# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie Leitung: Prof. Dr. E. Dikomey

# Veränderung der Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten in vitro nach Strahlentherapie bei Tumorpatienten

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Birger Jend aus Berlin

Hamburg 2010

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg	am: 22.10.2010
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.	
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. E. Dikomey
Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:	Prof. Dr. C. Petersen
Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:	PD Dr. J. Lorenzen

Angenommen von der

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2. Einleitung	6
2.1. Epidemiologie von Tumorerkrankungen in Deutschland	6
2.2. Therapie von Tumorerkrankungen	6
2.2.1. Die kurative Strahlentherapie	7
2.2.2. Strahlentherapie als palliative Maßnahme	7
2.3. Strahlenwirkung auf Zellen	
2.4. Strahlenwirkung auf Tumoren	10
2.5. Strahlenreaktionen von Normalgewebe	11
2.5.1. Akute und späte Strahlenreaktionen	12
2.5.2. Erfassungsmethoden	12
2.5.3. Entstehungsursachen	13
2.5.3.1. Genetische Faktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit	14
2.5.4. Testverfahren	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Das TNM-System	17
3.2. Der RTOG-Score	17
3.3. Das Patientenkollektiv	17
3.4. Metaphasentechnik	18
3.5. Bestrahlung	20
3.6. Mikroskopie und Auswertung	20
3.7. Puffer und Lösungen	21
4. Ergebnisse	
4.1. Methodische Vorarbeiten	22
4.1.1. Chromosomenfragmente nach Bestrahlung bei gesunden Spendern	22
4.1.2. Azentrische Chromosomenfragmente bei Tumorpatienten	
4.2. Azentrische Chromosomenfragmente bei Tumorpatienten vor und nach	
Strahlentherapie	
4.2.1. Spontan auftretende azentrische Chromosomenfragmente (0 Gy)	
4.2.1.1. Vergleich von gesunden Spendern und Tumorpatienten	
4.2.1.2. Vergleich von Tumorpatienten vor und nach Strahlentherapie	29
4.2.2. Azentrische Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung mit 6	6 Gy 30

	4.2.2.1. Azentrische Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung bei	
	Patienten vor Strahlentherapie im Vergleich zu gesunden Spendern	31
	4.2.2.2. Azentrische Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung bei	
	Patienten vor und nach Strahlentherapie	31
	4.3. Ausmaß der Zunahme der Lymphozytenempfindlichkeit von 20 Tumorpatienten	33
	4.4. Bedeutung der Gesamtdosis der Strahlentherapie	36
	4.5. Bedeutung der Größe des Bestrahlungsfeldes	38
5.	Diskussion	41
	5.1. Methodische Vorarbeiten	41
	5.2. Spontane Chromosomenaberrationen in gesunden Spendern und	
	Tumorpatienten vor bzw. nach Strahlentherapie	41
	5.3. Chromosomenaberrationen nach in vitro Bestrahlung bei Tumorpatienten	
	vor und nach Strahlentherapie im Vergleich zu gesunden Spendern	43
	5.4. Interindividuelle Schwankungen	45
	5.5. Einflussgrößen auf die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente	46
	5.5.1. Einfluss der Gesamtbestrahlungsdosis	46
	5.5.2. Größe des Bestrahlungsfeldes	47
	5.5.3. Alter der Patienten	47
	5.6. Schlussfolgerungen	48
6.	Zusammenfassung	50
7.	Literaturverzeichnis	51
8.	Danksagung	62
9.	Lebenslauf	63
1(	). Eidesstattliche Erklärung	64

#### 1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Das Ziel der kurativen Strahlentherapie ist es, unter gleichzeitiger maximaler Schonung der umliegenden gesunden Gewebe eine möglichst hohe Strahlendosis in den Tumor und sein mögliches Ausbreitungsgebiet einzustrahlen. Die maximale Strahlendosis ist jedoch bei den meisten Tumorentitäten aufgrund des im Bestrahlungsfeld befindlichen Normalgewebes limitiert, da etwa 5-10% der Patienten eine schwere Normalgewebsreaktion zeigen. Deshalb besteht ein großes allgemeines Interesse daran, eine Voraussage für diese Patienten zu treffen. Um eine Prädiktion der Normalgewebsreaktionen vornehmen zu können, ist es notwendig, geeignete Testverfahren zu entwickeln. Dabei hat sich die Bestimmung der azentrischen Chromosomenfragmente in Lymphozyten als ein potentieller Marker etabliert (Borgmann et al. 2008, Hoeller et al. 2003). Unklar ist jedoch, ob die Bildung der azentrischen Chromosomenfragmente durch eine vorangegangene Strahlentherapie verändert wird. Dies hätte die Konsequenz, dass zukünftige Untersuchungen zur Entwicklung prädiktiver Testverfahren nur mit Patienten durchgeführt werden könnten, die zuvor nicht bestrahlt wurden. Dies würde insbesondere die Aussagekraft von retrospektiven Untersuchungen sehr einschränken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Patienten sowohl vor als auch nach einer Strahlentherapie untersucht. Diese Patienten wurden zusätzlich mit einer Gruppe von gesunden Spendern verglichen. Insgesamt wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1. Gibt es einen Unterschied zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten in der Anzahl der spontan auftretenden azentrischen Chromosomenfragmente?
- 2. Gibt es einen Unterschied zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten in der Anzahl der strahleninduzierten azentrischen Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung?
- 3. Wird die Anzahl sowohl der spontanen als auch der nach in vitro Bestrahlung induzierten azentrischen Chromosomenfragmente durch eine Strahlentherapie verändert?
- 4. Hängt diese mögliche Veränderung von weiteren Einflussgrößen wie der Größe des Bestrahlungsfeldes bzw. dem Alter der Patienten ab?

#### 2. EINLEITUNG

#### 2.1. Epidemiologie von Tumorerkrankungen in Deutschland

Krebserkrankungen sind nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2007 verstarben in Deutschland 211.765 Personen infolge bösartiger Neubildungen (Statistisches Bundesamt 2008). Aufgrund des demografischen Alterungsprozesses stieg die Anzahl an Krebsneuerkrankungen bei Männern zwischen 1990 und 2002 um 39,1% (3,3% pro Jahr) (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2006) und zwischen 2002 und 2004 um etwa 5% (Batzler et al. 2008). Bis zum Jahr 2020 rechnen das Statistische Bundesamt und das Robert-Koch-Institut mit einer weiteren deutlichen Zunahme der Krebsneuerkrankungen. Für Männer über 65 Jahre wurde ein Anstieg von über 50% im Jahr 2020 errechnet (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2006).

Seit 1970 zeigt sich insgesamt eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensraten von Krebspatientinnen und -patienten. Der deutliche Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Männern ist auf die verbesserte Früherkennung des Prostatakarzinoms zurückzuführen, weitere Ursachen sind der Rückgang von Lungen- und Speiseröhrentumoren mit ungünstiger Prognose bei gleichzeitigem Anstieg von Brustkrebserkrankungen mit günstiger Prognose (Batzler et al. 2008, Willich et al. 2002).

Die häufigste Krebsart beim Mann ist das Prostatakarzinom mit 58.570 jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland, gefolgt von Darmkrebs mit 37.250 und Lungenkrebs mit 32.850. Bei der Frau ist die häufigste Krebserkrankung das Mammakarzinom mit 57.230 Neuerkrankungen pro Jahr (24.5%) und einem mittleren Erkrankungsalter von 63 Jahren, wobei 40% der erkrankten Frauen unter 60 Jahre alt sind. Bei Frauen im Alter zwischen 35 und 55 Jahren ist das Mammakarzinom mit 18% aller Krebstodesfälle die häufigste Todesursache. Zweithäufigste Tumorerkrankung ist der Darmkrebs mit 36.000, gefolgt von Lungenkrebs mit 13.190 jährlichen Neuerkrankungen (Batzler et al. 2008).

#### 2.2. Therapie von Tumorerkrankungen

Die drei Säulen der Krebstherapie sind die Operation, die Strahlentherapie und die zytostatische Therapie. Meistens kommt, je nach Tumorentität, eine Kombination dieser Verfahren zum Einsatz. Die Grundlage der Krebstherapie ist die vollständige operative Entfernung, die jedoch nur unter makroskopischen Bedingungen zur Anwendung kommt. Es besteht somit die Gefahr, dass in der Peripherie des Primärtumors oder in umliegenden Lymphknoten mikroskopisch kleine Tumorreste zurückbleiben. Durch Kombination mit Strahlentherapie oder zytostatischer Therapie kann dieses Risiko minimiert werden. Die zytostatische Therapie besteht in der systemischen Applikation von Medikamenten, die als

Zellgifte die Tumorzellen abtöten sollen. Die systemische Therapie hat den Vorteil, dass auch metastatische Absiedelungen und kleinste Tumoranteile getroffen werden können. Gleichzeitig werden die Therapiemöglichkeiten dadurch limitiert, dass auch gesunde Körperzellen den Noxen ausgesetzt sind und Schaden nehmen können, wodurch es regelmäßig zu massiven Nebenwirkungen kommt, wie Blutarmut, Haarausfall, Entzündungen der Mundschleimhaut, Übelkeit und Erbrechen. Bei der Strahlentherapie wird kurzwellige Gammastrahlung und Röntgenstrahlung dazu benutzt, lokal Krebszellen zu zerstören. Strahlentherapie kann heute gezielt und schonend eingesetzt werden. Dennoch sind auch hier umliegende gesunde Gewebe betroffen, so dass lokale Nebenwirkungen beobachtet werden.

### 2.2.1. Die kurative Strahlentherapie

Das Ziel der kurativen Strahlentherapie ist es, unter gleichzeitiger maximaler Schonung der umliegenden gesunden Gewebe eine möglichst hohe Dosis in den Tumor und sein mögliches Ausbreitungsgebiet einzustrahlen. Die Strahlentherapie kann als alleinige Therapieform eingesetzt werden. Auf diese Weise kann die Organ- und Funktionserhaltung berücksichtigt werden. Bei den meisten Patienten wird jedoch eine Kombinationstherapie der Strahlentherapie mit einer Operation eingesetzt, um eine Heilung zu erreichen. Hierbei unterscheidet man die neoadjuvante von der adjuvanten Bestrahlung. Die neoadjuvante Bestrahlung wird im Vorfeld einer Operation zur Tumorverkleinerung durchgeführt, und hat eine bessere Operabilität zum Ziel. Die adjuvante Bestrahlung kommt nach der Operation zum Einsatz zur Abtötung möglicher Tumorreste im Tumorbett und im Bereich der regionären Lymphknoten. Es besteht auch die Möglichkeit, intraoperativ zu bestrahlen. Hier wird das Tumorbett unmittelbar nach der operativen Entfernung des Tumors direkt bestrahlt, um postoperativ verbliebene Resttumorzellen abzutöten.

#### 2.2.2. Strahlentherapie als palliative Maßnahme

Die Verbesserung der Lebensqualität von Tumorpatienten durch Linderung der tumorbedingten Symptome ist ein weiteres wichtiges Aufgabengebiet der Strahlentherapie. Die häufigsten Zuweisungsdiagnosen zur palliativen Bestrahlung sind durch den Tumor oder Knochenmetastasen bedingte Schmerzen. Weitere akut bedrohliche Symptome, die palliativ behandelt werden, sind Einengungen z.B. des Luftröhren- und Bronchialsystems, der Speiseröhre oder des Gallenganges. Die drohende Querschnittlähmung, Hirnmetastasen, Einflussstauung und Blutungen sind weitere Indikationen. Oftmals ist es in diesen Fällen möglich, mit wenigen Bestrahlungen eine rasch eintretende und sehr effektive Symptomlinderung zu erreichen.

#### 2.3. Strahlenwirkung auf Zellen

Die zelluläre Zielstruktur für ionisierende Strahlung ist die DNA. Durch Photonen oder Sekundärelektronen kann es zu Ionisationen in der DNA kommen, welche das Potential zu vielfältigen strukturellen Veränderungen der Chromosomen haben. Einzelne Ionisationen können zu Basenschäden oder Einzelstrangbrüchen führen, diese Läsionen finden sich am häufigsten (Basenschäden ca. 3.000 pro Gy und Zelle, Einzelstrangbrüche ca. 1.000 pro Gy und Zelle). Treten mehrere Ionisationen dicht beieinander auf, können gehäufte Läsionen und Doppelstrangbrüche entstehen. Die Zahl der Doppelstrangbrüche liegt bei ca. 40 pro Gy und Zelle. Durch die Induktion von letalen Chromosomenaberrationen verliert die Zelle sukzessive über mehrere Generationen genetische Information und daraus folgend stirbt die Zelle. Nicht-letale Chromosomenaberrationen hingegegen werden an die Tochterzellen weitergegeben und bewirken eine onkogene Transformation der Zellen.

Einige Strahlenschäden weisen eine Schwellendosis auf, unterhalb der keine Schäden zu erwarten sind. Oberhalb des Schwellenwertes dagegen steigen die Schäden mit Diese Strahlenschäden werden als zunehmender Dosis an. deterministische Strahlenschäden bezeichnet. Zu den deterministischen Schäden gehört auch der Verlust der Zellteilungsfähigkeit (klonogener Zelltod), der im Rahmen einer Strahlentherapie für die Vernichtung eines Tumors genutzt wird. Hiervon unterschieden werden stochastische Strahlenschäden, die unabhängig von der Strahlendosis auftreten. Sie können schon bei äußerst geringer Strahleneinwirkung auftreten und führen meistens zur Zelltransformation, beispielsweise zur Bildung eines Zweit-Tumors nach Strahlentherapie.

Sowohl für Einzelstrangbrüche als auch für Doppelstrangbrüche und Basenschäden stehen der Zelle verschiedene Reparaturmechanismen zur Verfügung. Schäden, bei denen noch ein intakter Einzelstrang vorhanden ist (Einzelstrangbrüche und Basenschäden) werden enzymatisch über eine Basenexzisionsreparatur meist fehlerfrei behoben (Dikomey und Lorenzen 1993, Fohe und Dikomey 1994). Hierbei wird durch eine Exzisions-Endonuklease ein Teil des beschädigten DNA-Strangs herausgeschnitten, und anschließend das fehlende Stück nach Vorgabe des intakten DNA-Strangs durch weitere Enzyme wiederhergestellt. Doppelstrangbrüche dagegen verfügen nicht über diese Rekonstruktionsmatrize. Daher gibt es hier zwei andere Mechanismen, die Nicht-Homologe Endverknüpfung (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR), wobei die NHEJ der dominante Reparaturweg ist. Bei der NHEJ werden die freien Enden eines Doppelstrangbruches durch Ku-Proteine erkannt und markiert, so dass diese durch spezifische Enzyme wieder zusammengefügt werden können. Für die HR hingegen wird das Schwesterchromosom als Vorlage hinzugezogen.

Werden Doppelstrangbrüche nicht zu 100% repariert, können sie zu letalen Chromosomenaberrationen, wie terminalen und interstitiellen Deletionen, sowie zu dizentrischen Chromosomen führen. Diesen Aberrationstypen ist die Bildung eines azentrischen Fragmentes gemeinsam, das in der Mitose aufgrund des fehlenden Zentromers zur Bildung eines Mikrokerns führt und für die Zelle den Verlust der auf diesem Abschnitt befindlichen Gene bedeutet. Dieser als mitotische Zelltod bezeichnete Vorgang führt zum Verlust des genetischen Materials und daraus folgend zu einem Mangel an essentiellen Proteinen, wodurch die Zelle in den nächsten zwei bis drei Zellteilungen inaktiviert wird.

Eine in der Strahlenbiologie sehr wichtige Definition ist der Begriff des klonogenen Zelltodes. Primär klonogene Zellen (mit Potential zur Bildung von Kolonien) verlieren durch Bestrahlung ihre Fähigkeit zum Wachstum. Die Zellen bleiben dabei zunächst intakt und durchlaufen noch einige Mitosen, bevor sie untergehen. Ursächlich hierfür sind verschiedene Mechanismen, zu denen der zuvor beschriebene Mitosetod gehört.

Ein weiterer Mechanismus für eine Zellinaktivierung ist die Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Hierbei wird die DNA durch Endonukleasen in definierte Abschnitte aufgespalten. Diese Chromatinfragmente werden zusammen mit den Zellorganellen durch Aussprossen und Einschnüren der Zellmembran in sogenannte apoptotische Körper eingeschlossen, die wiederum von umgebenden Zellen phagozytiert werden. Die Apoptose wird vor allem in embryonalen und hämatopoetischen Zellen beobachtet. In vielen anderen Zelltypen, wie beispielsweise Fibroblasten, spielt die Apoptose dagegen nur eine untergeordnete Rolle (Dikomey et al. 2003). Dementsprechend gering ist ihr Wert bei der Behandlung solider Tumoren, im Gegensatz zu Lymphomen und Leukämien.

Durch Bestrahlung kann zudem eine Differenzierung von Zellen induziert werden. Hierbei entstehen aus zunächst klonogenen Zellen schließlich teminale Funktionszellen, die keine Kolonien mehr bilden können. Dieser Mechanismus findet sich beispielsweise bei der Entstehung funktioneller Fibrozyten im Rahmen einer radiogenen Fibrose (Bayreuther et al. 1988).

Die Inaktivierung von Zellen durch den klonogenen Zelltod kann über den so genannten Kolonietest gemessen werden: In eine Schale mit Nährmedium werden 100 Zellen ausgesät, anschließend werden die Zellen mit 2 Gy, entsprechend der Dosis pro Fraktion einer Strahlentherapie, bestrahlt. Eine Kontrollschale mit ebenfalls 100 Zellen bleibt unbestrahlt. Nach Inkubation der Zellen für etwa zwei Wochen werden diejenigen Kolonien gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestehen. Hieraus lassen sich zwei Parameter ableiten:

1. Die Angehrate: Sie beschreibt den Anteil der Zellen aus der unbestrahlten Kontrollprobe, die eine entsprechend große Kolonie gebildet haben. Bei 20 Kolonien und 100 ausgesäten Zellen beträgt die Angehrate 20%.

