Aus dem Institut für Biophysik und Strahlenbiologie
der Universität Hamburg
Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. H. Jung

Wirksamkeit von Bestrahlungsschemata mit variabler Dosis pro Fraktion am Rhabdomyosarkom R1H der Ratte

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Manuel Rett

aus Bad Oldesloe

Hamburg 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg.

Sprecher:

Referent:

Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....1
1.1. Begriffsbestimmung der Strahlenbiologie 1
1.2. Die Faktoren der biologischen Wirkung von Strahlen.....1
1.2.1. Reparatur.....2
1.2.2. Repopulierung.....3
1.2.3. Reoxygenierung.....4
1.2.4. Redistribution.....4
1.2.5. Rekruitment.....5
1.2.6. Regression.....5
1.2.7. Metastasierung.....6
1.2.8. Radiosensitivität.....6
1.3. Klinische Strahlenbiologie.....6
1.4. Konzeption der Experimente.....7

2. Material und Methoden.....10
2.1. Versuchsaufbau.....10
2.2. Tumorsystem.....10
2.3. Therapieschema und Bestrahlung.....12
2.4. Volumenmessung.....16
2.5. Nachbeobachtung.....18
2.6. Wachtums-, Nettowachstumsverzögerung und Tumorbetteffekt.....18
2.7. Lokale Tumorkontrolle.....19
2.8. Lokale Tumorkontrolldosis TCD37%.....19

3. Ergebnisse.....23
3.1. Lokale Heilungsraten.....23
3.2. TCD 37%.....23
3.3. Wachstumskurven der Tumoren.....23
3.4. Wachstums- , Nettowachstumsverzögerung und Tumorbetteffekt.....26

4. Diskussion von Material und Methoden.....34
4.1. Streuung der Startvolumina.....34
4.2. Abhängigkeit der Wachstums-, Nettowachstumsverzögerung und des Tumorbetteffektes vom Startvolumen.....34

5. Diskussion der Ergebnisse.....39
5.1. TCD37% 39
5.2. Lokale Heilungsraten.....39
5.3. Wachstumskurven der Tumoren.....39
5.4. Wachstums-, Nettowachstumsverzögerung und Tumorbetteffekt.....40

6. Zusammenfassung.....42

7. Literatur.....43

8. Danksagung.....49

9. Lebenslauf.....50

10. Erklärung.....51

1. Einleitung

1.1. Begriffsbestimmung der Strahlenbiologie

Die Strahlenbiologie als Wissenschaft untersucht die Wirkung ionisierender Strahlen auf biologische Systeme. Als Fach der Grundlagenforschung befaßt sie sich auch mit der Anwendung ionisierender Strahlen in der Medizin. Die klinische Strahlenbiologie ist hierbei zwar nicht mit der experimentellen Strahlentherapie gleichzusetzen, ihre Berührungspunkte sind jedoch vielfältig und die Übergänge oft fließend. Die Erkenntnisse der klinischen Strahlenbiologie sind Grundlage für die Bearbeitung von Fragestellungen in der Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Röntgendiagnostik. Sie spielen aber auch eine Rolle bei Fragen von Strahlenwirkungen außerhalb des medizinischen Bereichs, z.B. Kernenergie, Akut- und Spätfolgen von Kernexplosionen, Strahlenunfällen, Strahlenschutz etc. Die biologischen Faktoren der Wirkung von ionisierenden Strahlen sind vielfältig, interagieren miteinander und besitzen jeder für sich eine zeitliche Determinante. Daher ist eine ursächliche Trennung oft schwierig. Es ist anzunehmen, daß noch nicht alle Faktoren der biologischen Wirkung von ionisierenden Strahlen bekannt sind, da die beschreibenden mathematischen Modelle nicht vollständig die beobachteten Effekte wiedergeben können (Herrmann & Baumann, 1997). Diese Faktoren sollen im Folgenden, soweit sie bekannt sind, erklärt werden.

