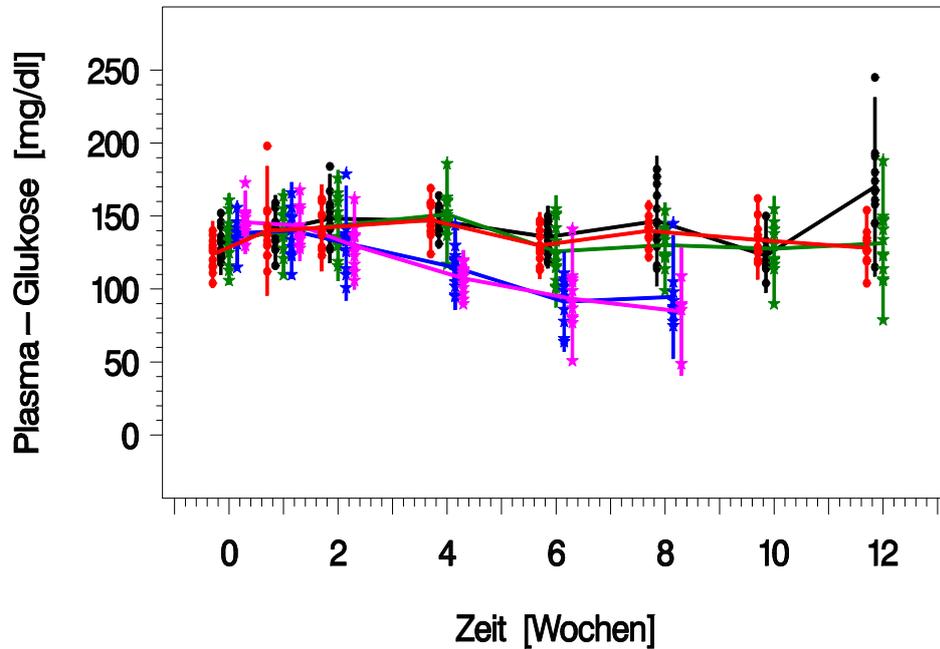


Abb. 88: Entwicklung der Glukosekonzentration in Experiment 3 (Legende s. S. 132)



**Tabelle 23:** Produktion von EPO-Antikörpern im Serum von männlichen fünfsechstenephrektomierten SD-Ratten nach 8, 10 und 12wöchiger Applikation von Ro 50 und EPO. Die s.c. Applikation erfolgte einmal wöchentlich. Ein Hemmtest > 50 % wurde mit Ak+ und < 50 % mit Ak- beurteilt. (Ro 50 0,75 = 0,75 µg/kg; Ro 50 2,5 = 2,5 µg/kg; Ro 50 7,5 = 7,5 µg/kg; EPO 0,75 = 0,75 µg/kg; NaCl = physiologische Kochsalzlösung; - = die Tiere wurden aus dem Experiment genommen)

Tier Nr.	Medikation	Hemmung (%)		
		8. Woche	10. Woche	12. Woche
144	NaCl	0,0	0,0	0,0
145	NaCl	0,0	0,0	0,0
146	NaCl	0,0	0,0	0,0
147	NaCl	0,0	0,0	0,0
148	NaCl	0,0	0,0	0,0
149	NaCl	0,0	0,0	0,0
150	NaCl	0,0	0,0	0,0
151	NaCl	0,0	0,0	0,0
152	NaCl	0,0	0,0	0,0
153	NaCl	0,0	0,0	0,0
154	NaCl	8,0	9,0	5,0
155	EPO 0,75	5,0	97,0	96,0
156	EPO 0,75	96,0	-	-
157	EPO 0,75	97,0	97,0	97,0
159	EPO 0,75	0,0	25,0	18,0
160	EPO 0,75	0,0	0,0	0,0
161	EPO 0,75	0,0	68,0	51,0
162	EPO 0,75	97,0	97,0	-
163	EPO 0,75	86,0	-	96,0
164	EPO 0,75	98,0	98,0	88,0
165	EPO 0,75	0,0	0,0	39,0
166	EPO 0,75	94,0	86,0	86,0
167	EPO 0,75	98,0	97,0	97,0
168	EPO 0,75	98,0	98,0	97,0

169	EPO 0,75	99,0	99,0	98,0
170	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
171	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
172	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
173	Ro 50 0,75	1,0	0,0	0,0
174	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
175	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
176	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
177	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
178	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
179	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
181	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
182	Ro 50 0,75	0,0	0,0	0,0
183	Ro 50 0,75	0,0	3,0	0,0
184	Ro 50 2,5	6,0	-	-
186	Ro 50 2,5	0,0	-	-
188	Ro 50 2,5	0,0	-	-
191	Ro 50 2,5	0,0	-	-
192	Ro 50 2,5	0,0	-	-
194	Ro 50 2,5	0,0	-	-
195	Ro 50 2,5	35,0	-	-
198	Ro 50 7,5	2,0	-	-
199	Ro 50 7,5	0,0	-	-
200	Ro 50 7,5	61,0	-	-
201	Ro 50 7,5	9,0	-	-
202	Ro 50 7,5	43,0	-	-
206	Ro 50 7,5	4,0	-	-
208	Ro 50 7,5	18,0	-	-
209	Ro 50 7,5	4,0	-	-
210	Ro 50 7,5	1,0	-	-