2. Die Überlebensfraktion (surviving fraction, SF): Dies ist die Anzahl der Kolonien in der bestrahlten Probe im Verhältnis zur Anzahl der Kolonien in der Kontrollprobe. Im Falle einer Angehrate von 20% und 10 entstandenen Kolonien in der bestrahlten Probe ergibt sich eine SF von 10/20 = 0,5.

In strahlenbiologischen Untersuchungen wird häufig die SF2 (SF bei einer Bestrahlung mit 2 Gy) dazu benutzt, die intrinsische Strahlenempfindlichkeit eines Gewebes anzugeben. Je empfindlicher die Zellen eines Gewebes auf Bestrahlung reagieren, desto größer ist der Verlust ihrer Teilungsfähigkeit, der sich in einer verminderten SF2 äußert. Zwischen unterschiedlichen Geweben besteht eine große Variabilität der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit, ebenso zwischen verschiedenen Tumoren. Da die Strahlenempfindlichkeit aus einer Teilungsinaktivierung von Zellen resultiert, lässt sich daraus folgern, dass sich die Effekte einer Bestrahlung besonders stark in Zelllinien beobachten lassen, die eine hohe Teilungsrate aufweisen. Entsprechend gut lassen sich besonders Tumoren mit hoher Teilungsrate (undifferenzierte Tumoren) strahlentherapeutisch behandeln.

#### 2.4. Strahlenwirkung auf Tumoren

Das Ziel der kurativen Strahlentherapie ist die Tumorvernichtung (lokale Tumorkontrolle). Dazu müssen sämtliche Zellen eines Tumors abgetötet werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Tumorvernichtung erhöht sich dabei mit zunehmender Gesamtdosis der Strahlentherapie. Bereits 1936 wurde von Holthusen (Holthusen 1936) eine Dosiseffektkurve mit sigmoidaler Charakteristik für die lokale Tumorkontrolle veröffentlicht, in der die Tumorkontrollrate oberhalb einer Schwellendosis steil ansteigt und in höheren Dosisbereichen wieder abflacht. Aus derartigen Dosiseffektkurven kann die Dosis abgeleitet werden, die nötig ist, um 50% der Tumoren zu kontrollieren (TCD50). Die wichtigsten Einflussfaktoren auf die lokale Tumorkontrolle sind neben der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit das Tumorvolumen, die Histologie, die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen und die Gesamtbehandlungsdauer der fraktionierten Bestrahlung. Zusätzlich kann die lokale Tumorkontrolle durch Kombination mit weiteren Verfahren, wie Chirurgie oder Chemotherapie, erhöht werden.

Neben der lokalen Tumorkontrolle werden die Tumorregression und die Wachstumsverzögerung als mögliche Bestrahlungsreaktionen eines Tumors unterschieden. Die Tumorregression beschreibt die Schrumpfung eines Tumors infolge einer Bestrahlung. Tumoren zeigen jedoch sehr unterschiedliche Regressionsgeschwindigkeiten, so dass die Aussagekraft für einen möglichen Therapieerfolg sehr gering ist. Zudem können Tumoren nach einer Bestrahlung zunächst noch weiter wachsen, bevor eine Regression eintritt. Für die kurative Strahlentherapie ist dieser makroskopische Parameter von untergeordneter Rolle, er hat jedoch einen Stellenwert in der palliativen Strahlentherapie. Als

Tumorwachstumsverzögerung wird die Zeit bezeichnet, nach der ein bestrahlter Tumor im Vergleich zu einem unbestrahlten Kontrolltumor auf ein spezifisches Volumen gewachsen ist. Das Ziel der kurativen Strahlentherapie ist jedoch die Tumorkontrolle, die mit der dosisabhängigen Vernichtung aller Tumorzellen einhergeht. Schäden an Normalgeweben sollen dabei so gering wie möglich gehalten werden, nehmen aber ebenfalls mit steigender Gesamtdosis zu. Aus diesen beiden Faktoren wurde das therapeutische Fenster der komplikationsfreien Heilung entwickelt, das noch heute zur Therapie von Tumoren angewendet wird.

#### 2.5. Strahlenreaktionen von Normalgewebe

Bei einer Tumorbestrahlung im Rahmen einer Strahlentherapie sind auch immer gesunde Zellen der schädigenden Strahlenwirkung ausgesetzt. Die Toleranz der Normalgewebe limitiert oft die am Tumor applizierbare Dosis. Diese auch als Toleranzdosis (TD) bezeichnete Dosis richtet sich nach der allgemein akzeptierten Nebenwirkungsrate eines bestimmten Organs mit einem bestimmten Fraktionierungsschema und hängt neben Inzidenz und Schweregrad der Nebenwirkung von vielen Faktoren ab, wie z.B. der Risikobereitschaft von Arzt und Patient, vom Therapieziel (kurativ/palliativ) und von gesetzlichen Rahmenbedingungen. In diesem Zusammenhang wurde die TD5/5 eingeführt, Dosis, bei der ein spezifischer Effekt nach einem d.h. diejenige typischen Behandlungsschema innerhalb von fünf Jahren bei 5% der Patienten auftritt. Es handelt sich hierbei um gemittelte Erfahrungswerte, bei denen maximal 5% der Strahlentherapie-Patienten eine überdurchschnittliche und rund 1% eine starke radiogene Nebenwirkung entwickeln. Eine Voraussage dieser 5% der Patienten würde für die anderen 95% der Patienten eine Erhöhung der Dosis mit einer um ca. 20% erhöhten Heilung ermöglichen (Norman et al. 1988).

Die Häufigkeit des Auftretens oder der Schweregrad von Normalgewebsreaktionen lässt sich durch verschiedene therapiebedingte Faktoren beeinflussen. Die wichtigsten sind die Aufteilung der Gesamtdosis auf Fraktionen, die Einhaltung eines ausreichend großen Zeitintervalls zwischen den Fraktionen und die Reduktion des bestrahlten Organvolumens. Akutreaktionen Speziell können zudem verringert werden, wenn die Gesamtbehandlungsdauer verlängert oder eine Bestrahlungspause eingelegt wird. Eine Verminderung der Sauerstoffkonzentration im Gewebe oder die Stimulation der Regeneration eines Gewebes, z.B. durch Wachstumsfaktoren, ist vorsichtig anzuwenden, da Modifikationen der Tumorzellen ausgeschlossen werden müssen.

11

#### 2.5.1. Akute und späte Strahlenreaktionen

Je nach zeitlichem Verlauf werden die Reaktionen der umgebenden Normalgewebe in Akutreaktionen und späte Strahlenreaktionen eingeteilt. Akutreaktionen sind hierbei auf einen Zeitraum von 90 Tagen nach Bestrahlungsbeginn begrenzt und heilen nach Beendigung der Bestrahlung meistens wieder ab. Als eine Ausnahme dieser Regel sind die konsekutiven Späteffekte anzusehen, bei denen es aufgrund eines besonders schweren akuten Schadens zum Zusammenbruch der Schutzfunktion der Zellen gegenüber mechanischen bzw. chemischen Noxen kommen kann, beispielsweise zu einer narbigen Ausheilung (Dorr und Hendry 2001).

Beispiele für so genannte akute Effekte sind der Strahlenkater mit Störungen des Appetits, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindelgefühl. Bedeutend häufiger treten jedoch akute Nebenwirkungen an der Haut auf, insbesondere bei der Bestrahlung des Mammakarzinoms. Sie erstrecken sich über ein Spektrum von einfachen Hautreaktionen wie Erythemen über Ulzerationen bis hin zur Nekrose.

Späte Strahlenreaktionen hingegen, die erst nach Monaten bis Jahren auftreten, sind nicht reversibel und oft progredient, weswegen sie auch als chronische Nebenwirkungen bezeichnet werden. Sie sind meist das Resultat einer fibrotischen Veränderung des Ausgangsgewebes, die zu einem Elastizitätsverlust und einer Schrumpfung des Gewebes bis hin zu einem entsprechenden Funktionsverlust führen können.

Ob ein Gewebe akute oder späte Nebenwirkungen zeigt, hängt vor allem von der proliferativen Struktur des betroffenen Gewebes ab. Hierbei werden Gewebe mit hierarchischer Struktur (H-Typ) von Geweben mit flexibler Struktur (F-Typ) unterschieden (Herrmann et al. 2006). Gewebe vom H-Typ zeichnen sich durch einen hohen Zellumsatz, kurze Zellzyklusdauer und hohe Repopulierungsfähigkeit aus (z.B. Epithelien oder Zellen der Hämatopoese). Diese Gewebe reagieren hauptsächlich akut. Die Gewebe vom F-Typ hingegen reagieren meist spät. Sie sind durch einen niedrigen Zellumsatz, eine lange Zellzyklusdauer und eine geringe Repopulierungsfähigkeit gekennzeichnet (vor allem parenchymatöse Organe wie Leber, Lunge, Nieren oder Nervengewebe).

#### 2.5.2. Erfassungsmethoden

Eine Einteilung der akuten und späten Normalgewebereaktionen nach Bestrahlung wurde Mitte der 80er Jahre durch die Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) und die European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) vorgenommen (Cox et al. 1995). Speziell für Spätreaktionen wurde zudem 1995 die LENT-SOMA-Klassifizierung eingeführt, die sich aufgrund ihrer Detailgenauigkeit vor allem für klinische Studien gut eignet. Für die Einteilung der RTOG wurden sowohl verschiedene Organsysteme gesondert betrachtet als auch frühe und späte Nebenwirkungen separat kategorisiert. Die Gewebereaktionen wurden jeweils in Schweregrade von 0-5 eingeteilt. Der Grad 0 bedeutet keine Reaktion, Grad 5 dagegen bedeutet den Tod des Patienten durch Strahlenwirkung. Am Beispiel der frühen Reaktionen der Haut beobachtet man bei Grad 1 leichte Rötung, trockene Schuppung und verminderte Schweißsekretion. Großflächigere Rötungen, Desquamationen und Ödembildung werden je nach Ausprägung den Graden 2-3 zugeordnet. Bei Grad 4 liegen bereits Hämorrhagien, Ulzerationen und Nekrosen vor.

Die Einteilung der späten Reaktionen nach der RTOG erfolgte, analog zu den Frühreaktionen, ebenfalls in Schweregrade von 0-5. Ein häufiges Erscheinungsbild später Reaktionen in vielen Geweben ist die Fibrosierung (z.B. subkutanes Gewebe, Speicheldrüsen, Lunge) und später Ulzerationen oder Nekrosen (z.B. Haut, Subkutangewebe, Larynx).

Zur Erfassung mehrerer Nebenwirkungen der Haut kann das daran angelehnte CTC-System common toxicity criteria) (National Cancer Institute 2006) mit möglichen Modifikationen (Twardella et al. 2003) herangezogen werden. Es ist auch möglich, eine Klassifizierung mittels spektrophotometrischer Hautanalysen durchzuführen. Es konnte gezeigt werden, dass Ergebnisse der spektrophotometrischen Analyse der Haut mit den mittels RTOG- bzw. LENT/SOMA-Klassifizierungssystems beobachteten Nebenwirkungen korrelierten (Momm et al. 2005).

#### 2.5.3. Entstehungsursachen

Für die Variation im Ausmaß der Normalgewebereaktion nach Bestrahlung wird eine Vielzahl von Parametern verantwortlich gemacht (West et al. 1991). Neben externen interindividuellen Faktoren wie Alkohol- und Nikotinabusus, Komorbidität, systolischer Blutdruck, menopausaler Status, begleitende Medikamente, Alter der Patienten, der endogene Hormonhaushalt, das Immunsystem sowie verschiedene Umwelteinflüsse, wie z.B. Infektionen, Schadstoffe und Ernährung (Bundesamt für Strahlenschutz 2007), nehmen vor allem radiologische, therapieabhängige Faktoren Einfluss auf die Ausprägung von Frühund Späteffekten (Herrmann et al. 2006). Zu diesen zählen vor allem die pro Fraktion applizierte Dosis, die Gesamtdosis, die Gesamtbehandlungszeit, das Zeitintervall zwischen den Fraktionen und das Bestrahlungsvolumen, wobei die Höhe der Dosis und das Bestrahlungsvolumen sind (West et al. 2005).

Das Ausmaß der Normalgewebereaktionen kann erheblich variieren, auch unter Verwendung identischer Behandlungsprotokolle. So konnten Turesson et al. (Turesson et al. 1996) eine extreme Variation in der Ausprägung der späten Nebenwirkung Teleangiektasie für ein Kollektiv von 30 Patientinnen zeigen, welche uniform mit 1.8 Gy pro Fraktion und einer Gesamtdosis von 63 Gy aufgrund eines Mammakarzinoms bestrahlt wurden. Nach

detaillierter Analyse der prognostischen Faktoren für das Auftreten von Nebenwirkungen unter Berücksichtigung von acht behandlungsbedingten und zwölf patientenbedingten Faktoren kamen die Autoren zu dem Schluss, dass nur 20-27% der Heterogenität auf eine durch die Therapie bedingte Variation zurückzuführen seien, der Rest auf nicht spezifizierte genetisch bedingte Unterschiede, welche sich in einer individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit manifestieren. Ein bekanntes Beispiel für eine solche genetisch bedingte erhöhte Strahlenempfindlichkeit ist das ATM-Gen und dessen Krankheitsbild Ataxia teleangiectatica (vgl. Kapitel 2.5.3.1).

Der zellulären Sensitivität als Korrelat der menschlichen individuellen Strahlenempfindlichkeit gegenüber ionisierender Bestrahlung wird eine große Bedeutung zugeschrieben. Dieser Parameter wurde generell durch Untersuchungen an Lymphozyten oder Fibroblasten von Patienten überprüft, indem nach in vitro Bestrahlung verschiedenste Testverfahren eingesetzt wurden, wie beispielsweise die Koloniebildungsfähigkeit oder die Anzahl von Chromosomenaberrationen bzw. Doppelstrangbrüchen (Barber et al. 2000, Brock et al. 1995, Burnet et al. 1992, Geara et al. 1993, Johansen et al. 1996, Jones et al. 1995, Kiltie et al. 1999, Neubauer et al. 1997, Oppitz et al. 2001, Peacock et al. 2000, Rudat et al. 1997, Rudat et al. 1999, Russell et al. 1998).

#### 2.5.3.1. Genetische Faktoren der individuellen Strahlenempfindlichkeit

In vielen Untersuchungen wurde beobachtet, dass trotz identischen Fraktionierungsschemas sowohl in den akuten als auch in späten Normalgewebereaktionen auf eine Strahlentherapie sehr deutliche Unterschiede festzustellen waren (Bentzen und Overgaard 1994, Borger et al. 1994, Burnet et al. 1998, Safwat et al. 2002, Tucker et al. 1992, Turesson 1990, Turesson et al. 1996). Unter Berücksichtigung von Variationen in der Therapie kamen die Autoren zu dem Schluss, dass 70% der Unterschiede auf die individuelle, genetisch determinierte Strahlenempfindlichkeit der Patienten zurückzuführen sind und nur bis zu 27% auf Therapievariablen (Turesson et al. 1996).

Potentielle Mechanismen, die zur Entstehung von frühen und späten Strahlenschäden führen, sind strukturelle und funktionelle Veränderungen des Gewebes, die auf Prozesse des Absterbens der Zelle, wie Apoptose, Nekrose, mitotischer Zelltod oder permanenten G1-Arrest mit folgender terminaler Differenzierung des Gewebes zurückzuführen sind. Ausgangspunkt dieser Prozesse kann die fehlerhafte Expression von Genen sein, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind sein.

Einige derartige Gendefekte sind bereits lang bekannt. Bei der Krankheit Ataxia teleangiectatica (AT) liegt ein Defekt des ATM-Gens vor, das eine Proteinkinase kodiert, die eine wichtige Rolle bei DNA-Reparaturprozessen spielt. Patienten mit dieser Erkrankung fielen auf durch ausgeprägte Nebenwirkungen schon während bzw. nach einer

Strahlentherapie, die in vielen Fällen kurz nach Abbruch der Therapie zum plötzlichen Tod der Patienten geführt haben. Diese extremen Reaktionen waren gekoppelt mit einer Hypersensitivität in vitro, so dass AT das klassische zelluläre Modell der menschlichen Strahlenempfindlichkeit wurde (Taylor et al. 1975).

#### 2.5.4. Testverfahren

Die meisten Personen mit einer erhöhten individuellen Strahlenempfindlichkeit sind äußerlich unauffällig, so dass im Vorfeld einer strahlentherapeutischen Behandlung nicht ersichtlich ist, ob mit einem vermehrten Auftreten strahleninduzierter Nebenwirkungen zu rechnen ist. Im klinischen Alltag hat sich daher das Toleranzdosiskonzept etabliert. Die TD5/5 bezeichnet hierbei die Dosis, bei der bei 5% der Patienten innerhalb von 5 Jahren bestimmte Effekte zu erwarten sind. Wenn diese 5% im Vorfeld der Therapie identifiziert werden könnten, so ließe sich die Dosis bei den restlichen 95% der Patienten erhöhen, was mit einer erhöhten Heilungschance von bis zu 20% einherginge (Norman et al. 1988).

Zur Identifizierung von strahlenempfindlichen Personen sind bereits viele Testverfahren entwickelt worden, die auf molekularbiologischen, zytogenetischen oder zellulären Methoden basieren. So wurde auch die DNA-Reparaturfähigkeit von Zellen untersucht über den Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen und unter Verwendung verschiedener Verfahren, wie dem Comet-Assay oder der Metaphasentechnik.

Als Targetzellen wurden zunächst Fibroblasten charakterisiert, für die einige Studien eine deutlich erhöhte Strahlenempfindlichkeit in vitro bei klinisch auffälligen Patienten nachweisen konnten (Burnet et al. 1992, Burnet et al. 1996, Johansen et al. 1996, Kiltie et al. 1999, Loeffler et al. 1990, Russell et al. 1998). Weitere, vor allem größere Studien konnten jedoch keine Beziehung von zellulärer Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten und klinischer Reaktion nachweisen (Brock et al. 1995, Geara et al. 1993, Rudat et al. 1997, Rudat et al. 1999). Stattdessen haben sich Untersuchungen an peripheren Lymphozyten als sehr vielversprechend herausgestellt. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Untersuchung von Lymphozyten sehr gut mit klinischen Endpunkten korreliert, wie beispielsweie dem Auftreten von späten Nebenwirkungen nach Strahlentherapie (Borgmann et al. 2002, El-Awady et al. 2005, Hoeller et al. 2003).