1.2. Die Faktoren der biologischen Wirkung von Strahlen

Die verschiedenen Faktoren, die auf der biologischen Basis die Wirkung von Strahlen bestimmen, sind von Withers 1974 als sogenannten „R´s“ der Strahlentherapie erstmals zusammenfassend beschrieben worden. Diese Faktoren beginnen im Englischen alle mit dem Buchstaben R. Es sind dies: Reparatur (engl.: repair oder recovery), Repopulierung (repopulation), Reoxygenierung (reoxygenation), Redistribution (redistribution oder reassortment), Rekruitment (recruitment), Regression (regression), Metastasierung (reseeding) und die intrinsische Strahlensensibilität (radiosensitivity).

1.2.1. Reparatur

Ionisierende Strahlen können mit allen Molekülen aus der eine Zelle besteht interagieren. Diese Interaktion kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Interaktion wird die Strahlenenergie direkt vom Molekül absorbiert. Bei der indirekten Wirkung entstehen chemische Radikale die über Diffusion zum Molekül gelangen und dort interagieren. Beide Interaktionsarten bewirken eine chemische Veränderung am Molekül. Diese Veränderung kann das Molekül in seiner Funktion negativ beeinflussen, es also schädigen. Die im Sinne der Strahlenbiologie wichtigste Interaktion findet mit dem Makromolekül DNA statt. Es werden an der DNA hauptsächlich vier Arten von Schäden unterschieden: Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden und gehäufte Läsionen. Da die DNA zur Zellreplikation und zum Zellüberleben notwendig ist, können DNA-Schäden, die nicht adäquat repariert werden, kurz- oder langfristig zum Zelltod führen. Einzelstrangbrüche und Basenschäden werden durch Exzision repariert. Doppelstrangbrüche können auf drei verschiedenen Wegen repariert werden: homologe Rekombination (hierbei fungiert das Schwesterchromosom als Matrize), nicht homologe Rekombination (Abbau der DNA bis zu einer Stelle, die wieder eine Homologie aufweist) und direkte End-zu-End-Verbindung ohne Sequenzverlust. Gehäufte Läsionen sind verschiedenartige Schäden in dichter Nachbarschaft zueinander. Diese können auch repariert werden. Der Mechanismus ist derzeit aber noch unbekannt (Herrmann & Baumann, 1997). Tumor- und Normalgewebszellen sind beide in der Lage diese Schäden zu reparieren. Der biologische Effekt einer Bestrahlung liegt darin, daß Doppelstrangbrüche zum Teil nicht oder falsch repariert werden. Dadurch ist es möglich, daß während der Lebensphase einer sich teilenden Zelle letale Chromosomenaberrationen mit Verlust von Geninformation entstehen. Für die meisten letalen Chromosomenaberrationen sind zwei dicht beieinander liegende Doppelstrangbrüche verantwortlich. Die Reparatur von Strahlenschäden kann durch die Messung von Dosiswirkungskurven an Zellkulturen gemessen werden. Die resultierenden Überlebenskurven haben die charakteristische Form einer Schulterkurve. Die Form der Kurve läßt sich mit einem mathematischen Modell beschreiben, dem linear-quadratischen Modell (Kellerer & Rossi, 1972).

$$\text{Effekt} = \alpha d + ßd^2$$

Mit d wird die Dosis beschrieben, α und ß beschreiben Proportionalitätskonstanten. Die lineare Komponente αd spiegelt die Anfangsneigung, die quadratische Komponente $ßd^2$ die Krümmung der Dosiswirkungskurve wieder. Der molekulare Hintergrund dieser beiden Komponenten ist noch nicht bekannt (Beck-Bornholdt, 1998).