## 9. Literaturverzeichnis

1. Abuchowski A, Davis FF (1979)  
Preparation and properties of polyethylene glycol-trypsin adducts.  
*Biochim Biophys Acta* 578: 41-6
2. Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR, Jr., Van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, Viau AT, Davis FF (1984)  
Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates.  
*Cancer Biochem Biophys* 7: 175-86
3. Abuchowski A, van Es T, Palczuk NC, Davis FF (1977)  
Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol.  
*J Biol Chem* 252: 3578-81
4. Akahori H, Tawara T, Ida M, Miyazaki H (1998)  
The effect of novel erxthropoiesis stimulating protein (NESP) on anemia induced by renal failure.  
*Experimental Hematology (Charlottesville)* 26: 8
5. Albitar S, Meulders Q, Hammoud H, Soutif C, Bouvier P, Pollini J (1995)  
Subcutaneous versus intravenous administration of erythropoietin improves its efficiency for the treatment of anaemia in haemodialysis patients.  
*Nephrol Dial Transplant* 10 Suppl 6: 40-3
6. Amann K, Buzello M, Simonaviciene A, Miltenberger-Miltenyi G, Koch A, Nabokov A, Gross ML, Gless B, Mall G, Ritz E (2000)  
Capillary/myocyte mismatch in the heart in renal failure-a role for erythropoietin?  
*Nephrol Dial Transplant* 15: 964-9

- 
7. Anagnostou A, Barone J, Kedo A, Fried W (1977)  
Effect of erythropoietin therapy on the red cell volume of uraemic and non-uraemic rats.  
Br J Haematol 37: 85-91
  8. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT (1994)  
Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A 91: 3974-8
  9. Anonymous (1999)  
Amgen to file once-weekly anaemia treatment.  
Publications Ltd SCRIP No 2480: 26
  10. Anonymous (1999)  
Guideline 10: Initial epoetin administration.  
Nephrol Dial Transplant 14: 21
  11. Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU (1993)  
Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin.  
J Histochem Cytochem 41: 335-41
  12. Bailon P, Berthold W (1998)  
Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins.  
Pharmaceut Sci Technol 1: 352-356
  13. Barbone FP, Johnson DL, Farrell FX, Collins A, Middleton SA, McMahon FJ, Tullai J, Jolliffe LK (1999)  
New epoetin molecules and novel therapeutic approaches.  
Nephrol Dial Transplant 14, Suppl 2: 80-4

14. Bazan JF (1989)  
A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain.  
Biochem Biophys Res Commun 164: 788-95
15. Beccari M (1994)  
Seizures in dialysis patients treated with recombinant erythropoietin. Review of the literature and guidelines for prevention.  
Int J Artif Organs 17: 5-13
16. Bellizzi V, Sabbatini M, Fuiano G, Sansone G, Magri P, Uccello F, Andreucci M, De Nicola L, Cianciaruso B (1998)  
The impact of early normalization of haematocrit by erythropoietin on renal damage in the remnant kidney model.  
Nephrol Dial Transplant 13: 2210-5
17. Bleuel H, Hoffmann R, Kaufmann B, Neubert P, Ochlich PP, Schaumann W (1996)  
Kinetics of subcutaneous versus intravenous epoetin-beta in dogs, rats and mice.  
Pharmacology 52: 329-38
18. Bode-Böger SM, Boger RH, Kuhn M, Radermacher J, Frolich JC (1996)  
Recombinant human erythropoietin enhances vasoconstrictor tone via endothelin-1 and constrictor prostanoids.  
Kidney Int 50: 1255-61
19. Bommer J, Ritz E, Weinreich T, Bommer G, Ziegler T (1988)  
Subcutaneous erythropoietin.  
Lancet 2: 406
20. Bor-Kucukatay M, Yalcin O, Meiselman HJ, Baskurt OK (2000)  
Erythropoietin-induced rheological changes of rat erythrocytes.  
Br J Haematol 110: 82-8