Insbesondere die Bestimmung der azentrischen Chromosomenfragmente in Lymphozyten hat sich als ein potentieller Marker etabliert (Borgmann et al. 2008, Hoeller et al. 2003). Unklar ist jedoch, ob die Bestimmung der azentrischen Chromosomenfragmente durch eine vorangegangene Therapie modifiziert wird. Das hätte die Konsequenz, dass zukünftige Untersuchungen zur Entwicklung prädiktiver Testverfahren nur an Zellen durchgeführt werden dürften, die bereits vor einer Strahlentherapie isoliert wurden.

#### **3. MATERIAL UND METHODEN**

In dieser Arbeit wurden acht gesunde Kontrollspender, 20 Patienten vor bzw. nach Strahlentherapie und 50 Patienten nach Strahlentherapie aufgrund eines Mammakarzinoms in Kooperation mit Frau PD Dr. Ulrike Höller aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf untersucht. Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor. Die 20 Patienten, die sowohl vor als auch nach Strahlentherapie untersucht wurden, entstammten einem Kollektiv von 51 Patienten, deren Chromosomenaberrationen bereits im Rahmen einer vorherigen Studie bezüglich der akuten Nebenwirkungen nach Strahlentherapie untersucht wurden (Bernhard 2002).

Pat.	Lok.1	Geschlecht	Alter	AR (RTOG) <sup>2</sup>	TNM- Klassifikation	Dosis <sup>3</sup> [Gy]	ED⁴ [Gy]	Tumorart
1	KH	w	38	3	M1	50,4	1,8	Hämangioperizytom
2	KH	m	58	2	pT2 pN2b M0	60	2	Tonsillenkarzinom
3	KH	m	58	1	pT2 pN2b M0	60	2	Mundhöhlenkarzinom
4	ΤН	m	66	1	pT3 pN0 cM0	66	2	Bronchialkarzinom
5	KH	m	69	3	pT4 pN2b M0	66	2	Oropharynxkarzinom
6	KH	w	49	1	pT4 pN0 M0	66,6	1,8	Karzinom der Gl.Parotis
7	В	m	56	2	pT3 cN0 M0	50,5	1,8	Prostatakarzinom
8	KH	m	49	1	pT4 pN0 cM0	60	2	Larynxkarzinom
9	ΤН	m	65	0	T3 N0 M0	50	2	Bronchialkarzinom
10	KH	m	60	2	pT2 pN0 M0	60	2	Mundhöhlenkarzinom
11	KH	m	49	3	pT1b pN2b M0	60	2	Mundhöhlenkarzinom
12	В	m	69	2	(Rezidiv)	64,8	1,8	Prostatakarzinom
13	KH	w	62	3	pT1-2 N0 M0	60	2	Mundhöhlenkarzinom
14	ΤН	w	68	0	pT2 pN2 M0	60	2	peripheres Bronchialkarzinom
15	В	m	69	2	(Rezidiv)	59,4	1,8	Weichteil-Sarkom
16	В	m	62	1	pT2 N0 M0	59,4	1,8	Weichteil-Sarkom
17	TH	w	61	1	pT3 pN2 M0	50,4	1,8	Bronchialkarzinom
18	В	m	41	1	Tx N1 M0	50,4	1,8	Plattenepithelkarzinom d. Leiste
19	КН	m	54	3	pT2 pN0 cM0	60	2	Zungenkarzinom
20	КН	m	46	2	pT4 pN0 cM0	60	2	Mundhöhlenkarzinom

Tab. 1	:	Auflistung	der	Patientendaten
--------	---	------------	-----	----------------

<sup>1</sup>Tumorlokalisation: KH (Kopf-Hals), TH (Thorax), B (Becken); <sup>2</sup>Akutreaktionen nach Strahlentherapie, eingeteilt nach dem RTOG-Score; <sup>3</sup>Applizierte Gesamtdosis im Rahmen der Strahlentherapie; <sup>4</sup>Einzeldosen der fraktionierten Strahlentherapie

Die Patienten unterschieden sich in Alter, Geschlecht und Tumorentität. Zusätzliche Differenzierungsmöglichkeiten ergaben sich aus der TNM-Klassifikation der Tumoren, einer erfolgten Chemotherapie, der verabreichten Strahlendosis während der Therapie, dem Ausmaß der akuten Reaktionen auf die Strahlentherapie sowie Nikotin- und Alkoholgewohnheiten. Als Kontrollgruppe dienten mehrere gesunde Kontrollspender und ein Patientenkollektiv, das aufgrund eines Mamma-Karzinoms bestrahlt wurde.

#### 3.1. Das TNM-System

Das TNM-System wurde von der Union internationale contre la cancer (UICC) vorgeschlagen, und dient der Klassifizierung maligner Tumoren (Sobin und Wittekind 2002). Es beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors (T = Tumor), das Vorhandensein von regionärem Lymphknotenbefall (N = Nodulus) sowie von Fernmetastasen (M = Metastase). Durch das Hinzufügen von Zahlen (T0-T4, N0-N3, M0-M2) wird das Ausmaß der entsprechenden Kategorie definiert. Zusätzlich kann durch das Präfix p verdeutlicht werden, dass die Diagnose postoperativ gestellt wurde. Durch das TNM-System wird eine internationale Standardisierung der Diagnosestellung und der Behandlung erreicht.

#### 3.2. Der RTOG-Score

Um eine einheitliche Darstellung von Gewebereaktionen auf ionisierende Strahlen zu ermöglichen wurden von der Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) Anfang der 80er Jahre Kriterien zur Klassifizierung akuter und später Strahlenreaktionen entwickelt. In tabellarischer Form sind für verschiedene Gewebe, wie z. B. Haut, Herzmuskel, ZNS u.a., die Strahlenreaktionen in Kategorien von 0 bis 5 eingeteilt. So bedeutet für die Akutreaktionen der Haut ein RTOG-Score von 1 keine Reaktion, ein Score von 4 dagegen Ulzerationen, Hämorrhagien und Nekrosen. Ein Score von 5 beschreibt den Tod des Patienten durch die Strahlenwirkung (Cox et al. 1995).

Dieser Score wurde für die Beschreibung der Akutreaktionen des Patientenkollektivs im Rahmen dieser Studie zugrunde gelegt. Zusätzlich wurde der Zustand der Patienten zu Beginn der Studie einbezogen und so ein Differenzscore errechnet.

#### 3.3. Das Patientenkollektiv

Das Alter der 15 männlichen und 5 weiblichen Patienten variierte zwischen 41 und 72 Jahren. Hinsichtlich der Tumorlokalisation konnten drei Gruppen unterschieden werden: Elf Tumoren fanden sich im Kopf-Hals-, vier im Thorax- und fünf im Beckenbereich.

Die Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches ließen sich in fünf Mundhöhlen-Karzinome, jeweils ein Zungen-, Tonsillen-, Larynx- und Oropharynx-Karzinom, ein Hämangioperizytom und einen Speicheldrüsentumor der Glandula Parotis unterteilen. Acht der Kopf-Hals-Tumoren erhielten während der Strahlentherapie eine Gesamtdosis von 60 Gy, aufgeteilt in Einzeldosen (ED) von jeweils zwei Gy. Die Bestrahlung des Parotis-Tumors erfolgte mit 66,6 Gy (ED 1,8 Gy), des Hämangioperizytoms mit 50,4 Gy (ED 1,8 Gy) und des Oropharynx-Karzinoms mit 66 Gy (ED 2 Gy). Von den 11 Kopf-Hals-Tumoren waren einer als pT1, vier als pT2 und vier als pT4 klassifiziert. Ein Mundhöhlen-Karzinom wurde als pT 1-2 eingestuft. Regionärer Lymphknotenbefall lag in fünf Fällen in Form von N2 vor. Das Hämangioperizytom war lediglich als M1 klassifiziert. Dieser Patient unterschied sich zudem von allen anderen durch eine erhaltene Chemotherapie. Die akuten Reaktionen auf die Strahlentherapie zeigten einen Differenzscore von RTOG 1 in drei, von RTOG 2 in ebenfalls drei und RTOG 3 in fünf Fällen. Vier der Patienten mit Kopf-Hals-Tumor sind Raucher, drei sind Nichtraucher, vier Patienten haben das Rauchen vor bis zu 20 Jahren aufgegeben. Alkoholabusus lag in sechs Fällen vor.

Bei den vier Tumoren im Thorax-Bereich handelte es sich ausschließlich um Bronchialkarzinome, von denen eines als pT2, eines als T3 und zwei als pT3 klassifiziert wurden. In zwei Fällen lag Lymphknotenbefall in Form von pN2 vor. Fernmetastasen waren bei keinem der vier Patienten bekannt. Die Bestrahlung der einzelnen Tumoren erfolgte mit einer Gesamtdosis von 50 Gy (ED 2 Gy), 50,4 Gy (ED 1,8 Gy), 60 Gy (ED 2 Gy) und 66 Gy (ED 2 Gy). Keiner dieser Patienten erhielt eine Chemotherapie. In zwei Fällen traten Akutreaktionen auf, die einen Differenzscore von RTOG 1 aufwiesen. Unter den vier Patienten waren ein Nichtraucher, ein Raucher, und zwei ehemalige Raucher, von denen einer das Rauchen bereits vor über 30 Jahren aufgegeben hatte. Bei einem der Patienten lag Alkoholabusus vor.

Die Beckentumoren gliederten sich in zwei Prostatakarzinome, zwei Weichteilsarkome und ein Plattenepithelkarzinom der Leiste. Es handelte sich um einen pT2- und einen pT3-Tumor, sowie zwei als Rezidive klassifizierte Tumore. In einem Fall ist die Größe des Primärtumors unbekannt. Einer der Tumoren zeigte regionären Lymphknotenbefall. Keiner der Patienten hatte Fernmetastasen. Die Tumoren erhielten bei Bestrahlung Gesamtdosen von 64,8 Gy (ED 1,8 Gy) in einem Fall, und in je zwei Fällen 59,4 Gy (ED 1,8 Gy) bzw. 50,4 Gy (ED 1,8 Gy). Keiner der Tumoren wurde mit einer Chemotherapie behandelt. Die Akutreaktionen erreichten einen Differenzscore von RTOG 1 in zwei Fällen, und von RTOG 2 in drei Fällen. Bei zwei der fünf Patienten lag Alkoholabusus vor, drei von ihnen waren Nichtraucher, zwei rauchten seit über 10 Jahren nicht mehr.

#### 3.4. Metaphasentechnik

Die Präparation der Chromosomen erfolgte mit der Metaphasentechnik. Der Einsatz dieser Technik unterbricht die Zellteilung in der Metaphase. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Chromosomen dicht kondensiert in der Äquatorialebene der sich teilenden Zelle, und sind so

bei entsprechender Färbung lichtmikroskopisch gut zu erkennen (Buselmaier 2006, Hirsch-Kauffmann und Schweiger 2006, Sperlich und Sperlich 2000).

Pro Patient wurden zwei Gewebekulturflaschen für eine Bestrahlung mit 6 Gy und zwei für unbestrahlte Kontrollen mit je 0,5 ml Vollblut beschickt. Das Blut wurde jeweils mit 4,5 ml RPMI-Medium (Gibco) versehen.

Nach der Bestrahlung wurde den Proben jeweils 125 µl Phytohämagglutinin (PHA) zugegeben. PHA, ein Lektin aus Phaseolus vulgaris, bewirkt, dass differenzierte T-Lymphozyten zur Teilung stimuliert werden. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen für 44 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, nach Ablauf dieser Zeit mit Colcemid (Colchicin) versehen und für weitere zwei Stunden in den Brutschrank gestellt. Colchicin ist ein Spindelfasergift, das die Ausbildung eines intakten Spindelfaserapparates in der mitotischen Zelle verhindert (Koecke et al. 2000). Dadurch wird die Zelle in ihrer weiteren Teilung behindert und verharrt so am Ende der Metaphase.

Die Zellkulturen wurden in Spitzbodenröhrchen (Falcon) überführt und für 5 min bei 1000 U/min und 20 °C zentrifugiert (Laborfuge 400R, Heraeus Instruments), so dass sich die Zellen am Boden absetzten. Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um restliche Serumbestandteile und Mediumreste zu entfernen, wurden die Zellen mit 12 ml PBS (phosphate-buffered saline) versehen und erneut für 5 min bei 1000 U/min und 20 °C zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe entfernt.

Durch tropfenweise Zugabe von 12 ml KCI (Sigma) auf dem Schüttler wurden die Zellen hypotonisch behandelt, wodurch es zu einer Volumenzunahme der Zellen kam. Erneut wurden die Zellen für 5 min bei 1000 U/min und 20 °C zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe entfernt.

Im Anschluss wurden die Zellen mit 12 ml Methanol/Essigsäure im Verhältnis 3:1 (Carnoy's Fixativ, Sigma) versehen, wodurch die vergrößerten Erythrozyten auf Grund der Wechselwirkungen mit dem Alkohol platzten. Die Zugabe erfolgte tropfenweise auf dem Schüttler, um einer Verklumpung der Zellen vorzubeugen. Die Zellen wurden bei 1000 U/min und 20 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um wässrige Bestandteile und Erythrozytenreste möglichst zu entfernen. Dieser Fixationsschritt wurde wiederholt, wobei hier der Überstand bis auf 1,5 ml entfernt wurde. Bei einer Lagerung bei –20 °C ist in diesem Zustand eine gleich bleibende Qualität der so präparierten Lymphozyten für mehrere Monate gewährleistet.

Um ein mikroskopisch auswertbares Präparat herzustellen, wurde ein Objektträger mit einem homogenen Wasserfilm bedeckt. Anschließend wurden 25 µl der Zellsuspension aus einer Mikropipette auf den Objektträger gebracht, wobei der Alkohol der Suspension das Wasser verdrängte. Die Wechselwirkungen zwischen dem Alkohol und dem Wasser brachten die Lymphozyten zum Platzen. Die Chromosomen wurden so auf dem Objektträger gespreizt. Nachdem das Präparat 20 min lang trocknete wurde es für 8 min in 2 ml Giemsa (Endkonzentration 2%, Sigma) und 68 ml PBS gefärbt und der überschüssige Farbstoff anschließend in drei Waschschritten mit destilliertem Wasser entfernt. Der Giemsafarbstoff bindet spezifisch an die DNS und lässt so die Chromosomen im Lichtmikroskop rot/violett erscheinen. Das Präparat wurde getrocknet und anschließend in Entellan (Merck) eingebettet. Die so hergestellten Präparate konnten nun mikroskopisch ausgewertet werden.

#### 3.5. Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer 200 kV Röntgenröhre (RT 200, C.H.F. Müller, Hamburg) bei einem Röhrenstrom von 20 mA und einer Spannung von 200 kV. Als Zusatzfilter wurde ein 0,5 mm starker Cu-Filter angebracht. Zur Eichung der Röntgenröhre wurde ein Duplexdosimeter (PTW) verwendet, welches mit einer Strontium-Radiumlonisationskammer kalibriert wurde. Die Zellkulturen wurden für 3 min mit einer Dosisrate von 2 Gy/min bestrahlt, so dass sie eine Gesamtdosis von jeweils 6 Gy erhielten.

#### 3.6. Mikroskopie und Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte lichtmikroskopisch (Zeiss) bei 1250-facher Vergrößerung unter Benutzung einer Ölimmersion. Die Zählung erfolgte computerunterstützt. Hierzu war das Mikroskop über eine CCD-Kamera (CFI/1 FMCC, Kappa-Messtechnik, Germany) mit dem Computer verbunden. Mit Hilfe einer entsprechenden Software (Optimas 5.01) konnte das mikroskopische Bild auf dem Bildschirm dargestellt und die Chromosomen der Lymphozyten gezählt werden.

Für jeden Patienten wurden jeweils zwei unbestrahlte und zwei bestrahlte Präparate hergestellt. Die Auswertung der Präparate erfolgte codiert, wobei auf jedem Objektträger 10-20 Metaphasen ausgewertet wurden. Für jede Dosis wurden die Mittelwerte der 20-40 ausgewerteten Zellen ermittelt. Durch Subtraktion des Mittelwertes unbestrahlter Proben von bestrahlten Proben erhielt man die Anzahl der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde für den Vergleich der verschiedenen Untersuchungsgruppen (Gesunde Spender, Patienten vor Strahlentherapie, Patienten nach Strahlentherapie) der Korrelationskoeffizient P mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Hierbei werden die verschiedenen Stichproben über eine jeweils zu berechnende Prüfgröße U miteinander verglichen. Der Test wurde jeweils als einseitiger Test durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von 0,05 zugrunde gelegt wurde. Die Überprüfung der Beziehungen "Dosisabhängigkeit" und "Altersabhängigkeit" erfolgte über die Berechnung nach Spearman für Variablen mit linearem Zusammenhang, ebenfalls bei einem Signifikanzniveau von 0,05.

# 3.7. Puffer und Lösungen

- Carnoy´s Fixativ:	Methanol/Essigsäure im Verhältnis 3:1 (Sigma)
- KCI-Lösung:	5,6 g KCI (Sigma) in 1 l H <sub>2</sub> O dest.
- PBS (phosphate-buffered saline):	8 g NaCl (Sigma)
	0,4 g KCl (Sigma)
	1,15 g Na₂HPO₄ (Sigma)
	0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)
	in 1 I H <sub>2</sub> O dest.
- Colcemid:	Stocklösung, 2 mg/ml in H <sub>2</sub> O, (Gibco)
- Medium:	RPMI (Gibco)
	15% fetales Kälberserum (Gibco)
- Penicillin/Streptomycin:	2,5 mg/ml (Gibco)
- Phytohämagglutinin A:	(Boehringer) in H <sub>2</sub> O dest.