Es existiert aber eine Hypothese, die diese Mechanismen erklären könnte. Der Schadenstyp der linearen Komponente wird durch ein einziges Schadensereignis verursacht. Wird der Schaden nicht oder unvollständig repariert, ist er für die Zelle letal. Das Auftreten der Schäden ist proportional zur Dosis. Die Wahrscheinlichkeit für das Nicht- oder unvollständige Reparieren ist aber nicht von der Dosis abhängig. Damit ist der Effekt proportional zur Dosis:

$$\text{Effekt} = \alpha d$$

Der Schadenstyp der quadratischen Komponente ist selbst nicht letal für die Zelle, ein sogenannter subletaler Schaden. Die Wechselwirkung zweier subletaler Schäden ist hingegen letal für die Zelle. Das Auftreten der Schäden ist wiederum proportional zur Dosis. Die Wahrscheinlichkeit für die Nicht- oder unvollständige Reparatur ist wiederum nicht von der Dosis abhängig. Bei dem Auftreten der Schäden handelt es sich um gegenseitig unabhängige Ereignisse, deren Wahrscheinlichkeiten mathematisch gesehen multipliziert werden müssen. Die Wahrscheinlichkeit für die Wechselwirkung zweier subletaler Schadensereignisse ist demnach proportional zum Quadrat der Dosis.

$$\text{Effekt} = ßd^2$$

Die Krümmung der Zellüberlebens- (Schulter-) kurve wird durch das Verhältnis α/ß der beiden Komponenten bestimmt. Die beiden Komponenten spielen in Geweben, die akut oder später auf Bestrahlung reagieren, eine unterschiedliche Rolle. Dies wird durch den Quotienten α/ß der beiden Komponenten angegeben. Der Quotient wird in Gray (Gy) angegeben. Dieser liegt bei akut reagierenden Geweben im Bereich von 7 bis 20 Gy (kleine Schulter/Krümmung), bei spät reagierenden Geweben zwischen 1 und 6 Gy (große Schulter/Krümmung), (Thames & Hendry, 1987; Tubiana et al., 1990).

1.2.2. Repopulierung

Repopulierung bedeutet, daß sich die Zellen des Tumors wieder vermehren, nachdem ein bestimmter prozentualer Anteil der Tumorzellen abgetötet worden ist. Dieser Umstand wirkt sich negativ auf die Tumortherapie aus. Je mehr Zeit ein Tumor zwischen den einzelnen Fraktionen hat, desto mehr kann er repopulieren. Im Gesamtzusammenhang bedeutet eine Verlängerung der Gesamtbehandlungszeit einen Verlust an Dosiswirkung durch Tumorzellrepopulierung. Ebenso repopuliert auch Normalgewebe, z.B. die Haut.

In der Haut werden vor allem die teilungsfähigen Basalzellen durch die Bestrahlung abgetötet. Mit einer gewissen Latenzzeit, die der Zellumsatzrate der Haut entspricht, macht sich die Bestrahlung in Form eines Erythems und einer Hautabschilferung bemerkbar. Dabei ist das Erythem nicht die direkte Folge der Bestrahlung, sondern eine Art Entzündungsreaktion des Gewebes auf abgestorbene Normalgewebszellen. In Anlehnung an die Ergebnisse von Pentland et al. (1990), könnte diese Reaktion auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Aktivierung von Entzündungszellen durch Zellschäden erklärt werden. Früh reagierende Gewebe wie Haut- und Schleimhaut und klonogene Tumorzellen können im Anschluß an eine Bestrahlung auch beschleunigt (akzeleriert) repopulieren (Hermens & Barendsen, 1969; Denekamp, 1973; Stephens et al., 1978; Dörr & Kummermehr, 1990). Spät reagierende Gewebe repopulieren nur sehr langsam oder gar nicht. Eine ausführliche Abhandlung zum Thema Repopulierung findet sich bei Willers (1994).