21. Brenner BM (1985)  
Nephron adaptation to renal injury or ablation.  
*Am J Physiol* 249: F324-37
22. Bridell R, Stoney G, Kern B, Molineux G (1999)  
Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) is at least equivalent in promoting in vitro human burst forming unit-erythroid (BFU-E) derived colony formation from peripheral blood (PB) compared with recombinant human erythropoietin (rHuEPO).  
*Exp Hematol* 27: 206
23. Brochu E, Lacasse S, Lariviere R, Kingma I, Grose JH, Lebel M (1999)  
Differential effects of endothelin-1 antagonists on erythropoietin-induced hypertension in renal failure.  
*J Am Soc Nephrol* 10: 1440-6
24. Bruneval P, Sassy C, Mayeux P, Belair MF, Casadevall N, Roux FX, Varet B, Lacombe C (1993)  
Erythropoietin synthesis by tumor cells in a case of meningioma associated with erythrocytosis.  
*Blood* 81: 1593-7
25. Bukowski RM, Young J, Goodman G, Meyers F, Issell BF, Sergi JS, McLain D, Fyfe G, Finke J (1993)  
Polyethylene glycol conjugated interleukin-2: clinical and immunologic effects in patients with advanced renal cell carcinoma.  
*Invest New Drugs* 11: 211-7
26. Caro J, Brown S, Miller O, Murray T, Erslev AJ (1979)  
Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients.  
*J Lab Clin Med* 93: 449-58
27. Cazzola M, Mercuriali F, Brugnara C (1997)  
Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia.  
*Blood* 89: 4248-67

- 
28. Chen RH, Abuchowski A, Van Es T, Palczuk NC, Davis FF (1981)  
Properties of two urate oxidases modified by the covalent attachment of poly(ethylene glycol).  
Biochim Biophys Acta 660: 293-8
  
  29. Chua CC, Greenberg ML, Viau AT, Nucci M, Brenckman WD, Jr., Hershfield MS (1988)  
Use of polyethylene glycol-modified uricase (PEG-uricase) to treat hyperuricemia in a patient with non-Hodgkin lymphoma.  
Ann Intern Med 109: 114-7
  
  30. Daghman NA, McHale CM, Savage GM, Price S, Winter PC, Maxwell AP, Lappin TR (1999)  
Regulation of erythropoietin gene expression depends on two different oxygen-sensing mechanisms.  
Mol Genet Metab 67: 113-7
  
  31. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J (1998)  
Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue.  
Blood 92: 3218-25
  
  32. D'Andrea AD, Zon LI (1990)  
Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation.  
J Clin Invest 86: 681-7
  
  33. Davis S, Abuchowski A, Park YK, Davis FF (1981)  
Alteration of the circulating life and antigenic properties of bovine adenosine deaminase in mice by attachment of polyethylene glycol.  
Clin Exp Immunol 46: 649-52
  
  34. Delanty N, Vaughan C, Frucht S, Stubgen P (1997)  
Erythropoietin-associated hypertensive posterior leukoencephalopathy.  
Neurology 49: 686-9

- 
35. Dixon WJ (1993)  
BMDP Statistical Software Manuel, Volume 1 and 2. University of California Press,  
Berkeley, Los Angeles, London
  36. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M  
(1995)  
Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse  
brain.  
Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3717-20
  37. DiMarchi RD, Chance RE, Long HB, Shields JE, Sliker LJ (1994)  
Preparation of an insulin with improved pharmacokinetics relative to human insulin  
through consideration of structural homology with insulin-like growth factor I.  
Horm Res 41 Suppl 2: 93-6
  38. Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E (1985)  
The role of carbohydrate in erythropoietin action.  
Endocrinology 116: 2293-9
  39. Ebert BL, Bunn HF (1999)  
Regulation of the erythropoietin gene.  
Blood 94: 1864-77
  40. Eckardt KU (1999)  
Erythropoietin als Prototyp sauerstoffabhängiger Genexpression.  
Aktuelle Nephrologie 32: 539-547
  41. Eckardt KU (2000)  
Pathophysiology of renal anemia.  
Clin Nephrol 53: S2-8

- 
42. Egrie J, Dwyer E, Lykos M, Hitz A, Browne J (1997)  
Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) has a longer serum half-life and greater in vivo biological activity compared to recombinant human erythropoietin (rHuEPO).  
Blood 90: 56a
43. Emerson SG, Thomas S, Ferrara JL, Greenstein JL (1989)  
Developmental regulation of erythropoiesis by hematopoietic growth factors: analysis on populations of BFU-E from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver.  
Blood 74: 49-55
44. Erslev A (1953)  
Humoral regulation of red cell production.  
Blood 8: 349 - 357
45. Erslev AJ (1991)  
Erythropoietin.  
N Engl J Med 324: 1339-44
46. Eschbach JW, Abdulhadi MH, Browne JK, Delano BG, Downing MR, Egrie JC, Evans RW, Friedman EA, Graber SE, Haley NR, Korbet S, Krantz SB, Lundin AP, Nissenson AR, Ogden DA, Paganini EP, Rader B, Rutsky EA, Stivelman J, Stone WJ, Teschan P, Van Stone JC, Van Wyck DB, Zuckerman K, Adamson JW (1989)  
Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. Results of a phase III multicenter clinical trial.  
Ann Intern Med 111: 992-1000
47. Eschbach JW, Adamson JW (1988)  
Modern aspects of the pathophysiology of renal anemia.  
Contrib Nephrol 66: 63-70