#### 4. ERGEBNISSE

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine strahlentherapeutische Behandlung die individuelle Strahlenempfindlichkeit von Tumorpatienten verändert. Die individuelle Strahlenempfindlichkeit der Patienten wurde über den Nachweis von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen in Lymphozyten des peripheren Blutes untersucht. Hierzu wurde acht gesunden Spendern und 20 Tumorpatienten vor Beginn der Strahlentherapie Blut entnommen. Denselben Patienten wurde zwei Jahre nach Strahlentherapie erneut Blut entnommen. Es wurden mit 6 Gy bestrahlte Präparate, sowie unbestrahlte Kontrollpräparate angefertigt, und anschließend die Anzahl der Chromosomenaberrationen bestimmt. Zur Auswertung kamen hierbei ausschließlich azentrische Chromosomenfragmente, da sie ein guter Indikator für die Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten sind (Borgmann et al. 2002). In den methodischen Vorarbeiten sollte zunächst die Zuverlässigkeit der Auswertung überprüft werden.



**Abb. 1:** Karyogramme einer unbestrahlten (A) und einer mit 6 Gy bestrahlten (B) Zelle. Die Zellen wurden zur Teilung angeregt, in der Metaphase angehalten und mit Giemsa gefärbt. Schwarze Pfeile zeigen dizentrische Chromosomen, weiße Pfeile azentrische Chromosomenfragmente.

#### 4.1. Methodische Vorarbeiten

#### 4.1.1. Chromosomenfragmente nach Bestrahlung bei gesunden Spendern

In einem Vorversuch sollten alle für das Experiment notwendigen Arbeitsschritte und der Umgang mit den Materialien standardisiert werden. Hierzu wurde acht gesunden Kontrollspendern 5 ml venöses Blut in heparinisierten Monovetten entnommen und wie in Kapitel 3.4. beschrieben verarbeitet. Pro Spender wurden vier Gewebekulturflaschen angelegt, von denen je eine mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt wurde. Jeweils eine Flasche diente

als unbestrahlte Kontrolle. Aus den so behandelten Proben wurden Chromosomenpräparate hergestellt und ausgewertet.

In Abb. 1 sind typische Beispiele für Karyogramme von unbestrahlten (A) bzw. bestrahlten Lymphozyten (B) dargestellt. Die unbestrahlte Probe zeigt 46 Chromosomen mit einem metazentrischen Erscheinungsbild, entsprechend des humanen diploiden Chromosomensatzes. Abb. 1B zeigt daneben auch dizentrische Chromosomen (schwarze Pfeile) und azentrische Chromosomenfragmente (helle Pfeile).



**Abb.2:** Anzahl der Chromosomenfragmente in Lymphozyten von acht Kontrollspendern in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Die Zellen wurden mit 2, 4 oder 6 Gy bestrahlt und anschließend nach Präparation von Metaphasen ausgewertet. Unbestrahlte Proben dienten als Kontrolle. Pro Spender und Dosis wurden 25 Zellen ausgewertet und hieraus jeweils der Mittelwert gebildet. Die Fehlerbalken entsprechen dem Fehler des Mittelwertes.

Abb. 2 zeigt die Anzahl der Chromosomenfragmente in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis für acht Spender. Es zeigte sich für alle Spender ein linear-quadratischer Anstieg der Chromosomenfragmente mit der Dosis. Die unbestrahlten Proben zeigten im Mittel  $45,9\pm0,04$  Chromosomenfragmente, bei einer Bestrahlung mit 2 Gy zeigten sich  $46,4\pm0,04$ , bei 4 Gy  $47,24\pm0,04$  und bei 6 Gy  $48,4\pm0,1$  Chromosomenfragmente. Die größte Streuung der Einzelwerte zeigte sich bei einer Dosis von 6 Gy, mit der niedrigsten Anzahl von  $47,9\pm0,5$  für den Spender N6 und der höchsten Anzahl von  $48,9\pm0,5$  des Spenders N5.

Zur Ermittlung der strahleninduzierten Chromosomenfragmente wurde die Anzahl der Chromosomenfragmente in unbestrahlten Kontrollen von der Anzahl in bestrahlten Proben subtrahiert und als Anzahl der zusätzlichen Fragmente ausgedrückt (Tab. 2). Auch hier zeigte sich die deutlichste Streuung der Einzelwerte bei einer Dosis von 6 Gy. Daher eignete sich diese Dosis als sicherster Parameter für die Beurteilung einer möglichen unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit und wurde für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

	0 Gy <sup>1</sup>		2 Gy <sup>1</sup>		4 Gy <sup>1</sup>		6 Gy <sup>1</sup>	
Spender	Frag <sup>2</sup>	SEM	AF <sup>3</sup>	SEM	AF <sup>3</sup>	SEM	AF <sup>3</sup>	SEM
1	46,0	0,2	0	0,2	1,1	0,3	2,9	0,4
2	46,0	0,2	0,3	0,2	1,2	0,3	2,6	0,3
3	46,2	0,1	0,2	0,2	1,7	0,4	2,1	0,5
4	45,9	0,2	0,5	0,3	1,2	0,3	2,3	0,3
5	46,0	0,2	0,4	0,1	1,2	0,2	2,9	0,5
6	45,7	0,2	0,8	0,2	1,7	0,3	2,8	0,3
7	45,7	0,2	1,2	0,3	1,7	0,4	2,4	0,5
8	45,9	0,2	0,5	0,2	0,9	0,2	2,0	0,5

**Tab. 2:** Strahleninduzierte Chromosomenfragmente in Lymphozyten von acht Kontrollspendern nachBestrahlung mit 2, 4 und 6 Gy.

<sup>1</sup>Bestrahlungsdosis bei in vitro Bestrahlung; <sup>2</sup>Mittelwert der gezählten Chromosomenfragmente pro Zelle; <sup>3</sup>Mittelwert der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente pro Zelle

#### 4.1.2. Azentrische Chromosomenfragmente bei Tumorpatienten

Es wurde überprüft, ob es einen Unterschied zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten in der Anzahl von azentrischen Chromosomenfragmenten nach einer Dosis von 6 Gy gibt. Zu diesem Zweck wurde bei einem Kollektiv aus 50 Patientinnen nach Strahlentherapie, die aufgrund einer Nachsorgeuntersuchung zwei bis zehn Jahre nach Therapie einbestellt wurden, Blut entnommen. Die Proben wurden mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt und die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach Abzug der unbestrahlten Kontrolle bestimmt.

Abb. 3 zeigt die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente für 50 Patientinnen nach einer in vitro Bestrahlung mit 6 Gy. Die Verteilung der Einzelwerte folgte einer Gauß'schen Verteilung mit einer Streuung der Einzelwerte von 2,0 bis 5,0 und einem Mittelwert von  $3,54\pm0,55$  (SD).



**Abb. 3:** Häufigkeitsverteilung der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente nach einer in vitro Bestrahlung mit 6 Gy bei 50 Tumorpatienten. Die Patienten, die zuvor aufgrund eines Mammakarzinoms eine Strahlentherapie erhalten hatten, kamen in einem Zeitraum von 2 bis 10 Jahren nach Therapie zur Blutentnahme. Die Blutproben wurden mit 6 Gy bestrahlt und die Chromosomenfragmente in den Lymphozyten bestimmt. Durch Subtraktion der unbestrahlten Kontrollen von den bestrahlten Proben wurden die strahleninduzierten azentrischen Chromosomenfragmente bestimmt.

Eine gleichartige Bestimmung von azentrischen Chromosomenfragmenten, allerdings vor Beginn der Strahlentherapie, wurde an Blutproben von 51 Tumorpatienten von Bernhard (Bernhard 2002) durchgeführt. Es zeigte sich ebenfalls eine Gauß'sche Verteilung der azentrischen Chromosomenfragmente, jedoch mit Einzelwerten zwischen 1,6 und 3,6 azentrischen Chromosomenfragmenten und einem deutlich niedrigeren Mittelwert von 2,22±0,51. Der Vergleich der beiden Untersuchungen zeigt, dass die Patienten, die nach Strahlentherapie untersucht wurden, deutlich höhere Werte und eine breitere Streuung aufwiesen, als andere Patienten, die vor Therapiebeginn untersucht wurden.

# 4.2. Azentrische Chromosomenfragmente bei Tumorpatienten vor und nach Strahlentherapie

Um zu prüfen, ob der zuvor gezeigte Unterschied durch die Strahlenbehandlung bedingt ist, wurden in dieser Studie 20 Patienten sowohl vor als auch nach Strahlentherapie untersucht, sowie ein Kollektiv von 29 gesunden Kontrollspendern. Die Untersuchungen vor der Therapie fanden im Rahmen der Studie von Bernhard (Bernhard 2002) statt.

	Untersuchung vor Strahlentherapie							Untersuchung nach Strahlentherapie							
	Unbes	trahlt (0	Gy)	Bestra	hlt (6 Gy	/) <sup>1</sup>		Unbes	strahlt (0	Gy)	Bestra	ahlt (6 G	y) <sup>1</sup>		
Pat.	$CF^2$	SEM	n³	$CF^2$	SEM	n³	$EF^4$	$CF^2$	SEM	n³	$CF^2$	SEM	n³	$EF^4$	Diff.⁵
1	46	0,1	40	49,3	0,2	65	3,3	46	0,1	45	49,5	0,2	45	3,5	0,2
2	46	0,1	41	47,6	0,2	10	1,6	46	0,1	30	50,6	0,3	25	4,6	3
3	46,1	0,1	42	48,5	0,2	70	2,4	46,1	0,1	32	50	0,4	41	3,9	1,5
4	46	0,1	60	48,2	0,3	29	2,2	46,1	0,1	45	49,8	0,3	41	3,7	1,5
5	45,8	0,1	46	48,2	0,4	32	2,3	46	0,1	41	50,8	0,3	44	4,8	2,5
6	45,8	0,1	40	48,2	0,3	40	2,4	46,1	0,1	44	49,8	0,3	43	3,7	1,3
7	46,3	0,3	34	48,2	0,8	4	1,5	46,1	0,1	42	49,7	0,2	46	3,6	2,1
8	45,8	0,1	40	48,2	0,3	48	2,1	46	0,1	37	49,5	0,3	31	3,5	1,4
9	46,1	0,2	43	48,2	0,7	17	1,4	46,2	0,1	45	49,5	0,3	21	3,3	1,9
10	45,9	0,2	37	48,2	0,2	60	2,4	46,2	0,1	46	49,8	0,3	33	3,6	1,2
11	45,9	0,1	40	48,2	0,3	40	2,6	46,1	0,1	45	49,6	0,3	45	3,5	0,9
12	45,9	0,1	51	48,2	0,3	25	2,1	46	0,1	46	49,4	0,3	32	3,4	1,3
13	45,8	0,1	63	48,2	0,4	40	1,9	46,1	0,1	30	50,9	0,8	10	4,8	2,9
14	46,2	0,1	76	48,2	0,2	111	2,5	46,1	0,1	55	48,7	0,3	32	2,6	0,1
15	46,2	0,1	40	48,2	0,5	20	1,6	46,1	0,1	45	50,1	0,3	40	5	3,4
16	46,1	0,1	67	48,2	0,4	39	2,1	46,1	0,1	45	49,4	0,3	35	3,3	1,2
17	46,5	0,1	119	48,2	0,6	23	3,4	46,2	0,1	45	49,8	0,2	43	3,6	0,2
18	46	0,2	29	48,2	0,4	21	1,6	46,4	0,1	45	50,1	0,3	45	3,7	2,1
19	46,2	0,1	108	48,2	0,2	50	2,3	46	0,1	45	49,2	0,3	27	3,2	0,9
20	45,9	0,1	40	48,2	0,3	42	2	46	0,1	31	50,2	0,3	40	4,2	2,2

 

 Tab. 3: Anzahl der Chromosomenfragmente in unbestrahlten und in bestrahlten Lymphozyten bei Tumorpatienten vor und nach Strahlentherapie.

<sup>1</sup>nach in vitro Bestrahlung <sup>2</sup>Mittelwerte der Chromosomenfragmente pro Zelle <sup>3</sup>Anzahl ausgewerteter Zellen <sup>4</sup>Anzahl zusätzlicher azentrischer Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung <sup>5</sup>Differenz der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente (EF) zwischen prospektiver und retrospektiver Untersuchung

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Dargestellt sind die mittlere Anzahl der Chromosomenfragmente pro Zelle (CF), der Standardfehler (SEM) und die Anzahl der ausgewerteten Zellen (n) in unbestrahlten sowie in mit 6 Gy bestrahlten Blutproben, jeweils für die prospektiv und die retrospektiv erhobenen Daten. Weiterhin wurde die Anzahl der zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente (EF) berechnet, indem die Werte der unbestrahlten Zellen von den Werten der bestrahlten Präparate abgezogen wurden.

Tabelle 4 zeigt die Chromosomenaberrationen von Patienten und gesunden Kontrollspendern (HD), sowohl in unbestrahlten als auch in bestrahlten Blutproben. Für die bestrahlten Proben wurden zusätzlich die strahleninduzierten Fragmente durch Subtraktion der unbestrahlten Ergebnisse berechnet. Der Vergleich der Patienten mit den Kontrollspendern erfolgte ieweils über den Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von 0,05. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unbestrahlten Präparaten vor (P=0,4837) und nach Strahlentherapie (P=0,0107). Es wurde ebenfalls kein Unterschied bei den mit 6 Gy bestrahlten Präparaten bei Patienten vor der Strahlentherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe (P=0,0732) festgestellt. Dagegen zeigten sich sehr deutliche, signifikante Unterschiede bei Patienten die nach erfolgter Strahlentherapie untersucht wurden im Vergleich zu den Kontrollgruppen, mit einem P-Wert von P<0,0001.

Dosis [Gy] 1	Gruppe	n ²	CF <sup>3</sup>	SEM	EF <sup>4</sup>	SEM	P <sup>5</sup>
0	HD	29	46,0	0,02	-	_	_
	Pat. vor Therapie	20	46,0	0,04	_	_	0,4837 *
	Pat. nach Therapie	20	46,1	0,02	-	-	0,0107 * 0,053 **
6	HD	26	48,4	0,1	2,4	0,1	-
	Pat. vor Therapie	20	48,2	0,5	2,2	0,5	0,0732 *
	Pat. nach Therapie	20	49,9	0,6	3,8	0,6	< 0,0001 * < 0,0001 **

 Tab. 4: Anzahl der Chromosomenfragmente und der strahleninduzierten azentrischen

 Chromosomenfragmente bei gesunden Kontrollspendern (HD), Patienten vor Strahlentherapie und

 Patienten nach Strahlentherapie, sowie deren Korrelation.

<sup>1</sup>Bestrahlungsdosis nach in vitro Bestrahlung <sup>2</sup>Anzahl der Patienten / gesunden Spender <sup>3</sup>Mittlere Anzahl der Chromosomenfragmente pro Zelle <sup>4</sup>Mittlere Anzahl zusätzlicher azentrischer Chromosomenfragmente pro Zelle <sup>5</sup>P-Wert (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzniveau 0,05); \*Referenzgruppe: gesunde Spender; \*\*Referenzgruppe: Tumorpatienten vor Strahlentherapie

#### 4.2.1. Spontan auftretende azentrische Chromosomenfragmente (0 Gy)

Das menschliche Erbgut ist permanent schädigenden Einflüssen ausgesetzt, die sowohl beispielsweise durch Stoffwechselprozesse, als auch exogen endogen. durch umweltbedingte Strahlenbelastung auftreten können. Um eine Schädigung der DNA-Struktur zu verhindern hat sich im Verlauf der Evolution eine komplizierte Maschinerie an so genannten DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, die höchst effizient und schnell diese entstehenden DNA-Schäden beseitigen kann. Es hat sich gezeigt, dass insbesondere die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen hier von besonderer Bedeutung ist, da diese im Gegensatz zu anderen DNA-Schäden einerseits zu einem Verlust an DNA, und somit zu einem Absterben der Zellen, aber auch andererseits durch Umlagerung von DNA zur Transformation der Zellen mit einer daraus folgenden genomischen Imbalance führen können. Dieses auch als genomische Instabilität bezeichnete Phänomen wird in vielen Tumorentitäten als ein initiales Ereignis in der Tumorigenese angesehen. Um zu überprüfen, ob es sich bei den Unterschieden zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten um ein handelt, wurde die solches Phänomen zunächst Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente unbestrahlter Zellen untersucht.

#### 4.2.1.1. Vergleich von gesunden Spendern und Tumorpatienten

Zunächst war zu überprüfen, ob es einen Unterschied gibt zwischen Tumorpatienten vor Beginn der Strahlentherapie und gesunden Spendern bezüglich der spontan auftretenden Chromosomenaberrationen in Lymphozyten. Hierzu wurde 29 gesunden Spendern sowie 20 Tumorpatienten vor Beginn der Therapie periphervenöses Blut entnommen. Das Zellwachstum wurde mit PHA stimuliert. Nach einer Inkubation der Zellkulturen bei 37°C für 48 h wurden die Zellen mit Colcemid in der Mitose arretiert. Die Chromosomen wurden mit Giemsa gefärbt und die Präparate fixiert. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden für jeden Patienten und für jeden gesunden Spender im Mittel 50 Zellen auf die Anzahl der Chromosomenfragmente hin untersucht und der Mittelwert errechnet.

Abb. 4 zeigt für Tumorpatienten vor Beginn der Strahlentherapie und gesunde Spender die Anzahl der Chromosomenfragmente. Gesunde Spender zeigten im Mittel 46,0±0,02 Chromosomenfragmente, entsprechend dem menschlichen diploiden Chromosomensatz, mit einer Streuung der Einzelwerte von 45,7 bis 46,5. Einen vergleichbaren Wert zeigten Tumorpatienten vor Therapiebeginn, mit einem Mittelwert von 46,0±0,04 bei einer Streuung von 45,8 bis 46,5. Es zeigt sich demnach kein Unterschied der beiden Gruppen in Bezug auf Auftreten spontaner Chromosomenaberrationen. das Das bedeutet, dass eine Tumorerkrankung nicht zu einer auffälligen Erhöhung der azentrischen Chromosomenfragmente in unbestrahlten Lymphozyten führt.