1.2.3. Reoxygenierung

Sauerstoff spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Strahlenempfindlichkeit. Die Sauerstoffmoleküle reagieren mit den durch Bestrahlung an der DNA entstandenen Radikalen und fixieren die Strahlenschäden. Bei der Bestrahlung von Tumoren hat die Sauerstoffversorgung der Tumoren eine enorme Bedeutung. Die Wirkung der Bestrahlung nimmt in etwa um den Faktor 3 ab, wenn der Tumor vollständig anoxisch ist, im Gegensatz zu einem vollständig oxischen Tumor. Die Sauerstoffversorgung eines Tumors ist direkt von seiner Gefäßversorgung abhängig. Tumorzellen in direkter Nachbarschaft zu den Gefäßen sind besser mit Sauerstoff versorgt, als die, die sich in weiterer Entfernung befinden (Diffusion). Gut oxygenierte Tumorzellen werden bevorzugt durch die Bestrahlung abgetötet. Dadurch gelangt vermehrt Sauerstoff zu den hypoxischen Zellen. Diese werden wiederum stärker oxygeniert und durch die nächste Bestrahlung ebenfalls abgetötet. Diese Reoxygenierung ist zeitabhängig. Tumorblutgefäße besitzen nicht die gleichen physiologischen Eigenschaften wie normale Blutgefäße. Sie neigen eher zum Verschluß durch Blutgerinnsel (Riede et al., 1989; Hall, 1994). Dieser Umstand beeinflußt ebenfalls die Sauerstoffversorgung der Tumorzellen (Perfusion).

1.2.4. Redistribution

In einem Tumor liegen die Tumorzellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus verteilt vor. Die strahlenempfindlichsten Phasen im Zellzyklus sind im Allgemeinen die G_2- und die M-Phase. Unter der Bestrahlung werden vornehmlich die Zellen in der G_2- und M-Phase abgetötet. Die übrigen Zellen in der G_1- und S-Phase durchlaufen den Zellzyklus weiter bis zur G_2-Phase. Hier verharren die Zellen für eine dosisabhängig lange Zeit (sogenannter G_2-Block) und setzen dann den Zellzyklus fort. Während des G_2-Blocks werden DNA-Schäden repariert. Das sich Sammeln der Zellen in der G_2-Phase wird auch Synchronisation genannt. Da die Zellen individuelle Schwankungen in der Dauer ihres jeweiligen Zellzykluses aufweisen, kommt es nach einigen Durchläufen zur Desynchronisation (Steel, 1977; Beck, 1978; Hall, 1994). Dies wird auch als Redistribution bezeichnet. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, bei der nächsten Bestrahlung wieder Zellen in den sensiblen Zellzyklusphasen zu treffen.

1.2.5. Rekruitment

In Tumoren befinden sich auch sogenannte G_0-Zellen, die sich nicht am Zellzyklus beteiligen. Unter einer Bestrahlung können diese Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten. Dieser Wiedereintritt in den Zellzyklus wird Rekruitment genannt. Es wird angenommen, daß das Rekruitment zur Repopulierung beitragen könnte. Dies würde bedeuten, daß es durch das Rekruitment zu einem Dosiswirkungsverlust unter der Bestrahlung kommen könnte. Andererseits sind Zellen im Zellzyklus (G_2- und M-Phase) sensibler in Bezug auf eine Bestrahlung. Damit könnte das Rekruitment zur Steigerung der Dosiswirkung beitragen. Die Bestimmung des Rekruitment ist durch die Untersuchungen von Terry et al. (1993) möglich geworden. Dabei wird die Tumor-DNA mit zwei verschiedenen halogenierten Pyrimidinen markiert.