- 
48. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW (1987)  
Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial.  
N Engl J Med 316: 73-8
  
  49. Fandrey J, Bunn HF (1993)  
In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction.  
Blood 81: 617-23
  
  50. Fandrey J, Frede S, Ehleben W, Porwol T, Acker H, Jelkmann W (1997)  
Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species.  
Kidney Int 51: 492-6
  
  51. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA (1992)  
Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production.  
Blood 79: 1987-94
  
  52. Fisher JW (1997)  
Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects.  
Proc Soc Exp Biol Med 216: 358-69
  
  53. Fox J (1998)  
Enterohepatic Helicobacters: natural and experimental models.  
Ital J Gastroenterol Hepatol 30 Suppl 3: S264-9
  
  54. Fraser JK, Tan AS, Lin FK, Berridge MV (1989)  
Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes.  
Exp Hematol 17: 10-6

- 
55. Frei U, Nonnast-Daniel B, Koch KM (1988)  
Erythropoietin and hypertension.  
Klin Wochenschr 66: 914-9
  
  56. Fukuda M, Sasaki H, Fukuda MN (1989)  
Erythropoietin metabolism and the influence of carbohydrate structure.  
Contrib Nephrol 76: 78-89
  
  57. Furst I (1999)  
Amgen's NESP victory cuts out Johnson & Johnson.  
Nat Biotechnol 17: 124
  
  58. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL (2000)  
Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney.  
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8010-8014
  
  59. Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ (1995)  
Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents.  
Am J Physiol 268: C1362-8
  
  60. Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF (1987)  
The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines.  
Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7972-6
  
  61. Goldwasser E, Kung CK (1968)  
Progress in the purification of erythropoietin.  
Ann N Y Acad Sci 149: 49-53
  
  62. Goldwasser E, Kung CK (1971)  
Purification of erythropoietin.  
Proc Natl Acad Sci U S A 68: 697-8

- 
63. Greaves P (1990)  
Interpretation and relevance in drug safety evaluation.  
In: Greaves P (ed) Histopathology of preclinical toxicity studies
64. Greaves P, Faccini JM (1992)  
A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies. Bronchi/Lungs:  
Nonneoplastic lesions.  
In: Greaves P, Faccini JM (eds) Rat Histopathology 79-83
65. Greaves P, Faccini JM (1992)  
A glossary for use in toxicity and carcinogenicity studies. Liver.  
In: Greaves P (ed) Rat Histopathology 107-117
66. Gretz N, Lasserre J, Kraft K, Waldherr R, Weidler B, Meisinger E, Strauch M (1988)  
Efficacy and side effects of erythropoietin used in the treatment of anemia of uremic  
rats.  
Contrib Nephrol 60: 236-44
67. Gretz N, Meisinger E, Strauch M (1988)  
Limitations and Problems of Animal Experiments in Uremia.  
Contrib. Nephrol. 60: 252-263
68. Gretz N, Meisinger E, Strauch M (1988)  
Partial Nephrectomy and Chronic Renal Failure: The "Mature" Rat Model.  
Contrib Nephrol. 60: 46-55
69. Gretz N, Meisinger E, Waldherr R, Strauch M (1988)  
Acute Renal Failure after 5/6 Nephrectomy: Histological and Functional Changes.  
Contrib. Nephrol. 60: 56-63
70. Grond J, Beukers JY, Schilthuis MS, Weening JJ, Elema JD (1986)  
Analysis of renal structural and functional features in two rat strains with a different  
susceptibility to glomerular sclerosis.  
Lab Invest 54: 77-83

- 
71. Hadley KB, Sato PH (1989)  
Catalytic activity of administered gulonolactone oxidase polyethylene glycol conjugates.  
Enzyme 42: 225-34
  72. Hand MF, Haynes WG, Johnstone HA, Anderton JL, Webb DJ (1995)  
Erythropoietin enhances vascular responsiveness to norepinephrine in renal failure.  
Kidney Int 48: 806-13
  73. Hartley C, McElroy P, Suhterland W, Molineux G (1999)  
Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) can correct the anemia of cisplatin-induced renal damage with a single weekly injection while repeated dosing with rHuEPO is required to obtain the same effect.  
Exp Hematol 27: 207
  74. Hershfield MS (1998)  
Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy.  
Semin Hematol 35: 291-8
  75. Ho VT, Bunn HF (1996)  
Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein.  
Biochem Biophys Res Commun 223: 175-80
  76. Hoffmann-LaRoche I (2000)  
Investigator's Brochures.  
Roche 7 - 11
  77. Howey DC, Bowsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR (1994)  
[Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin.  
Diabetes 43: 396-402