**Abb.4:** Anzahl der Chromosomenfragmente in unbestrahlten Lymphozyten von 29 Kontrollspendern und 20 Tumorpatienten vor Strahlentherapie. Pro Spender/Patient wurden ca. 50 Zellen ausgewertet und jeweils der Mittelwert mit Fehler des Mittelwertes berechnet.

#### 4.2.1.2. Vergleich von Tumorpatienten vor und nach Strahlentherapie

Es war zu überprüfen, ob die zurückliegende strahlentherapeutische Behandlung einen Einfluss auf die spontan auftretenden azentrischen Chromosomenfragmente hatte, wie es bereits für stabile Translokationen beschrieben wurde (Lindholm et al. 1998, Spruill et al. 2000, Tucker et al. 1994). Zu diesem Zweck wurde denselben Patienten, denen vor Beginn der Strahlentherapie Blut entnommen wurde (Abb. 4), etwa zwei Jahre nach der strahlentherapeutischen Behandlung erneut eine Blutprobe entnommen. Aus den Blutproben wurden Chromosomenpräparate der Metaphase angefertigt und die Lymphozyten mikroskopisch untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse beider Untersuchungszeitpunkte miteinander verglichen.

Abb. 5 zeigt die Anzahl der Chromosomenfragmente in Lymphozyten von Tumorpatienten vor und zwei Jahre nach der Strahlentherapie. Für jeden Patienten wurden etwa 50 Zellen ausgezählt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Anzahl der Chromosomenfragmente vor Strahlentherapie, mit einem Mittelwert von 46,0  $\pm$  0,04 und einer Streuung der Einzelwerte von 45,8 bis 46,5, gegenüber der Anzahl an Chromosomenfragmenten nach Strahlentherapie, mit einem Mittelwert von 46,1  $\pm$  0,02 und

einer Streuung von 46,0 bis 46,4. Das bedeutet, dass die Strahlentherapie nicht zu einer Veränderung der spontan auftretenden Chromosomenfragmente führt.



**Abb.5:** Anzahl der Chromosomenfragmente in unbestrahlten Lymphozyten von 20 Tumorpatienten. Die Patienten wurden sowohl vor Beginn der Strahlentherapie als auch zwei Jahre nach der Strahlentherapie untersucht. Pro Spender/Patient wurden im Mittel 50 Zellen ausgewertet und der Mittelwert gebildet.

#### 4.2.2. Azentrische Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung mit 6 Gy

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente humaner Lymphozyten als ein Maß der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit angesehen werden kann (Borgmann et al. 2002). Dabei zeiaten Patienten mit einer im Mittel erhöhten Anzahl an azentrischen Chromosomenfragmenten deutlich häufiger eine höhergradige Fibrose als Patienten mit einer geringen Anzahl an azentrischen Chromosomenfragmenten. Ungeklärt ist bis dato, ob Strahlentherapie zu einer gleich bleibenden oder veränderten es durch eine Reparaturleistung der Zellen kommen kann. Um dies zu überprüfen, wurde Patienten vor und nach Strahlentherapie Blut entnommen, die Blutproben mit 6 Gy bestrahlt und die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente bestimmt. Zur Kontrolle wurden 29 gesunde Spender in gleicher Weise untersucht.

# 4.2.2.1. Azentrische Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung bei Patienten vor Strahlentherapie im Vergleich zu gesunden Spendern

Es war zunächst zu überprüfen, ob eine unterschiedliche Lymphozytenempfindlichkeit zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten erkennbar ist. Hierzu wurde in entsprechendem Medium kultiviertes Blut mit 6 Gy bestrahlt und anschließend präpariert. Die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente wurde unter dem Mikroskop bestimmt. Zur Auswertung kamen pro Patient durchschnittlich 50 Zellen, aus deren Werten jeweils ein Mittelwert für jeden Patienten bzw. gesunden Spender berechnet wurde. Um die Anzahl der strahleninduzierten zusätzlichen Fragmente zu erhalten, wurde von den gezählten Werten die Anzahl der spontanen Aberrationen subtrahiert.



**Abb. 6:** Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente in mit 6 Gy bestrahlten Lymphozyten von 26 Kontrollspendern und 20 Tumorpatienten vor Strahlentherapie. Pro Spender/Patient wurden im Mittel 50 Zellen ausgewertet und der Mittelwert gebildet. Um die strahleninduzierten zusätzlichen Fragmente zu erhalten, wurden die unbestrahlten Kontrollproben von den bestrahlten Proben subtrahiert.

Abb. 6 zeigt die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach einer in vitro Bestrahlung mit 6 Gy in Zellen gesunder Spender, sowie in Zellen von Tumorpatienten vor Strahlentherapie. Die gesunden Spender zeigten im Mittel 2,4  $\pm$  0,1 azentrische Chromosomenfragmente mit einer Streuung der Einzelwerte von 1,4 bis 3,3. Bei den Tumorpatienten vor Strahlentherapie lag der Mittelwert bei  $2,2 \pm 0,5$  mit einer Streuung von 1,4 bis 3,4. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen.

# 4.2.2.2. Azentrische Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung bei Patienten vor und nach Strahlentherapie

Es war zu überprüfen, ob es zu einer Veränderung der Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten bei den Tumorpatienten durch die Strahlentherapie kommt. Zu diesem Zweck wurde den Patienten sowohl kurz vor Strahlentherapie als auch zwei Jahre nach Strahlentherapie Blut entnommen. Die Blutproben wurden wie zuvor beschrieben präpariert, und anschließend die Lymphozytenempfindlichkeit über den Nachweis von zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmenten bestimmt.



**Abb. 7:** Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente in mit 6 Gy bestrahlten Lymphozyten von 20 Tumorpatienten. Die Patienten wurden sowohl vor Beginn der Strahlentherapie als auch 2 Jahre nach der Strahlentherapie untersucht. Pro Patient wurden zwischen 10 und 46 Zellen ausgewertet. Um die strahleninduzierten azentrischen Chromosomenfragmente zu erhalten, wurden die unbestrahlten Kontrollproben von den bestrahlten Proben subtrahiert. Vergleich derselben Patienten vor und nach Strahlentherapie.

Abb. 7 zeigt die Anzahl azentrischer Chromosomenfragmente in Lymphozyten der Tumorpatienten nach einer in vitro Bestrahlung mit 6 Gy. Auf der linken Seite sind die azentrischen Chromosomenfragmente vor Strahlentherapie dargestellt, auf der rechten Seite die Fragmente derselben Patienten zwei Jahre nach Therapie. Vor Therapiebeginn zeigen die Patienten im Mittel 2,2  $\pm$  0,5 azentrische Chromosomenfragmente bei einer Streuung von 1,4 bis 3,4. Dagegen liegen die Werte nach Strahlentherapie um einen Mittelwert von 3,8  $\pm$  0,6, mit einer Streuung der Einzelwerte von 2,4 bis 5,2. Der Unterschied ist signifikant bei einem P-Wert von <0,0001 im einseitigen Mann-Whitney-U-Test. Dieser Befund weist erstmalig darauf hin, dass die Empfindlichkeit von Lymphozyten durch eine Strahlentherapie verändert werden kann.

#### 4.3. Ausmaß der Zunahme der Lymphozytenempfindlichkeit von 20 Tumorpatienten

Um die Veränderung der Lymphozytenempfindlichkeit im Verlauf der Strahlentherapie im Einzelnen nachzuvollziehen, wurde für jeden der 20 Tumorpatienten ein Vergleich der prospektiv und retrospektiv ermittelten Werte durchgeführt.

Abb. 8 zeigt für jeden einzelnen der 20 Patienten die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach einer in vitro Bestrahlung mit 6 Gy, sowohl vor als auch nach Therapie. Von den Präparaten wurden jeweils im Mittel etwa 50 Zellen ausgezählt und daraus ein Mittelwert gebildet.



**Abb. 8:** Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente in Lymphozyten von 20 Tumorpatienten. Die Blutproben der Patienten wurden sowohl vor als auch zwei Jahre nach Strahlentherapie entnommen und mit 6 Gy bestrahlt. Unbestrahlte Proben dienten als Kontrolle, ihre Werte wurden von denen der bestrahlten Proben subtrahiert.

Es zeigt sich sehr deutlich, dass in allen untersuchten Patienten die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach Therapie höhere Werte zeigte als vor der Therapie, mit im Mittel 1,6±0,2 zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmenten. In einigen Fällen war die Erhöhung von geringem Ausmaß, wie bei Patient Nr.14. In anderen Fällen dagegen war eine wesentlich deutlichere Erhöhung zu erkennen, z.B. bei den Patienten Nr.2, Nr.13 und Nr.15.

Zur deutlicheren Visualisierung wurde für jeden einzelnen Patienten die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente bei 6 Gy vor Therapiebeginn von der Anzahl nach Therapie subtrahiert und in Abbildung 9 dargestellt. Zusätzlich wurden die Patienten in drei Gruppen aufgeteilt, je nach Tumorlokalisation. Die Patienten 1-3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 19 und 20 wurden aufgrund eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich bestrahlt, die Patienten 4, 9, 14 und 17 hatten Tumoren im Thoraxbereich. Bei den Patienten 7, 12, 15, 16 und 18 befanden sich die Tumoren im Beckenbereich.



**Abb. 9:** Zunahme der azentrischen Chromosomenfragmente in Lymphozyten von 20 Tumorpatienten im Verlauf der Strahlentherapie, gruppiert nach Tumorlokalisation. Die Patienten wurden je nach Tumorlokalisation in drei Gruppen eingeteilt: Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (hellgrau), im Thoraxbereich (dunkelgrau) oder im Beckenbereich (schwarz). Den Patienten wurde sowohl vor als auch zwei Jahre nach Strahlentherapie Blut entnommen und mit 6 Gy bestrahlt. Unbestrahlte Proben dienten als Kontrolle, ihre Werte wurden von denen der bestrahlten Proben subtrahiert und die Differenz der azentrischen Chromosomenfragmente vor und nach Therapie gebildet.

Die geringste Zunahme an azentrischen Chromosomenfragmenten im Verlauf der Strahlentherapie zeigte sich bei dem Patienten 14 mit 0,1 und den Patienten 1 und 17 mit jeweils 0,2. Werte mittlerer Größe fanden sich bei den Patienten 3 (1,5), 5 (2,5), 6 (1,3), 8 (1,4), 10 (1,2), 11 (0,9), 19 (0,9), 20 (2,2), 4 (1,5), 9 (1,9), 7 (2,1), 12 (1,3), 16 (1,2) und 18 (2,1). Besonders hohe Werte zeigten Patient 2 mit 3,0, Patient 13 mit 2,9 und Patient 15 mit 3,4.

Anhand dieser Abbildung lässt sich zudem überprüfen, ob die Erhöhung der Lymphozytenempfindlichkeit abhängig ist von der Lokalisation des Tumors. Die Überlegung hierbei ist, dass aus Bestrahlungsfeldern mit viel blutbildenden Knochenmarkanteilen (d.h. Beckenknochen und lange Röhrenknochen) ein erhöhter Anteil an modifizierten Lymphozyten resultiert. Aus diesem Grund zeigt die Abbildung 9 die 20 Patienten sortiert nach Tumorlokalisation. Betrachtet man diese drei Gruppen getrennt voneinander, so ist sehr deutlich zu erkennen, dass die Erhöhung der Lymphozytenempfindlichkeit unabhängig von der Tumorlokalisation zu sein scheint.



**Abb. 10:** Zunahme der in vitro strahleninduzierten azentrischen Chromosomenfragmente bei 6 Gy im Verlauf der Strahlentherapie in Lymphozyten von 20 Tumorpatienten. Die Blutproben der Patienten wurden sowohl vor als auch zwei Jahre nach Strahlentherapie entnommen. Die Werte der unbestrahlten Kontrollproben wurden von denen der bestrahlten Proben abgezogen. Für jeden Patienten wurde die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente vor Therapie gegen die Anzahl nach Therapie aufgetragen und der Korrelationskoeffizient berechnet.

Es sollte im Folgenden überprüft werden, ob es sich bei dem Ausmaß der Erhöhung der Lymphozytenempfindlichkeit um ein generelles oder ein individuelles Merkmal handelte. Zu diesem Zweck wurden in Abb. 10 die Werte jedes Patienten vor Strahlentherapie gegen die Werte nach Strahlentherapie aufgetragen. Die Verteilung der Werte zeigte eine deutliche Punktwolke, was darauf hinweist, dass es sich bei dem Anstieg der Fragmente nach gegenüber vor Strahlentherapie nicht um einen generellen, sondern um einen individuellen Mechanismus handelt. Patienten, die vor Therapie die höchsten Werte zeigten, zeigten nicht automatisch nach Therapie deutlich erhöhte Werte und umgekehrt.

#### 4.4. Bedeutung der Gesamtdosis der Strahlentherapie

Es sollte untersucht werden, ob die beobachtete Modifikation der Strahlenempfindlichkeit der Lymphozyten vor im Vergleich zu nach der Strahlentherapie auf die während der Therapie applizierte Dosis zurückzuführen war. Abb. 11 zeigt die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente bei 6 Gy nach Strahlentherapie, aufgetragen gegen die applizierte Gesamtdosis der Strahlentherapie. Dabei wurden die Patienten bezüglich der Gesamtdosis in drei Gruppen aufgeteilt. Fünf Patienten erhielten eine Gesamtdosis von jeweils 50 bzw. 50,4 Gy, elf Patienten eine Dosis von 60 Gy und vier Patienten eine Dosis von 66 Gy.

In der Gruppe der mit 50 Gy bestrahlten Patienten zeigte sich eine geringe Streuung der Einzelwerte zwischen 3,2 und 3,7 azentrischen Chromosomenfragmenten mit einem Mittelwert von 3,46 ± 0,09. Die Gruppe der mit 60 Gy bestrahlten Patienten zeigte eine deutlich größere Streuung von 2,6 bis 5,0 azentrischen Chromosomenfragmenten und einem Mittelwert von 3,88 ± 0,22, während die Patienten, die mit einer Gesamtdosis von 66 Gy bestrahlt wurden, eine Streuung der Einzelwerte von 3,4 bis 4,8 azentrischen Chromosomenfragmenten zeigten bei einem Mittelwert von 3,92 ± 0,31. Es zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der azentrischen Chromosomenfragmente mit der Gesamtdosis, allerdings mit einer sehr starken Streuung der Einzelwerte, insbesondere in der größten Gruppe. Um zu überprüfen ob es sich bei dem leichten Anstieg tatsächlich um eine auf die Strahlentherapie zurückzuführende Zunahme handelt, wurde die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente vor Therapie von der Anzahl der Fragmente nach Therapie subtrahiert und erneut gegen die Gesamtdosis aufgetragen. Abb. 12 zeigt die azentrischen Chromosomenfragmente bei 6 Gy nach Strahlentherapie abzüglich der azentrischen Chromosomenfragmente bei 6 Gy vor Therapie in Abhängigkeit zur Gesamtdosis.



**Abb. 11:** Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente in Lymphozyten von 20 Tumorpatienten nach in vitro Bestrahlung mit 6 Gy in Abhängigkeit von der während der Strahlentherapie applizierten Gesamtdosis. Zwei Jahre nach Strahlentherapie wurden Blutproben entnommen und mit 6 Gy bestrahlt. Die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente vor Strahlentherapie wurde von der Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach Strahlentherapie subtrahiert und gegen die applizierte Gesamtdosis aufgetragen.

In der Gruppe der mit 50 bzw. 50,4 Gy bestrahlten Patienten zeigte sich eine Streuung der Einzelwerte von 0,2 bis 2,1 mit einem Mittelwert bei 1,62  $\pm$  0,36. Patienten, die mit einer Gesamtdosis von 60 Gy bestrahlt wurden, zeigten Einzelwerte von 0,1 bis 3,4 und einen Mittelwert von 1,64  $\pm$  0,33 auf, und Patienten, die mit einer Dosis von 66 Gy behandelt wurden, zeigten eine Streuung der Einzelwerte von 1,25 bis 2,5 und einen Mittelwert von 1,64  $\pm$  0,29. Es zeigte sich kein Anstieg der azentrischen Chromosomenfragmente mit steigender Gesamtdosis. Der Anstieg der Lymphozytenempfindlichkeit im Verlauf der Strahlentherapie ist demzufolge unabhängig von der applizierten therapeutischen Gesamtdosis.

In gleicher Weise wurde überprüft, ob das Alter der Patienten Einfluss auf die Erhöhung der Lymphozytenempfindlichkeit hatte. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12:** Zunahme der azentrischen Chromosomenfragmente in Lymphozyten von 20 Tumorpatienten im Verlauf der Strahlentherapie in Abhängigkeit von der Gesamtbestrahlungsdosis während der Strahlentherapie. Es wurde die Differenz der zusätzlichen Fragmente vor Therapie und der zusätzlichen Fragmente nach Therapie gebildet, und diese aufgetragen gegen die Gesamtdosis, der die Patienten während der Strahlentherapie ausgesetzt waren.

#### 4.5. Bedeutung der Größe des Bestrahlungsfeldes

Alle Zellen des Bluts werden im Knochenmark gebildet. Neben pluripotenten Stammzellen für Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten existieren auch gemeinsame Stammzellen für die lymphatischen und myeloischen Zellreihen (Classen et al. 1994). Innerhalb der lymphatischen Zellreihe differenzieren sich Lymphozyten aus deren Vorläuferzellen, den Lymphoblasten und Prolymphozyten. Immunologisch lassen sich B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterscheiden. Vorläuferzellen der T-Lymphozyten wandern in den Thymus ein, wo sie zu T-Lymphozyten heranreifen. B-Lymphozyten hingegen reifen im Knochenmark, und wandern anschließend ins Blut und in periphere lymphatische Organe aus. Hier entwickeln sie sich nach stattgefundenem Antigenkontakt zu Plasmazellen, die im Rahmen einer Immunantwort Antikörper sezernieren.