1.2.6. Regression

Regression bedeutet die Abnahme des Tumorvolumens unter und nach der Bestrahlung. Dies geschieht hauptsächlich durch Abräumung von nekrotischen Zellen durch Makrophagen. Nach einer Bestrahlung kommt es zur Einwanderung von Leukozyten in das Tumorgewebe. Jung et al. (1990) halten es für möglich, daß sogar intakte Tumorzellen von der Resorption betroffen sind. Klinisch und experimentell ist die Regression von Tumoren und Metastasen unter und nach der Therapie prognostisch von Bedeutung (Sobel et al.,1976; Denekamp, 1977;

Dische & Saunders, 1980; Bartelink, 1983; Bernier & Batani, 1986; Maciejewski, 1987; Hong et al., 1992).

1.2.7. Metastasierung

Metastasierung beschreibt die Ausbreitung des tumorösen Geschehens über den lokalen Tumor hinaus an andere Orte des Organismus und somit einen prognostisch ungünstigen Vorgang. So bedeutet Metastasierung auch eine Einschränkung des Therapieeffektes einer rein lokalen Tumorbestrahlung. Die genauen Mechanismen der Metastasierung sind noch nicht gänzlich geklärt. Durch die Ausdehnung des Tumorstagings auf das M-Stadium ist oft eine umfangreichere Therapie, die meistens nur noch palliativ sein kann, notwendig. In diesem Zusammenhang versprechen die Ergebnisse aus Studien mit sehr aggressiven und teils myeloablativen Therapieregimen positive Impulse für eine Heilung von einer Tumorerkrankung.

1.2.8. Radiosensitivität

Radiosensitivität bezeichnet die Empfindlichkeit eines Tumors auf eine Bestrahlung. Sie ist genetisch determiniert. Sie ist z.B. hoch bei Hodgkin-Lymphomen und niedrig bei Nierenzellkarzinomen (Übersicht bei: Herold, 1997). Im experimentellen Sinn gibt die SF_2 (surviving fraction 2 Gy) Auskunft über die Radiosensitivität von Tumorzellen *in vitro* und bedeutet den Anteil (Fraktion) überlebender (surviving) Tumorzellen nach Bestrahlung mit 2 Gy (Baumann et al., 1993; Steel, 1993; Hall, 1994). Für solide experimentelle und klinische Tumoren gibt die TCD_{50} (total control dose in Gy), die Dosis, die benötigt wird, um 50% der Tumoren lokal zu kontrollieren, einen Hinweis auf die Radiosensitivität (Hall, 1994).