- 
78. Ishikawa A, Suzuki K, Fujita K (1999)  
A preventive effect of a selective endothelin-A receptor antagonist, S-0139, on the erythropoietin-induced reduction of the renal cortical blood flow.  
Urol Res 27: 312-4
79. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, Kawakita M, Shimizu M, Myiake T (1985)  
Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin.  
Nature 313: 806-10
80. Jelkmann W, Pagel H, Wolff M, Fandrey J (1992)  
Monokines inhibiting erythropoietin production in human hepatoma cultures and in isolated perfused rat kidneys.  
Life Sci 50: 301-8
81. Jurgens H, Schwamborn D, Korholz D, Wahn V, Gobel U (1988)  
Clinical experiences with polyethylene glycol-bound E. coli L-asparaginase in patients with multiple recurrences of acute lymphoblastic leukemia.  
Klin Padiatr 200: 184-9
82. Karaki H (1989)  
Ca<sup>2+</sup>, Localization and Sensitivity in vascular smooth muscle.  
Trends Pharmacol Sci 10: 320-325
83. Kato M, Kamiyama H, Okazaki A, Kumaki K, Kato Y, Sugiyama Y (1997)  
Mechanism for the nonlinear pharmacokinetics of erythropoietin in rats.  
J Pharmacol Exp Ther 283: 520-7
84. Kato M, Miura K, Kamiyama H, Okazaki A, Kumaki K, Kato Y, Sugiyama Y (1997)  
Immunological response to repeated administration of recombinant human erythropoietin in rats: biphasic effect on its pharmacokinetics.  
Drug Metab Dispos 25: 1039-44

- 
85. Kaufman JS, Reda DJ, Fye CL, Goldfarb DS, Henderson WG, Kleinman JG, Vaamonde CA (1998)  
Subcutaneous compared with intravenous epoetin in patients receiving hemodialysis.  
Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Erythropoietin in Hemodialysis Patients.  
N Engl J Med 339: 578-83
86. Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ (1996)  
Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein.  
Proc Natl Acad Sci U S A 93: 14082-7
87. Kinoshita H, Ohishi N, Kato M, Tokura S, Okazaki A (1992)  
Pharmacokinetics and distribution of recombinant erythropoietin in rats.  
Arzneimittelforsch 42: 174-8
88. Kinoshita H, Ohishi N, Tokura S, Okazaki A (1992)  
Pharmacokinetics and distribution of recombinant human erythropoietin in rats with renal dysfunction.  
Arzneimittelforsch 42: 682-6
89. Kling PJ, Dragsten PR, Roberts RA, Dos Santos B, Brooks DJ, Hedlund BE, Taetle R (1996)  
Iron deprivation increases erythropoietin production in vitro, in normal subjects and patients with malignancy.  
Br J Haematol 95: 241-8
90. Koury MJ, Bondurant MC (1990)  
Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells.  
Science 248: 378-381

91. Koury MJ, Bondurant MC (1991)  
The mechanism of erythropoietin action.  
Am J Kidney Dis 18: 20-3
92. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ (1988)  
Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization.  
Blood 71: 524-7
93. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL (1991)  
Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization.  
Blood 77: 2497-503
94. Lacasse MS, Kingma I, Lariviere R, Grose JH, Lebel M (1993)  
Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin.  
Clin Exp Hypertens 19: 389-401
95. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Tambourin P, Varet B (1991)  
Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion.  
Am J Kidney Dis 18: 14-9
96. Lacombe C, Mayeux P (1998)  
Biology of erythropoietin.  
Haematologica 83: 724-32
97. Lacombe C, Mayeux P (1999)  
The molecular biology of erythropoietin.  
Nephrol Dial Transplant 14, Suppl 2: 22-8
98. Lago M, Perez-Garcia R, Garcia de Vinuesa MS, Anaya F, Valderrabano F (1996)  
Efficiency of once-weekly subcutaneous administration of recombinant human erythropoietin versus three times a week administration in hemodialysis patients.  
Nephron 72: 723-4

- 
99. Lai PH, Everett R, Wang FF, Arakawa T, Goldwasser E (1986)  
Structural characterization of human erythropoietin.  
J Biol Chem 261: 3116-21
  
  100. Lamb D (1975)  
Rat lung pathology and quality of laboratory animals: the user's view.  
Lab Anim 9: 1-8
  
  101. Lappin TR, Rich IN (1996)  
Erythropoietin--the first 90 years.  
Clin Lab Haematol 18: 137-45
  
  102. Lee WY, Schon AH, Akerblom E (1981)  
Suppression of reaginic antibodies with modified allergens. IV. Induction of suppressor T cells by conjugates of polyethylene glycol (PEG) and monomethoxy PEG with ovalbumin.  
Int Arch Allergy Appl Immunol 64: 100-14
  