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass 60% der peripheren B-Lymphozyten aus langlebigen Zellen bestehen (Sprent und Basten 1973, Sprent und Miller 1972). Diese Einschätzungen konnten mittlerweile widerlegt und auf artifizielle Selektion langlebiger Zellen zurückgeführt werden (Freitas et al. 1986). Es konnte dagegen gezeigt werden, dass eine große Mehrheit der peripheren B-Lymphozyten kurzlebig sind, mit einer Erneuerungsrate von

etwa 50% pro 24-48 Stunden. Nur 10-20% dieser Zellen weisen eine etwas längere Lebensdauer von 7-10 Tagen auf.

Vor dem Hintergrund dieser zeitlich begrenzten Lebensdauer von Lymphozyten ist ersichtlich, dass es sich bei den Lymphozyten, die im Rahmen dieser Studie zwei Jahre nach Strahlentherapie untersucht wurden, weder um Lymphozyten aus der Generation vor der Strahlentherapie handeln kann, noch um Lymphozyten, die während der Strahlentherapie direkt bestrahlt wurden. Die veränderte Strahlenempfindlichkeit müsste somit auf die Progenitorzellen des blutbildenden Knochenmarks zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob die Menge des bestrahlten Knochenmarks Einfluss hat auf die Erhöhung der Lymphozytenempfindlichkeit nach Strahlentherapie, wurden die Patienten in drei Gruppen aufgeteilt, je nach Größe des bestrahlten Knochenmarkvolumens.

Abb. 13 zeigt die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente in Abhängigkeit des im Bestrahlungsfeld liegenden Knochenmarks. Die Patienten wurden dabei in die Untergruppen wenig, mittel und viel bestrahltes Knochenmark unterteilt. Bei zwölf Patienten wurde nur ein geringes, bei drei ein mittleres und bei fünf ein großes Volumen Knochenmark bestrahlt. Es zeigte sich die größte Streuung bei einem kleinen Volumen, mit Einzelwerten von 0,2 bis 3,0 azentrischen Chromosomenfragmenten und einem Mittelwert von 1,5  $\pm$  0,27. Die drei Patienten mit einem mittelgroßen Volumen an bestrahltem Knochenmark zeigten eine Streuung der Einzelwerte von 2,3 bis 3,4 bei einem Mittelwert von 2,33  $\pm$  0,56, der nicht signifikant aber deutlich höher war (p= 0,1407).

Die fünf Patienten mit einem großen Knochenmarkanteil im Bestrahlungsfeld zeigten eine Variation der Einzelwerte von 0,2 bis 2,1 und einen Mittelwert von 1,06 ± 0,31 azentrischen Chromosomenfragmenten pro Zelle. Es zeigte sich für diese Gruppe demnach sogar ein geringerer Wert als für die beiden Gruppen mit weniger bestrahltem Knochenmarkvolumen. Dies und die fehlende Signifikanz bzw. die große Streuung der Einzelwerte deutet darauf hin, dass die Größe des bestrahlten Knochenmarkvolumens keinen Einfluss hat auf die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach Strahlentherapie.



**Abb. 13:** Anzahl der in vitro strahleninduzierten zusätzlichen azentrischen Chromosomenfragmente in in vitro bestrahlten Lymphozyten von 20 Tumorpatienten nach Strahlentherapie in Abhängigkeit vom bestrahlten Knochenmarkvolumen. Die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente vor Strahlentherapie wurde von der Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach Strahlentherapie subtrahiert. Die Patienten wurden je nach Größe des im Bestrahlungsfeld befindlichen Knochenmarks in drei Gruppen aufgeteilt: Patienten mit wenig, mäßig viel oder viel Knochenmark im Bestrahlungsfeld. Für jede der drei Gruppen wurden die azentrischen Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung mit 6 Gy dargestellt.

#### 5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob eine strahlentherapeutische Behandlung die individuelle zelluläre Strahlenempfindlichkeit von Tumorpatienten verändert. Dies ist insofern von großer Bedeutung, als sich die Bestimmung der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit hervorragender für als ein Indikator eine späte Normalgewebsreaktion eignet (Hoeller et al. 2003). Die individuelle Strahlenempfindlichkeit der Patienten wurde über den Nachweis von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen in Lymphozyten des peripheren Bluts untersucht. Dazu wurde 20 Tumorpatienten vor Beginn der Therapie Blut entnommen. Denselben Patienten wurde zwei Jahre nach Strahlentherapie erneut Blut entnommen. Nach in vitro Bestrahlung der Blutproben mit 6 Gy wurde die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente in den Lymphozyten bestimmt. Zur Kontrolle parallel Blutproben von gesunden Spendern, sowie von weiteren wurden 50 Brustkrebspatientinnen nach Strahlentherapie mit 6 Gy bestrahlt, und anschließend die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente bestimmt.

#### 5.1. Methodische Vorarbeiten

In einem Vorversuch wurde die Zahl der Chromosomenfragmente in Lymphozyten mittels konventioneller Metaphasentechnik bestimmt. Dafür wurden die Lymphozyten mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt, zur Proliferation für 48 h stimuliert und in der Metaphase fixiert. Die so erhaltenen Präparate wurden mit Giemsa gefärbt und die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente lichtmikroskopisch ausgewertet. Es zeigte sich eine linearquadratische Zunahme der Chromosomenfragmente mit steigender Bestrahlungsdosis (Abb. 2), die vergleichbar ist mit Werten, die in anderen Studien ermittelt wurden (Bauchinger et al. 1993, Bedford 1991, Bocker et al. 1996, Boei und Natarajan 1998, Brewen und Gengozian 1971, Brewen und Luippold 1971, Fabry et al. 1988, Lloyd et al. 1986, Thierens et al. 1995).

Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten durchgeführt und nicht an Fibroblasten oder anderen Zelltypen, da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass die Strahlenempfindlichkeit nur dann sehr gut mit entsprechenden klinischen Endpunkten wie beispielsweise dem Auftreten von späten Nebenwirkungen nach Strahlentherapie korrelierte, wenn sie anhand von Lymphozyten bestimmt wurde (Borgmann et al. 2002, El-Awady et al. 2005, Hoeller et al. 2003).

# 5.2. Spontane Chromosomenaberrationen in gesunden Spendern und Tumorpatienten vor bzw. nach Strahlentherapie

Spontane Chromosomenaberrationen sind im menschlichen Erbgut natürlicherweise vorhanden, da sie endogen durch oxidative Schäden und fehlerhafte Prozessierung von

Replikationsgabeln induziert werden können, oder exogen beispielsweise durch die natürliche Strahlenexposition auftreten (Herrmann et al. 2006).

In der vorliegenden Studie wurden zunächst die spontan auftretenden Chromosomenfragmente bei Tumorpatienten vor Beginn der strahlentherapeutischen Behandlung mit denen gesunder Spender verglichen. Die Metaphasenuntersuchungen in der Therapiebeginn Gruppe der Tumorpatienten vor ergab im Mittel 46,0±0,04 Chromosomenfragmente, bei den gesunden Spendern lag der Mittelwert bei 46,0±0,02. Es zeigte sich somit kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Ebenfalls kein Unterschied zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten konnte von Rigaud (Rigaud et al. 1990) beim Vergleich von dizentrischen Chromosomen beobachtet werden. Eine vergleichbare Beobachtung für die Bildung von Chromosomenaberrationen in der Interphase, wie sie mittels der PCC-Technik bestimmt wird, konnte ebenfalls von Terzoudi (Terzoudi et al. 2000) beobachtet werden. Keine Unterschiede in der Anzahl der spontan auftretenden Chromosomenbrüche im Vergleich von Tumorpatienten zu gesunden Spendern bei der Bestimmung der G2-Aberrationen mittels des G2-Assays wurden ebenfalls von Scott (Scott et al. 1999) und Baria (Baria et al. 2001) gezeigt.

Dagegen konnten sehr deutliche Unterschiede in der Anzahl spontan auftretender Chromosomenaberrationen mit einer Korrelation von Anzahl an spontan auftretenden Chromosomenaberrationen und Risiko einer Tumorerkrankung beobachtet werden (Bonassi et al. 1995, Bonassi et al. 2000, Hagmar et al. 1998, Hagmar et al. 1994). Allerdings wurden in diesen Studien sehr große Kohorten untersucht, die es ermöglichten, auch sehr kleine Unterschiede in der Anzahl der Chromosomenaberrationen signifikant herauszuarbeiten. Des weiteren wurden insbesondere Personen untersucht, die beruflich verstärkt karzinogenen Stoffen ausgesetzt waren, und - vielleicht der entscheidende Unterschied - es wurden nicht nur Chromosomenaberrationen bestimmt, die zum Absterben der Zellen führen, sondern auch Chromosomenaberrationen, die von der Zelle durchaus toleriert werden können, wie beispielsweise Translokationen. Diese wiederum wurden als auslösendes Ereignis einer Zelltransformation häufig beschrieben, mit dem so genannten Philadelphia-Chromosom als dem bekanntesten Vertreter (Deklein 1987, Hagemeijer 1987).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den meisten kleineren Studien keine Unterschiede von gesunden Spendern und Tumorpatienten beobachtet wurden, wenn Chromosomenaberrationen betrachtet wurden, die zu azentrischen Chromosomenfragmenten führen können.

Vergleicht man die Anzahl an azentrischen Chromosomenfragmenten im Verlauf der Strahlentherapie in unbestrahlten Lymphozyten, zeigte sich auch hier kein Unterschied. Andere Untersuchungen ermittelten ebenfalls keinen Unterschied in den spontan Diskussion

auftretenden Chromosomenaberrationen im Verlauf der Strahlentherapie (Kleinerman et al. 1989, Kleinerman et al. 1994, Kleinerman et al. 1990). Dagegen zeigten Ryabchenko et al. (Ryabchenko et al. 2003) an Lymphozyten von Hodgkin-Patienten in Remission, deren Strahlentherapie zwischen 6 und 24 Jahre zurücklag, eine höhere Zahl spontaner Chromosomenaberrationen im Vergleich zu Kontrollpatienten. Die Ursache für die erhöhte chromosomale Instabilität scheint bei diesen Patienten jedoch auf die bei der Hodgkin-Erkrankung eingesetzten Chemotherapeutika zurückzuführen zu sein, die insbesondere in Knochenmarkzellen chromosomale Instabilitäten induzieren (Genuardi et al. 1988). Somit könnte die Chemotherapie beim Hodgkin-Lymphom die Ursache für die von Ryabchenko gefundene erhöhte Lymphozytenschädigung sein und nicht die Strahlentherapie.

Eine weitere Ursache für die erhöhte Anzahl an spontan auftretenden Chromosomenaberrationen nach im Vergleich zu vor der Strahlentherapie könnte auch der Zeitpunkt der Blutentnahme sein. Tatsächlich konnte eine deutlich erhöhte Anzahl spontaner Aberrationen bei Blutentnahme unmittelbar bzw. bis zwei Monate nach Abschluss der Strahlentherapie beobachtet werden (Matsuoka et al. 1996, Rigaud et al. 1990). Unter der allgemein akzeptierten Annahme, dass Lymphozyten mit in vivo induzierten Chromosomenschäden erst nach längerer Zeit aus dem peripheren Blut eliminiert werden (Kondrashova et al. 1997, Neubauer et al. 1997, Neubauer et al. 1996), ist davon auszugehen, dass die erhöhte Anzahl an Chromosomenaberrationen direkt auf die therapeutische Strahlenexposition zurückzuführen ist. Die vorliegende Studie wurde dagegen an Patienten durchgeführt, deren strahlentherapeutische Behandlung mindestens zwei Jahre zurücklag.

Es kann zusammengefasst werden, dass es keine Erhöhung in der Anzahl spontan auftretender Chromosomenaberrationen bei Tumorpatienten vor bzw. nach Strahlentherapie im Vergleich zu gesunden Spendern gab, wenn sich die Studien auf die Bestimmung von azentrischen Chromosomenfragmenten fokussierten und lange nach Strahlentherapie durchgeführt wurden.

# 5.3. Chromosomenaberrationen nach in vitro Bestrahlung bei Tumorpatienten vor und nach Strahlentherapie im Vergleich zu gesunden Spendern

Die Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit erfolgte über den Nachweis strahleninduzierter azentrischer Chromosomenfragmente bei einer Bestrahlung mit 6 Gy. In einem Vorversuch wurde Probanden Blut entnommen und mit den Dosen 2, 4 und 6 Gy bestrahlt. Unbestrahlte Proben dienten als Kontrollen. Die Zellen wurden 48 h nach der Bestrahlung in der Mitose arretiert. Anschließend wurden Chromosomenpräparate hergestellt und ausgewertet (Abb. 2). Es zeigte sich ein linear-quadratischer Anstieg der Chromosomenfragmente mit zunehmender Dosis für alle untersuchten Spender. Der deutlichste Unterschied zeigte sich bei einer Dosis von 6 Gy. Ein linear-quadratischer Anstieg der azentrischen Chromosomenfragmente wurde ebenfalls von zahlreichen anderen Autoren beschrieben, die entweder Lymphozyten und/oder Fibroblasten zur Ermittlung der zellulären Strahlenempfindlichkeit nutzten (Borgmann et al. 2002, Cornforth und Bedford 1987, Rave-Frank et al. 2001, Virsik-Peuckert et al. 1997).

Vergleicht man die Anzahl der strahleninduzierten Chromosomenfragmente von gesunden Spendern mit den Werten von Tumorpatienten vor Beginn einer Strahlentherapie, so ergibt sich nach einer Bestrahlung mit 6 Gy für die gesunden Spender ein Mittelwert von 2,4  $\pm$  0,1. Die Tumorpatienten zeigten im Mittel 2,2  $\pm$  0,5 strahleninduzierte Chromosomenfragmente und unterschieden sich somit nicht von den gesunden Spendern. Keinen Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten ohne Strahlentherapie fanden ebenfalls Neubauer et al. (Neubauer et al. 1997) bei der Untersuchung von Lymphozyten nach in vitro Bestrahlung mittels der CISS-Technik. Auch Scott et al. (Scott et al. 1999) konnten in einem G2-Assay keinen Unterschied zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten in Metaphasenpräpraten von Lymphozyten zeigen. Von Nascimento et al. (Nascimento et al. 2001) wurde dagegen ein Unterschied zwischen gesunden Spendern und Tumorpatienten gefunden. In dieser Studie wurde jedoch der Comet-Assay verwendet, bei dem es sich um einen indirekten Nachweis von Chromosomenschäden handelt, indem diese mit dem visuellen Aspekt einer Elektrophorese korreliert werden. Weiterhin handelt es sich bei den Ergebnissen um Mittelwerte, die von jeweils nur drei Individuen stammen, also von einem äußerst kleinen Kollektiv. Aus den eigenen Daten und den Daten der Literatur kann daher gefolgert werden, dass es keinen Unterschied gibt in der Strahlenempfindlichkeit von gesunden Spendern verglichen mit Tumorpatienten, die noch keiner strahlentherapeutischen Behandlung unterzogen wurden, wenn sich die Untersuchungen auf den direkten mikroskopischen Nachweis von azentrischen Chromosomenfragmenten in einem ausreichend großen Patientenkollektiv beziehen.

Um zu überprüfen, ob die Strahlenempfindlichkeit von Lymphozyten durch eine Strahlentherapie verändert wird, wurden den Tumorpatienten zwei Jahre nach Strahlentherapie erneut Blutproben entnommen und diese ebenfalls mit 6 Gy bestrahlt. Bei der Untersuchung der Metaphasenpräparate fanden sich im Mittel 3,8 ± 0,6 strahleninduzierte Chromosomenfragmente. Es zeigte sich demnach eine Zunahme um im Mittel 1,6 zusätzliche azentrische Chromosomenfragmente im Verlauf der Strahlentherapie. In einer kürzlich durchgeführten weiteren Studie unseres Labors an einem anderen Patientenkollektiv konnten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden (Borgmann et al. 2008). Unter Verwendung desselben Essays wie in unserer Studie wurden 81 Patientinnen mit Mammakarzinom nach Strahlentherapie untersucht. Die Anzahl azentrischer

Chromosomenfragmente pro Zelle lag hier bei  $3,59 \pm 0,57$ , vergleichbar mit unseren Ergebnissen ( $3,8 \pm 0,6$ ). Eine signifikante Zunahme der Lymphozytenempfindlichkeit nach Strahlentherapie wurde ebenfalls von Legal et al. (Legal et al. 2002) bei der Untersuchung stabiler Aberrationen in Metaphasenpräparaten unter Verwendung der FISH-Technik beobachtet. Auch Neubauer et al. (Neubauer et al. 1997, Neubauer et al. 1996) fanden eine höhere Lymphozytenempfindlichkeit bei Patienten nach Strahlentherapie, verglichen mit anderen Patienten, die noch keine Bestrahlung erhalten hatten. Bei ihren Studien erfolgte die Auswertung der Metaphasen mittels der CISS-Technik. Entsprechende Ergebnisse konnten auch von Baeyens et al. (Baeyens et al. 2002) unter Anwendung des G0-Micronucleus-Assays gezeigt werden. Auch hier war die Lymphozytenempfindlichkeit von Patienten nach Strahlentherapie über die Bestrahlentherapie über die Bestrahlentherapie über die Bestimmung der "colony-forming-efficiency" bei Bestrahlung mit niedriger Dosisrate (LDR), verglichen mit gesunden Spendern und Patienten mit Ataxia teleagiectatica. Unter Verwendung von hoher Dosisrate (HDR) konnte dagegen keine erhöhte Strahlenempfindlichkeit gezeigt werden.