  103. Lim VS, DeGowin RL, Zavala D, Kirchner PT, Abels R, Perry P, Fangman J (1989)  
Recombinant human erythropoietin treatment in pre-dialysis patients. A double-blind placebo-controlled trial.  
Ann Intern Med 110: 108-14
  
  104. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F (1996)  
Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis.  
Genes Dev 10: 154-64
  
  105. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Badrawi SM, Lai PH, Goldwasser E (1985)  
Cloning and expression of the human erythropoietin gene.  
Proc Natl Acad Sci U S A 82: 7580-4

- 
106. Loomis D (1946)  
Hypertension and necrotizing arteritis in the rat following renal infarction.  
Arch Pathol 141: 231-268
107. Losco P (1992)  
Normal Development, Growth, and Aging of the Spleen.  
In: Mohr U, Dungworth DL, Capen CC (eds) Pathobiology of the Aging Rat 1: 75-94
108. MacLeod JN, Tetreault, J.W., Lorschy, K.A., Gu, D.U. (1998)  
Expression and bioactivity of recombinant canine erythropoietin.  
Am J Vet Res 59: 1144 - 8
109. Macdougall IC, Roberts DE, Coles GA, Williams JD (1991)  
Clinical pharmacokinetics of epoetin (recombinant human erythropoietin).  
Clin Pharmacokinet 20: 99-113
110. Maeda N, Kon K, Tateishi N, Suzuki Y, Sekiya M, Taniguchi T, Seike M, Nakajima T, Shiga T, Tanaka K, Shinkura H (1989)  
Rheological properties of erythrocytes in recombinant human erythropoietin-administered normal rat.  
Br J Haematol 73: 105-11
111. Maeda N, Shiga T (1994)  
Effect of recombinant human erythropoietin on blood rheology of rat.  
Clinical Hemorheology 14: 53-62
112. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996)  
Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain.  
Eur J Neurosci 8: 666-76

- 
113. Maruyama H, Sugawa M, Moriguchi Y, Imazeki I, Ishikawa Y, Ataka K, Hasegawa S, Ito Y, Higuchi N, Kazama JJ, Gejyo F, Miyazaki JI (2000)  
Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation.  
Hum Gene Ther 11: 429-37
114. Masuda S, Kobayashi T, Chikuma M, Nagao M, Sasaki R (2000)  
The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner.  
Am J Physiol Endocrinol Metab 278: E1038-44
115. Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F, Jr., Tabira T, Sasaki R (1993)  
Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells.  
J Biol Chem 268: 11208-16
116. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R (1994)  
A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes.  
J Biol Chem 269: 19488-93
117. Maxwell AP, Lappin TR, Johnston CF, Bridges JM, McGeown MG (1990)  
Erythropoietin production in kidney tubular cells.  
Br J Haematol 74: 535-9
118. Maxwell PH, Ferguson DJ, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Doe BG, Johnson MH, Ratcliffe PJ (1994)  
Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells.  
Blood 84: 1823-30
119. McMahon FG, Vargas R, Ryan M, Jain AK, Abels RI, Perry B, Smith IL (1990)  
Pharmacokinetics and effects of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous injections in healthy volunteers.  
Blood 76: 1718-22

- 
120. Means RT, Jr, Dessypris EN, Krantz SB (1992)  
Inhibition of human erythroid colony-forming units by interleukin-1 is mediated by gamma interferon.  
J Cell Physiol 150: 59-64
121. Means RT, Jr, Krantz SB (1992)  
Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease.  
Blood 80: 1639-47
122. Means RT, Jr, Krantz SB (1993)  
Inhibition of human erythroid colony-forming units by tumor necrosis factor requires beta interferon.  
J Clin Invest 91: 416-9
123. Medical Economics CI (2000)  
Package Insert for Epogen.  
Physicians Desk Reference 519 - 525
124. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977)  
Purification of human erythropoietin.  
J Biol Chem 252: 5558-64
125. Mizoguchi H, Miura Y, Takaku M, Sassa S, Chiba S, Nakao K (1971)  
The effect of erythropoietin on human bone marrow cells in vitro. I. Studies of nine cases of bone marrow failure.  
Blood 37: 624-33
126. Morishita E, Narita H, Nishida M, Kawashima N, Yamagishi K, Masuda S, Nagao M, Hatta H, Sasaki R (1996)  
Anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody: epitope mapping, quantification of the soluble receptor, and detection of the solubilized transmembrane receptor and the receptor-expressing cells.  
Blood 88: 465-71