Es kann zusammengefasst werden, dass die meisten Studien ebenfalls über eine erhöhte Lymphozytenempfindlichkeit nach Strahlentherapie berichten. Diese Beobachtungen zeigen sich unter Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden. Oft handelt es sich jedoch um einen Vergleich unterschiedlicher Patientenkollektive. Lediglich Legal et al. (Legal et al. 2002) untersuchten dasselbe Patientenkollektiv sowohl vor als auch nach Strahlentherapie. Einschließlich der vorliegenden Studie zeigen demnach alle Studien, die isogenetisches Material auswerten, eine Zunahme der Lymphozytenempfindlichkeit im Verlauf einer Strahlentherapie. Im Unterschied zur Studie von Legal et al. wurde in dieser Untersuchung ein ausreichendes Intervall zwischen Strahlentherapie und Auswertung eingehalten. Dies erscheint unbedingt notwendig, da die unmittelbar durch Bestrahlung entstandenen Chromosomenschäden noch lange nach Exposition nachweisbar sind (Kondrashova et al. 1997, Neubauer et al. 1997, Neubauer et al. 1996).

#### 5.4. Interindividuelle Schwankungen

In den Ergebnissen dieser Untersuchung zeigte sich eine große interindividuelle Streubreite der azentrischen Chromosomenfragmente, sowohl bei Patienten vor Strahlentherapie, als auch bei Patienten, die zwei Jahre nach Strahlentherapie untersucht wurden. Vor Strahlentherapie lagen die Werte zwischen 1,4 und 3,4 mit einem Mittelwert von  $2,2 \pm 0,5$ . Nach Strahlentherapie fanden sich Werte zwischen 2,6 und 5,0, der Mittelwert lag hier bei 3,8  $\pm$  0,6. Auch bei Betrachtung der Differenz zwischen retrospektiver und prospektiver Untersuchung zeigte sich diese Streubreite. Die so ermittelten Differenzen der

azentrischen Chromosomenfragmente lagen zwischen 0,1 und 3,4 um einen Mittelwert von  $1,64 \pm 0,21$ .

Ebenfalls eine große interindividuelle Variabilität über den Nachweis von Mikrokernen wurde von zahlreichen anderen Autoren gefunden (Floyd und Cassoni 1994, Huber et al. 1992, Keller et al. 2004, Scott et al. 1999, Slonina und Gasinska 1997). Auch Pinar et al. (Pinar et al. 2007) zeigten eine erhebliche interindividuelle Streubreite von Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten bei einer Untersuchung mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese.

#### 5.5. Einflussgrößen auf die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente

Die Induktion strahleninduzierter Chromosomenfragmente kann durch viele Parameter beeinflusst werden. Es ist daher von großer Wichtigkeit eine derartige Untersuchung nach festen Regeln zu standardisieren um eine Anfälligkeit der Ergebnisse durch verschiedenste Einflüsse zu minimieren. Soweit dies nicht möglich ist, wie bei unterschiedlichen Therapieschemata für verschiedene Tumorentitäten, müssen diese Faktoren auf eine mögliche Ergebnisbeeinflussung gesondert untersucht werden. Derartige Einflussgrößen im Zusammenhang mit der vorliegenden Studie sollen im Folgenden dargestellt und untersucht werden.

#### 5.5.1. Einfluss der Gesamtbestrahlungsdosis

Um den Einfluss der Gesamtbestrahlungsdosis im Verlauf der Strahlentherapie zu untersuchen, wurde die Anzahl der strahleninduzierten Chromosomenfragmente gegen die Gesamtdosis aufgetragen (Abb. 11). Es zeigte sich ein leichter Anstieg mit zunehmender Dosis (50 Gy:  $3,46 \pm 0,09$ ; 60 Gy:  $3,88 \pm 0,22$ ; 66 Gy:  $3,92 \pm 0,31$ ).

Eine Abhängigkeit der Strahlenempfindlichkeit von der Bestrahlungsdosis wurde ebenfalls von Hill et al. (Hill et al. 2007) für Fibroblasten gezeigt. Auch für dizentrische Chromosomen und Mikrokerne in Lymphozyten konnte ein solcher Zusammenhang nachgewiesen werden (Bauchinger et al. 1993, Bedford 1991, Boei und Natarajan 1998, Fabry et al. 1988, Thierens et al. 1995).

Um zu differenzieren, ob dieser Effekt der Dosisabhängigkeit erst durch die Strahlentherapie zustande kommt, wurde zusätzlich nicht nur die Anzahl azentrischer Chromosomenfragmente nach Strahlentherapie betrachtet, sondern auch die Differenz dieser Anzahl zur Anzahl azentrischer Chromosomenfragmente vor Strahlentherapie. Diese Differenz wurde erneut gegen die applizierte therapeutische Gesamtdosis aufgetragen (Abb. 12), wobei der zuvor gezeigte Anstieg nicht reproduziert werden konnte. Die erhöhte Strahlenempfindlichkeit nach Strahlentherapie ist demnach nicht abhängig von der Gesamtdosis während der Therapie.

#### 5.5.2. Größe des Bestrahlungsfeldes

Die retrospektiven Untersuchungen der Patienten in dieser Studie fanden jeweils zwei Jahre nach Strahlentherapie statt. Zu diesem Zeitpunkt sind in peripheren Lymphozyten so gut wie keine in vivo induzierten Aberrationen mehr feststellbar (Neubauer et al. 1997, Neubauer et al. 1996). Die veränderten Chromosomeneigenschaften müssen demnach aus Schädigungen der Vorläuferzellen resultieren. Diese Stammzellen der Lymphozyten sind im blutbildenden Knochenmark zu finden, das vorwiegend im Beckenknochen und in den langen Röhrenknochen verteilt ist.

Es sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Größe des bestrahlten Knochenmarkanteils und der erhöhten Lymphozytenempfindlichkeit nach Strahlentherapie. Hierzu wurde das bestrahlte Knochenmarkvolumen für jeden Patienten berechnet. Anschließend wurden die Patienten in drei Gruppen aufgeteilt, je nach Größe des bestrahlten Knochenmarkanteils (Abb. 13). Es konnte kein Zusammenhang zwischen Knochenmarkvolumen und Lymphozytenempfindlichkeit festgestellt werden. Ein deutlicher Einfluss des bestrahlten Knochenmarkvolumens auf die Ausbildung von dizentrischen Chromosomen konnte dagegen von Gershkevitsh et al. (Gershkevitsh et al. 2002) gezeigt werden. In ihrer Studie wurde in Blutproben direkt nach Strahlentherapie die Anzahl der dizentrischen Chromosomen untersucht. Eine Einflussnahme auf die Empfindlichkeit der Lymphozyten nach in vitro Bestrahlung wurde nicht untersucht. Auch Yamada et al. (Yamada et al. 2000) fanden eine deutliche Korrelation von der Größe des bestrahlten Knochenmarkvolumens und der Anzahl aberranter Lymphozyten nach Blutentnahme direkt im Anschluss an die Strahlentherapie. Als aberrante Lymphozyten wurden hier Zellen gewertet, die sowohl letale als auch stabile Aberrationen aufwiesen. Die genannten Studien untersuchten nur spontan auftretende, nicht jedoch in vitro strahleninduzierte Chromosomenfragmente. Die fehlende Korrelation von bestrahltem Knochenmarkvolumen und der Anzahl der Chromosomenaberrationen in dieser Arbeit wird im Wesentlichen auf die geringe Anzahl der Probanden in den einzelnen Subgruppen zurückzuführen sein, jedoch bei ausreichender Zahl die Daten der Literatur bestätigen.

#### 5.5.3. Alter der Patienten

Das Alter der Tumorpatienten variierte zwischen 41 und 72 Jahren mit einem Mittelwert von  $60,45 \pm 2,12$ . Eine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Anzahl der Deletionen bei einer Dosis von 6 Gy konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigte sich ein Ansteig der spontanen Chromosomenaberrationen mit dem Alter.

Keine Abhängigkeit der strahleninduzierten Chromosomenaberrationen vom Alter, sowohl in der G1-Phase (Dede 2006, West et al. 1995), als auch in der G2-Phase, wurde auch von

anderen Autoren festgestellt (Barber et al. 2000, Parshad et al. 1996, Rached et al. 1998, Scott et al. 1998). Dies weist darauf hin, dass es keine Altersabhängigkeit der zellulären Strahlenempfindlichkeit gibt. Betrachtet man dagegen die Anzahl der spontan auftretenden stabilen Chromosomenaberrationen, so zeigt sich eine sehr deutliche Zunahme mit dem Alter der Patienten (Joksic et al. 1997, Mei et al. 1996, Neubauer et al. 1996, Reuterwall 1990, Slonina und Gasinska 1997, Tucker et al. 1994). Dies ist darauf zurückzuführen, dass stabile Chromosomenaberrationen meistens nicht zum Absterben der Zellen führen und deshalb über einen Lebenszeitraum von vielen Jahren akkumulieren können (Schicha und Schober 2003). Da diese Studie jedoch auf die Analyse von Deletionen und somit auf letale Aberrationen beschränkt ist, ist dieser Anstieg in diesem Rahmen nicht von Bedeutung.

#### 5.6. Schlussfolgerungen

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Empfindlichkeit von Lymphozyten, gemessen an der Anzahl strahleninduzierter Chromosomenaberrationen, durch eine Strahlentherapie modifiziert wird. So fanden sich bei 20 Tumorpatienten vor Beginn der Strahlentherapie keine Unterschiede in der Anzahl spontan auftretender Aberrationen im Vergleich zu gesunden Spendern. Dies wurde ebenfalls von anderen Autoren berichtet. Auch bei Betrachtung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen zeigte sich kein Unterschied zwischen Tumorpatienten und gesunden Spendern, weder in dieser Studie, noch in der Literatur. Zwei Jahre nach Strahlentherapie lag die Anzahl spontaner Aberrationen bei Tumorpatienten in demselben Bereich wie vor Therapiebeginn, was bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt keine direkten Strahlenschäden durch die strahlentherapeutische Behandlung mehr nachweisbar sind. Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Studien.

Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in der Anzahl strahleninduzierter Chromosomenfragmente zwei Jahre nach Strahlentherapie, sowohl im Vergleich mit denselben Patienten vor Therapiebeginn, als auch mit gesunden Spendern (p < 0,0001). Diese Ergebnisse, die erstmalig anhand isogenetischen Materials durchgeführt wurden, bestätigen die Untersuchungen vieler Autoren, die ebenfalls eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit in jeweils verschiedenen Untersuchungsgruppen zeigen konnten.

Die Gesamtbestrahlungsdosis während der Strahlentherapie, wie auch das Alter der Patienten, konnten nicht als einflussnehmende Größen identifiziert werden. Auch für die Größe des Bestrahlungsfeldes konnte kein Zusammenhang mit der Lymphozytenempfindlichkeit nach zwei Jahren gezeigt werden. Zu diesem Aspekt gibt es lediglich Studien, die Spontanaberrationen untersuchen. Sie sind somit nicht direkt vergleichbar, zeigen jedoch einen Trend zur Annahme, dass die Größe des Bestrahlungsfeldes ein wichtiger Faktor ist. Es müssten demnach noch weitere Studien durchgeführt werden, die die Lymphozytenempfindlichkeit anhand strahleninduzierter Chromosomenaberrationen untersuchen. Optimal wäre hier der Vergleich eines Patientenkollektivs mit hoher Knochenmarkdosis (z.B. Prostatakarzinom) mit einem Patientenkollektiv, welches nur eine geringe bzw. keine Knochenmarkdosis erhalten hat, beispielsweise Patienten mit einem Larynxkarzinom T1 oder T2.

#### 6. ZUSAMMENFASSUNG

Um eine Prädiktion der Normalgewebereaktionen vornehmen zu können, ist es notwendig, geeignete Testverfahren zu entwickeln. Dabei hat sich die Bestimmung der azentrischen Chromosomenfragmente in Lymphozyten als ein potentieller Marker etabliert (Borgmann et al. 2008, Hoeller et al. 2003). Unklar ist jedoch, ob die Bestimmung der azentrischen Chromosomenfragmente durch eine vorangegangene Therapie modifiziert wird. Für diese Fragestellung wurde die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente nach in vitro Bestrahlung - als Marker der individuellen zellulären Strahlenempfindlichkeit - sowohl vor als auch zwei Jahre nach Strahlentherapie untersucht, und mit einem Kontrollspendersowie einem bereits bestrahlen Mammakarzinomkollektiv verglichen.

Zu diesem Zweck wurden Blutproben von Probanden entnommen, in Kulturen aufgeteilt, bestrahlt und die Anzahl der azentrischen Chromosomenfragmente bestimmt.

Insgesamt wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Bezüglich spontan auftretender Chromosomenaberrationen besteht kein Unterschied zwischen gesunden Spendern (46,0±0,02 Chromosomenfragmente pro Zelle) und unbestrahlten Tumorpatienten (46,0±0,04).
- Für denselben Patienten besteht ebenfalls kein Unterschied bei Entnahme der Blutprobe vor oder zwei Jahre nach Strahlentherapie (46,0±0,04 vs. 46,1 ± 0,02).
- Auch f
  ür die Zahl der strahleninduzierten Chromosomenfragemente (6Gy) zeigt sich kein Unterschied zwischen gesunden Spendern (2,4±0,1) und unbestrahlten Patienten (2,2±0,5).
- Diese Zahl ist aber nach einer Strahlentherapie signifikant erhöht (2,4±0,1 vs. 3,8 ± 0,6; p<0,0001).</li>
- Diese Zunahme ließ sich f
  ür jeden Patienten nachweisen. Verschiedene Einflussgr
  ößen wurden untersucht. F
  ür keine dieser Einflussgr
  ößen, wie die Gesamtstrahlendosis w
  ährend der Therapie, der Anteil des bestrahlten Knochenmarks im Strahlenfeld oder das Alter der Patienten, konnte ein eindeutiger Einfluss auf diese Zunahme der Lymphozytenempfindlichkeit festgestellt werden.

Für zukünftige Studien haben die Ergebnisse die Konsequenz, dass Untersuchungen für die Entwicklung prädiktiver Testverfahren ausschließlich mit Blutproben durchgeführt werden sollten, welche vor einer therapeutischen Strahlenexposition entnommen wurden.

# 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Baeyens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, Messiaen L, De Ridder L, Vral A (2002) Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Br J Cancer. 87(12):1379-85.
- Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D (2000) Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. Radiother Oncol. 55(2):179-86.
- Baria K, Warren C, Roberts SA, West CM, Scott D (2001) Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? Br J Cancer. 84(7):892-6.
- 4. Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C. (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6 überarbeitete Auflage Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV. Berlin
- Bauchinger M, Schmid E, Zitzelsberger H, Braselmann H, Nahrstedt U (1993) Radiation-induced chromosome-aberrations analyzed by 2-color fluorescence in-situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA-probe. Int J Radiat Biol. 64(2):179-84.
- Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Francz PI (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. Proc Natl Acad Sci U S A. 85(14):5112-6.
- Bedford JS (1991) Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomalaberrations in mammalian-cells exposed to ionizing-radiations. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 21(6):1457-69.
- 8. Bentzen SM, Overgaard J (1994) Patient-to-patient variability in the expression of radiation-induced normal tissue injury. Semin Radiat Oncol. 4(2):68-80.
- 9. Bernhard M (2002) Bedeutung der individuellen Strahlenempfindlichkeit für die Akutreaktion nach Strahlentherapie. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- 10. Bocker W, Streffer C, Muller WU, Yu C (1996) Automated scoring of micronuclei in binucleated human lymphocytes. Int J Radiat Biol. 70(5):529-37.

- 11. Boei J, Natarajan AT (1998) Combined use of chromosome painting and telomere detection to analyse radiation-induced chromosomal aberrations in mouse splenocytes. Int J Radiat Biol. 73(2):125-33.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dalpra L, Deferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P, Sbrana I, Vecchio D, Puntoni R (1995) Are chromosome-aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans - Preliminary-results of an italian cohort study. Cancer Genet Cytogenet. 79(2):133-5.
- Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, Heikkila P, Wanders S, Wilhardt P, Hansteen IL, Knudsen LE, Norppa H (2000) Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. Cancer Res. 60(6):1619-25.
- Borger JH, Kemperman H, Smitt HS, Hart A, van Dongen J, Lebesque J, Bartelink H (1994) Dose and volume effects on fibrosis after breast conservation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 30(5):1073-81.
- 15. Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Roper B, Brackrock S, Petersen C, Szymczak S, Ziegler A, Feyer P, Alberti W, Dikomey E (2008) Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 71(1):256-64.
- 16. Borgmann K, Roper B, Abd El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dork T, Alberti W, Dikomey E, Dahm-Daphi J (2002) Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. Radiother Oncol. 64(2):141-52.
- Brewen JG, Gengozian N (1971) Radiation-induced human chromosome aberrations.
  II. Human in vitro irradiation compared to in vitro and in vivo irradiation of marmoset leukocytes. Mutat Res. 13(4):383-91.
- 18. Brewen JG, Luippold HE (1971) Radiation-Induced human chromosome aberrations in vitro dose rate studies. Mutat Res. 12(3):305-14.
- Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J, Peters LJ (1995) Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 32(5):1371-9.

- Bundesamt für Strahlenschutz (2007) Individuelle Strahlenempfindlichkeit. [Online im Internet] http://www.bfs.de/ion/wirkungen/strahlenempfinglichkeit.html [Stand: 08.07.2009].
- 21. Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH (1998) Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity. Steering committee of the biomed2 european union concerted action programme on the development of predictive tests of normal tissue response to radiation therapy. Int J Cancer. 79(6):606-13.
- 22. Burnet NG, Nyman J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH (1992) Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. Lancet. 339(8809):1570-1.
- 23. Burnet NG, Wurm R, Peacock JH (1996) Low dose-rate fibroblast radiosensitivity and the prediction of patient response to radiotherapy. Int J Radiat Biol. 70(3):289-300.
- 24. Buselmaier W. (2006) Biologie für Mediziner. 10. Auflage. Springer. Berlin
- 25. Classen M, Diehl V, Kochsiek K. (1994) Innere Medizin. 3. Auflage. Urban & Schwarzenberg. München
- 26. Cornforth MN, Bedford JS (1987) A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human-fibroblasts. Radiat Res. 111(3):385-405.
- Cox JD, Stetz J, Pajak TF (1995) Toxicity criteria of the radiation-therapy oncology group (RTOG) and the european-organization-for-research-and-treatment-of-cancer (EOTRC). International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 31(5):1341-6.
- Dede M (2006) Bedeutung letaler Chromosomenaberrationen f
  ür die Strahlenempfindlichkeit von normalen humanen Fibroblasten. Med. Dissertation. Universit
  ät Hamburg.
- Deklein A (1987) Genetic mechanisms in tumor initiation and progression. 7.
   Oncogene activation by chromosomal rearrangement in chronic myelocytic-leukemia. Mutat Res. 186(2):161-72.
- Dikomey E, Borgmann K, Brammer I, Kasten-Pisula U (2003) Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. Toxicology. 193(1-2):125-35.