- 
127. Muntzel M, Hannedouche T, Lacour B, Druke TB (1993)  
Erythropoietin increases blood pressure in normotensive and hypertensive rats.  
Nephron 65: 601-4
128. Nemoto T, Yokota N, Keane WF, Rabb H (2001)  
Recombinant erythropoietin rapidly treats anemia in ischemic acute renal failure.  
Kidney Int 59: 246-51
129. Nucci M, Shorr R, Abuchowski A (1991)  
The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins.  
Adv Drug Delivery Rev 6: 133-151
130. Nucci ML, Olejarczyk J, Abuchowski A (1986)  
Immunogenicity of polyethylene glycol-modified superoxide dismutase and catalase.  
J Free Radic Biol Med 2: 321-5
131. Paganini EP, Eschbach JW, Lazarus JM, Van Stone JC, Gimenez LF, Graber SE, Egrie JC, Okamoto DM, Goodkin DA (1995)  
Intravenous versus subcutaneous dosing of epoetin alfa in hemodialysis patients.  
Am J Kidney Dis 26: 331-40
132. Peces R, de la Torre M, Alcazar R, Urra JM (1996)  
Antibodies against recombinant human erythropoietin in a patient with erythropoietin-resistant anemia.  
N Engl J Med 335: 523-4
133. Piercy RJ, Swardson CJ, Hinchcliff KW (1998)  
Erythroid hypoplasia and anemia following administration of recombinant human erythropoietin to two horses.  
J Am Vet Med Assoc 212: 244-7

- 
134. Piron M, Loo M, Gothot A, Tassin F, Fillet G, Beguin Y (2001)  
Cessation of intensive treatment with recombinant human erythropoietin is followed by secondary anemia.  
Blood 97: 442-448
135. Prabhakar SS, Muhlfelder T (1997)  
Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red cell aplasia.  
Clin Nephrol 47: 331-5
136. Raine AE, Roger SD (1991)  
Effects of erythropoietin on blood pressure.  
Am J Kidney Dis 18: 76-83
137. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R (1998)  
In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage.  
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 4635-40
138. Salmonson T (1990)  
Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on recombinant human erythropoietin.  
Scand J Urol Nephrol Suppl 129: 1-66
139. Sasaki H, Bothner B, Dell A, Fukuda M (1987)  
Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA.  
J Biol Chem 262: 12059-76
140. Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI (1990)  
Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors.  
J Cell Physiol 142: 219-30

- 
141. Sawada K, Krantz SB, Sawyer ST, Civin CI (1988)  
Quantitation of specific binding of erythropoietin to human erythroid colony-forming cells.  
J Cell Physiol 137: 337-45
142. Sawyer ST, Krantz SB, Goldwasser E (1987)  
Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells.  
J Biol Chem 262: 5554-62
143. Schuster SJ, Badiavas EV, Costa-Giomi P, Weinmann R, Erslev AJ, Caro J (1989)  
Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure.  
Blood 73: 13-6
144. Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD, Antonarakis SE (1991)  
Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice.  
Proc Natl Acad Sci U S A 88: 8725-9
145. Setoguchi Y, Danel C, Crystal RG (1994)  
Stimulation of erythropoiesis by in vivo gene therapy: physiologic consequences of transfer of the human erythropoietin gene to experimental animals using an adenovirus vector.  
Blood 84: 2946-53
146. Sherwood JB, Goldwasser, E. (1979)  
A radioimmunoassay for erythropoietin.  
Blood 54: 885
147. Smithgall TE (1998)  
Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation.  
Pharmacol Rev 50: 1-19

- 
148. Somiari S, Glasspool-Malone J, Drabick JJ, Gilbert RA, Heller R, Jaroszeski MJ, Malone RW (2000)  
Theory and in vivo application of electroporative gene delivery.  
Mol Ther 2: 178-87
149. Spencer AJ, Raymond E, Popp JA (1996)  
Multifocal Inflammation, Liver, Rat.  
In: Jones, T. C., Popp, J. A., Mohr, U., Monographs on Pathology of Laboratory Animals, Digestive System, 2nd Edition 217 - 220
150. Spivak JL, Pham T, Isaacs M, Hankins WD (1991)  
Erythropoietin is both a mitogen and a survival factor.  
Blood 77: 1228-33
151. Sterner G, Wennberg A (1988)  
Partial Nephrectomy and Chronic Renal Failure: The "Adult" Rat Model.  
Contrib. Nephrol. 60: 39-45
152. Sunderman FW, Jr., Hopfer SM, Reid MC, Shen SK, Kevorkian CB (1982)  
Erythropoietin-mediated erythrocytosis in rodents after intrarenal injection of nickel subsulfide.  
Yale J Biol Med 55: 123-36
153. Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N, Kobata A (1988)  
Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells.  
J Biol Chem 263: 3657-63
154. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ (1992)  
Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia.  
Am J Physiol 263: F474-81

- 
155. Taniguchi S, Dai CH, Price JO, Krantz SB (1997)  
Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells.  
Blood 90: 2244-52
156. Thomson PD, Till GO, Woolliscroft JO, Smith DJ, Prasad JK (1990)  
Superoxide dismutase prevents lipid peroxidation in burned patients.  
Burns 16: 406-8
157. Tomiya N, Watanabe K, Awaya J, Kurono M, Fujii S (1985)  
Modification of acyl-plasmin-streptokinase complex with polyethylene glycol.  
Reduction of sensitivity to neutralizing antibody.  
FEBS Lett 193: 44-8
158. Van Stone JC, Max P (1979)  
Effect of erythropoietin on anemia of peritoneally dialyzed anephric rats.  
Kidney Int 15: 370-5
159. Vaziri ND, Zhou XJ, Naqvi F, Smith J, Oveisi F, Wang ZQ, Purdy RE (1996)  
Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure.  
Am J Physiol 271: E113-22
160. Waldherr R, Gretz N (1988)  
Natural Course of the Development of Histological Lesions after 5/6 Nephrectomy.  
Contr Nephrol 60: 64-72
161. Wang FF, Kung CK, Goldwasser E (1985)  
Some chemical properties of human erythropoietin.  
Endocrinology 116: 2286-92

- 
162. Wang GL, Semenza GL (1993)  
Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction.  
Blood 82: 3610-5
163. Watson AJ, Gimenez LF, Cotton S, Walser M, Spivak JL (1990)  
Treatment of the anemia of chronic renal failure with subcutaneous recombinant human erythropoietin.  
Am J Med 89: 432-5
164. Wie SI, Wie CW, Lee WY, Filion LG, Schon AH, Akerblom E (1981)  
Suppression of reaginic antibodies with modified allergens. III. Preparation of tolerogenic conjugates of common allergens with monomethoxypolyethylene glycols of different molecular weights by the mixed anhydride method.  
Int Arch Allergy Appl Immunol 64: 84-99
165. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM (1986)  
Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis.  
Lancet 2: 1175-8
166. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF (1995)  
Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor.  
Cell 83: 59-67
167. Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, Nakano Y (1996)  
Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA.  
Eur J Biochem 239: 494-500
168. Yamamoto Y, Sofikitis N, Miyagawa I (1997)  
Effects of erythropoietin, bromocryptine and hydralazine on testicular function in rats with chronic renal failure.  
Andrologia 29: 141-4

169. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R (1998)  
Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis.  
J Biol Chem 273: 25381-7
170. Yokoyama M, Miyauchi M, Yamada N, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K, Inoue S (1990)  
Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer.  
Cancer Res 50: 1693-700
171. Zenner L (1999)  
Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent Helicobacter infection.  
Comp Immunol Microbiol Infect Dis 22: 41-61
172. Zhou XJ, Pandian D, Wang XQ, Vaziri ND (1997)  
Erythropoietin-induced hypertension in rat is not mediated by alterations of plasma endothelin, vasopressin, or atrial natriuretic peptide levels.  
J Am Soc Nephrol 8: 901-5

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. N. Gretz für die freundliche Überlassung des Themas und für die hilfreiche Beratung und Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der Daten sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. F. Lutz danke ich für die Betreuung am Fachbereich der Veterinärmedizin und für den fürsorglichen Beistand bei der Korrektur der Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Frau Dr. B. Kränzlin, Herrn Dr. Dr. J. Pill und Herrn Dr. Juchem für die Zeit, die Sie mir aufmerksam spendeten, aussprechen. Weiterhin danke ich Frau Wilson, Frau Köhl, Herrn Schoppmann und Frau Dorn für ihre Bemühungen und meine daraus resultierenden Erleichterungen.

Herrn Prof. Dr. J. Gross danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Untersuchung des Plasmas auf Antikörper.

Mein Dank gilt Herrn Dr. K. Failing vom Fachbereich Veterinärmedizin, Biomathematik, für die statistische Auswertung.

Ein persönlicher Dank geht an meinen Ehemann Bernd Immel, an meine Kollegin Susi Kratz und an meine Freundin Martina Henschel ohne deren Fürsorge und aufopfernde Hilfe ich diese Arbeit nie mit dieser Zufriedenheit beendet hätte.

## 11. Nachtrag

In *Kidney International* (69; 60-67, 2006) wurden bereits Teile dieser Dissertation unter dem Titel „Efficacy and immunogenicity of novel erythropoietic agents and conventional rhEPO in rats with renal insufficiency“ (HC Tillman, B Kuhn, B Kränzlin, M Sadick, J Gross, N Gretz, J Pill) veröffentlicht. Die Substanzen Epoetin beta als auch zwei neue Erythropoiesestimulierende Substanzen (Ro 50 und MIX) werden in der oben genannten Publikation sowie im europäischen Patent (EP 1064951, Erythropoietin derivatives, F. HOFFMANN - LA ROCHE) und im deutschen Patent (DE 10031839 A1, Erythropoietinkonjugate, F. HOFFMANN - LA ROCHE) beschrieben.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5293-5



9 1 7 8 3 8 3 5 1 1 9 5 2 9 3 5