- Dikomey E, Lorenzen J (1993) Saturated and unsaturated repair of DNA strand breaks in CHO cells after X-irradiation with doses ranging from 3 to 90 Gy. Int J Radiat Biol. 64(6):659-67.
- 32. Dorr W, Hendry JH (2001) Consequential late effects in normal tissues. Radiother Oncol. 61(3):223-31.
- 33. El-Awady RA, Mahmoud M, Saleh EM, El-Baky HA, Lotayef M, Dahm-Daphi J, Dikomey E (2005) No correlation between radiosensitivity or double-strand break repair capacity of normal fibroblasts and acute normal tissue reaction after radiotherapy of breast cancer patients. Int J Radiat Biol. 81(7):501-8.
- 34. Fabry L, Leonard A, Decat G, Deknudt G, Jacquet P, Leonard ED (1988) Chromosome-aberrations in mixed cultures of invitro irradiated and unirradiated human-lymphocytes. Strahlenther Onkol. 164(2):108-10.
- 35. Floyd DN, Cassoni AM (1994) Intrinsic radiosensitivity of adulte and core blood lymphocytes as determined by the micronucleus assay. Eur J Cancer. 30(5):615-20.
- 36. Fohe C, Dikomey E (1994) Induction and repair of DNA base damage studied in Xirradiated CHO cells using the M. luteus extract. Int J Radiat Biol. 66(6):697-704.
- 37. Freitas AA, Rocha B, Coutinho AA (1986) Life span of B lymphocytes: The experimental basis for conflicting results. The Journal of Immunology. 136(2):470-6.
- Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA (1993) Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 27(5):1173-9.
- Genuardi M, Zollino M, Serra A, Leone G, Mancini R, Mango G, Neri G (1988) Longterm cytogenetic effects of antineoplastic treatment in relation to secondary leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 33:201-11.
- 40. Gershkevitsh E, Hildebrandt G, Wolf U, Kamprad F, Realo E, Trott KR (2002) Chromosomal aberration in peripheral lymphocytes and doses to the active bone marrow in radiotherapy of prostate cancer. Strahlenther Onkol. 178(1):36-42.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2006) Gesundheit in Deutschland, 2006.
   Robert-Koch-Institut, Berlin [Online im Internet] http://www.gbe-bund.de [Stand: Juli 2006].
- 42. Hagemeijer A (1987) Chromosome abnormalities in CML. Baillieres Clin Haematol. 1(4):963-81.

- 43. Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C (1998) Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the european study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH). Cancer Res. 58(18):4117-21.
- 44. Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, Reuterwall C, Salomaa S, Skerfving S, Sorsa M (1994) Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. Cancer Res. 54:2919-22.
- 45. Herrmann T, Baumann M, Dörr W. (2006) Klinische Strahlenbiologie kurz und bündig. 4. Auflage. Urban & Fischer. München, Jena
- Hill RP, Kaspler P, Griffin AM, O'Sullivan B, Catton C, Alasti H, Abbas A, Heydarian M, Ferguson P, Wunder JS, Bell RS (2007) Studies of the in vivo radiosensitivity of human skin fibroblasts. Radiother Oncol. 84(1):75-83.
- 47. Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. (2006) Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 6 Auflage. Thieme. Stuttgart
- 48. Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmey A, Bajrovic A, Jung H, Alberti W, Dikomey E (2003) Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. Radiother Oncol. 69(2):137-44.
- 49. Holthusen (1936) Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlung und deren Nutzanwendung zur Verhütung von Schäden. Strahlenther Onkol. 57:7.
- Huber R, Braselmann H, Bauchinger M (1992) Intra- and inter-individual variation of background and radiation-induced micronucleus frequencies in human lymphocytes. Int J Radiat Biol. 61(5):655-61.
- Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J, Overgaard M (1996) Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. Radiother Oncol. 40(2):101-9.
- 52. Joksic G, Nikolic M, SpasojevicTisma V (1997) Radiosensitivity of different aged human lymphocytes following electron irradiation in vitro. Neoplasma. 44(2):117-21.
- 53. Jones LA, Scott D, Cowan R, Roberts SA (1995) Abnormal radiosensitivity of lymphocytes from breast cancer patients with excessive normal tissue damage after

radiotherapy: chromosome aberrations after low dose-rate irradiation. Int J Radiat Biol. 67(5):519-28.

- 54. Keller U, Kuechler A, Liehr T, Muller E, Grabenbauer G, Sauer R, Distel L (2004) Impact of various parameters in detecting chromosomal aberrations by FISH to describe radiosensitivity. Strahlenther Onkol. 180(5):289-96.
- 55. Kiltie AE, Ryan AJ, Swindell R, Barber JB, West CM, Magee B, Hendry JH (1999) A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. Radiother Oncol. 51(1):55-65.
- 56. Kleinerman RA, Littlefield LG, Tarone RE, Machado SG, Blettner M, Peters LJ, Boice JD (1989) Chromosome-aberrations in peripheral lymphocytes and radiation-dose to active bone-marrow in patients treated for cancer of the cervix. Radiat Res. 119(1):176-90.
- 57. Kleinerman RA, Littlefield LG, Tarone RE, Sayer AM, Cookfair DL, Wactawskiwende J, Inskip PD, Block AMW, Ramesh KH, Boice JD (1994) Chromosome-aberrations in lymphocytes from women irradiated for benign and malignant gynecological disease. Radiat Res. 139(1):40-6.
- 58. Kleinerman RA, Littlefield LG, Tarone RE, Sayer AM, Hildreth NG, Pottern LM, Machado SG, Boice JD (1990) Chromosome-aberrations in relation to radiation-dose following partial-body exposures in 3 populations. Radiat Res. 123(1):93-101.
- 59. Koecke H, Emschermann P, Härle E. (2000) Biologie. 4. Auflage. Schattauer.
- Kondrashova TV, Ivanova TI, Katsalap SN (1997) Chromosome aberrations in cultured peripheral lymphocytes from persons with elevated shin radiosensitivity. Environ Health Perspect. 105:1437-9.
- Legal JD, De Crevoisier R, Lartigau E, Morsli K, Dossou J, Chavaudra N, Sanfilippo N, Bourhis J, Eschwege F, Parmentier C (2002) Chromosomal aberrations induced by chemotherapy and radiotherapy in lymphocytes from patients with breast carcinoma. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 52(5):1186-95.
- Lindholm C, Tekkel M, Veidebaum T, Ilus T, Salomaa S (1998) Persistence of translocations after accidental exposure to ionizing radiation. Int J Radiat Biol. 74(5):565-71.

- 63. Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS (1986) Chromosome-aberrations induced in human-lymphocytes by invitro acute-x and gamma-radiation. Radiation Protection Dosimetry. 15(2):83-8.
- 64. Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB (1990) In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer. Radiat Res. 121(2):227-31.
- 65. Matsuoka A, Yamada K, Hayashi M, Sofuni T (1996) Chromosomal aberrations detected by chromosome painting in lymphocytes from cancer patients given high doses of therapeutic X-rays. J Radiat Res (Tokyo). 37(4):257-65.
- 66. Mei N, Imada H, Nomoto S, Kunugita N, Norimura T (1996) Individual variation and age dependency in the radiosensitivity of peripheral blood T-lymphocytes from normal donors. Radiat Res. 37:235-45.
- Momm F, Bartelt S, Haigis K, Grosse-Sender A, Witucki G (2005) Spectrophotometric skin measurements correlate with EORTC/RTOG-common toxicity criteria. Strahlenther Onkol. 181(6):392-5.
- Nascimento PA, da Silva M, Oliveira EM, Suzuki MF, Okazaki K (2001) Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. Braz J Med Biol Res. 34(2):165-76.
- 69. National Cancer Institute (2006) Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) v3.0. [Online im Internet] http://ctep.cancer.gov [Stand: 09.12.2006].
- 70. Neubauer S, Dunst J, Gebhart E (1997) The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients. Radiother Oncol. 43(2):189-95.
- 71. Neubauer S, Gebhart E, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J (1996) Is chromosome in situ suppression (CISS) hybridization suited as a predictive test for intrinsic radiosensitivity in cancer patients? Int J Oncol. 8(4):707-12.
- 72. Norman A, Kagan AR, Chan SL (1988) The importance of genetics for the optimization of radiation therapy. A hypothesis. Am J Clin Oncol. 11(1):84-8.
- 73. Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M (2001) The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome. Int J Radiat Biol. 77(1):105-10.

- 74. Parshad R, Price FM, Bohr VA, Cowans KH, Zujewski JA, Sanford KK (1996) Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer. Br J Cancer. 74(1):1-5.
- Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J (2000) Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. Radiother Oncol. 55(2):173-8.
- 76. Pinar B, Lara PC, Lloret M, Bordon E, Nunez MI, Villalobos M, Guerrero R, Luna JD, de Almodovar JMR (2007) Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. Radiat Res. 168(4):415-22.
- 77. Rached E, Schindler R, Beer KT, Vetterli D, Greiner RH (1998) No predictive value of the micronucleus assay for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy. Eur J Cancer. 34(3):378-83.
- 78. Rave-Frank M, Virsik-Kopp P, Pradier O, Nitsche M, Grunefeld S, Schmidberger H (2001) In vitro response of human dermal fibroblasts to X-irradiation: relationship between radiation-induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. Int J Radiat Biol. 77(12):1163-74.
- 79. Reuterwall C (1990) A nordic data-base on somatic chromosome-damage in humans. Mutat Res. 241(3):325-37.
- Rigaud O, Guedeney G, Duranton I, Leroy A, Doloy MT, Magdelenat H (1990) Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast-cancer patients. 1. Chromosome-aberrations induced invivo. Mutat Res. 242(1):17-23.
- 81. Rudat V, Dietz A, Conradt C, Weber KJ, Flentje M (1997) In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer. Radiother Oncol. 43(2):181-8.
- 82. Rudat V, Dietz A, Nollert J, Conradt C, Weber KJ, Flentje M, Wannenmacher M (1999) Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. Radiother Oncol. 53(3):233-45.

- Russell NS, Grummels A, Hart AA, Smolders IJ, Borger J, Bartelink H, Begg AC (1998) Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. Int J Radiat Biol. 73(6):661-70.
- 84. Ryabchenko N, Nasonova V, Antoschina M, Fesenko E, Kondrashova T, Ivanova T, Pavlov V, Ryabikhina N, Terekhova A (2003) Persistence of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from Hodgkin's lymphoma remission patients. Int J Radiat Biol. 79(4):251-7.
- 85. Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, Hendry JH (2002) Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 52(1):198-204.
- 86. Schicha H, Schober O. (2003) Nuklearmedizin Basiswissen und klinische Anwendung. 5. Auflage. Schattauer. Stuttgart, New York
- 87. Scott D, Barber JBP, Levine EL, Burrill W, Roberts SA (1998) Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? Br J Cancer. 77(4):614-20.
- Scott D, Barber JBP, Spreadborough AR, Burrill W, Roberts SA (1999) Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. Int J Radiat Biol. 75(1):1-10.
- Slonina D, Gasinska A (1997) Intrinsic radiosensitivity of healthy donor and cancer patients as determined by the lymphocyte micronucleus assay. Int J Radiat Biol. 72:693-701.
- 90. Sobin LH, Wittekind C. (2002) TNM classification of malignant tumors. 6th edition. John Wiley & Sons. New Jersey
- 91. Sperlich D, Sperlich M. (2000) Biologie für Mediziner. Urban & Fischer.
- 92. Sprent J, Basten A (1973) Circulating T and B lymphocytes of the mouse. II. Lifespan. Cell Immunol. 7:40.
- 93. Sprent J, Miller JFAP (1972) Thoracic duct lymphocytes from nude mice: migratory properties and life span. Eur J Immunol. 2:384.
- 94. Spruill MD, Nelson DO, Ramsey MJ, Nath J, Tucker JD (2000) Lifetime persistence and clonality of chromosome aberrations in the peripheral blood of mice acutely exposed to ionizing radiation. Radiat Res. 153(1):110-21.

- Statistisches Bundesamt (2008) Todesursachen in Deutschland 2007. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden [Online im Internet] http://www.gbe-bund.de [Stand: 05.05.2009].
- Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA (1975) Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. Nature. 258(5534):427-9.
- 97. Terzoudi GI, Jung T, Hain J, Vrouvas J, Margaritis K, Donta-Bakoyianni C, Makropoulos V, Angelakis P, Pantelias GE (2000) Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved. Int J Radiat Biol. 76(5):607-15.
- 98. Thierens H, Vral A, Vaneijkeren M, Speleman F, Deridder L (1995) Micronucleus induction in peripheral-blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical-cancer or hodgkins-disease. Int J Radiat Biol. 67(5):529-39.
- 99. Tucker JD, Lee DA, Ramsey MJ, Briner J, Olsen L, Moore DH (1994) On the frequency of chromosome exchanges in a control population measured by chromosome painting. Mutation Research-Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 313(2-3):193-202.
- 100. Tucker SL, Turesson I, Thames HD (1992) Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. Eur J Cancer. 28A(11):1783-91.
- 101. Turesson I (1990) Individual variation and dose dependency in the progression rate of skin telangiectasia. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 19(6):1569-74.
- Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A (1996) Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 36(5):1065-75.
- 103. Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Chang-Claude J (2003) Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. Radiother Oncol. 69(2):145-53.
- 104. Virsik-Peuckert P, Rave-Frank M, Langebrake U, Schmidberger H (1997) Differences in the yields of dicentrics and reciprocal translocations observed in the chromosomes of irradiated human skin fibroblasts and blood lymphocytes from the same healthy individuals. Radiat Res. 148(3):209-15.

- 105. West CM, McKay MJ, Holscher T, Baumann M, Stratford IJ, Bristow RG, Iwakawa M, Imai T, Zingde SM, Anscher MS, Bourhis J, Begg AC, Haustermans K, Bentzen SM, Hendry JH (2005) Molecular markers predicting radiotherapy response: report and recommendations from an International Atomic Energy Agency technical meeting. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 62(5):1264-73.
- 106. West CML, Davidson SE, Hendry JH, Hunter RD (1991) Prediction of cervicalcarcinoma response to radiotherapy. Lancet. 338(8770):818-.
- 107. West CML, Elyan SAG, Berry P, Cowan R, Scott D (1995) A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer-patients, individuals with ataxia-telangiectasia (a-T) and a-T heterozygotes. Int J Radiat Biol. 68(2):197-203.
- 108. Willich N, Baumann M, Dikomey E, Flentje M, Herrmann T, Rodemann H, Stuschke
   M (2002) Zur biologischen Forschung in der Radioonkologie. Positionspaper der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie. [Online im Internet] www.degro.org
- 109. Yamada S, Durante M, Ando K, Furusawa Y, Kawata T, Majima H, Tsujii H (2000) Complex-type chromosomal exchanges in blood lymphocytes during radiation therapy correlate with acute toxicity. Cancer Lett. 150(2):215-21.

#### 8. DANKSAGUNG

Frau Dr. Kerstin Borgmann danke ich außerordentlich für ihre ausgezeichnete Betreuung. Sie verstand es jederzeit, mich zu motivieren, und unterstützte mich mit entscheidenden Hinweisen und neuen weiterführenden Ideen. Durch ihr Engangement bekam ich die Gelegenheit zur Kongressteilnahme, was für mich ein prägendes Erlebnis war.

Mein besonderer Dank gilt zudem Prof. Dr. Ekkehard Dikomey für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas. Ihm bin ich darüber hinaus sehr dankbar für eine exzellente Vorbereitung auf den Vortrag im Rahmen des DEGRO-Kongresses mit vielen Tipps und rhetorischen Kniffen.

Großen Dank möchte ich auch an die vielen Mitarbeiter des Labors richten, insbesondere an Jutta Schäfer für ihre technische Einweisung und geduldige Unterstützung, sowie für die große Hilfe bei der Auswertung der Zellen.

Frau Dr. Ulrike Höller danke ich für die Möglichkeit der Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Schließlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken für Unterstützung und Motivation, insbesondere bei meinen Eltern für das Korrekturlesen der Arbeit, und bei Marion für die seelische Unterstützung und das Aufzeigen der wirklich wichtigen Dinge im Leben.

### 9. LEBENSLAUF

Birger Manuel Jend geb.: 27.02.1976 in Berlin

### Eltern

Prof. Dr. med. Hans-Holger Jend, ehem. Leitender Arzt der radiologischen Abteilung im Klinikum Bremen-Ost Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Irene Jend-Rossmann, Ärztin für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Plastische Operationen

# Schulbildung

1982 – 1986	Grundschule Klein-Flottbeker-Weg in Hamburg
1986 – 1996	Gymnasium Christianeum in Hamburg

### Wehrersatzdienst

08/1996 - 09/1997	Kindertagesstätte	Windmühlenweg,	Hamburg
-------------------	-------------------	----------------	---------

### Studium der Humanmedizin

10/1997 – 09/2001	Universität Hamburg
10/2001 – 10/2004	Universität zu Köln
10/2003 – 09/2004	Praktisches Jahr im Klinikum Leverkusen

## **Beruflicher Werdegang**

17.01.2005	Approbation als Arzt
02/2005 – 09/2006	Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung des St. Antonius Krankenhauses Köln-Bayenthal
10/2006 – 09/2009	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Kreiskrankenhauses Gummersbach
07/2007	Fachkunde Rettungsdienst
seit 12/2009	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Köln

# **10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift.....