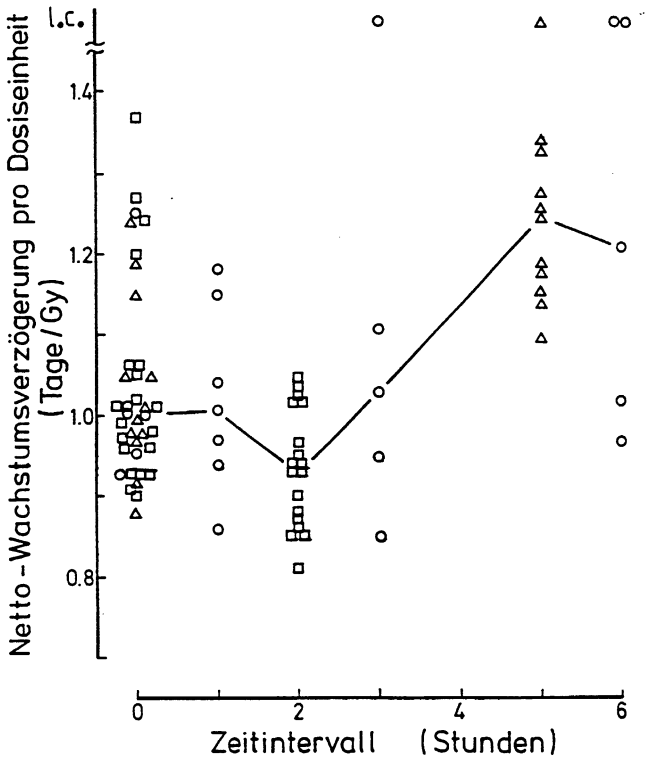
1.3. Klinische Strahlenbiologie

Die dargestellten Faktoren können in einem Tumor *in vivo* nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Dennoch macht sich die Strahlentherapie die Faktoren Reparatur und Repopulierung in verschiedenen Therapieprinzipien zunutze. Die Wahl der Behandlung orientiert sich an der Tumorentität (Art und grading), dem Stadium (staging), dem Allgemeinzustand etc. Die Standardtherapie umfaßt eine Gesamtbehandlungszeit von ca. sechs Wochen mit einer einmaligen Fraktion von 1,8 bis 2 Gy pro Tag und fünf Fraktionen pro

Woche. Bei einer hyperfraktionierten Therapie wird die Anzahl der täglichen Fraktionen erhöht, die Dosis pro Fraktion verringert. Konsekutiv erhöht sich die Gesamtdosis. Die Gesamtbehandlungszeit bleibt gleich. Diese Therapie nutzt den Umstand, daß spät reagierendes Normalgewebe im Vergleich zu Tumoren durch die Reduzierung der Dosis pro Fraktion stärker geschont wird. Bei der Akzelerierung wird die Gesamtbehandlungszeit verkürzt, indem die Anzahl der Fraktionen pro Tag erhöht wird, wobei die Dosis pro Fraktion gleich bleibt. Durch diese Behandlung wird versucht, den negativen Einfluß der Tumorzellrepopulierung auszugleichen. Im Vergleich zur Standardtherapie verstärken sich die akuten Normalgewebsreaktionen, wobei der Umfang der späten Normalgewebsreaktionen gleich bleibt. Die Kombination aus Akzelerierung und Hyperfraktionierung ist die akzelerierte Hyperfraktionierung. Hierbei wird die Gesamtbehandlungszeit zur Vermeidung der Repopulierung verkürzt. Die Dosis pro Fraktion wird vermindert, um die Rate an Nebenwirkungen an spät reagierendem Gewebe gering zu halten. Dies wird erreicht durch eine Erhöhung der Dosis pro Woche, wobei mehrere kleine Dosen pro Tag appliziert werden. Die Hypofraktionierung wird hauptsächlich zur palliativen Therapie eingesetzt. Es werden größere Dosen pro Fraktion appliziert, wobei Gesamtdosis und Gesamtbehandlungszeit verringert sind.

1.4. Konzeption der Experimente

Der Aufbau der Experimente dieser Dissertation leitet sich aus den Ergebnissen (Abb. 1) und dem Ausblick einer anderen Dissertation ab (Kleineidam, 1990). Dort wurde der Einfluß des Zeitintervalls zwischen zwei täglichen Fraktionen einer Strahlenbehandlung auf Tumorparenchym, Tumorstroma und Haut untersucht. Als Untersuchungsmodell fungierte das Rhabdomyosarkom R1H der WAG/Rij-Albinoratte. Der Tumor wurde den Tieren subkutan implantiert und nach dem Aufwachsen bestrahlt. Es wurde in fünf experimentellen Gruppen das Zeitintervall zwischen zwei täglichen Fraktionen zwischen einer, zwei, drei, fünf und sechs Stunden variiert. Die Gesamtdosen lagen zwischen 55 und 82,5 Gy. In der Kontrollgruppe wurde täglich nur einmal bestrahlt, mit einer Gesamtdosis, die ebenfalls zwischen 55 und 82,5 Gy betrug. Die Anzahl der Fraktionen betrug somit im experimentellen Arm 60 und im konventionellen Arm 30. Die Gesamtbehandlungszeit betrug in jeder Gruppe jeweils sechs Wochen. Hieraus resultierten 18 Gruppen im experimentellen Arm und acht Gruppen im konventionellen Arm des Experimentes. Die beobachteten Parameter ergaben für ein Zeitintervall von 1 h zwischen den Fraktionen eine isoeffektive, für 2 h eine verminderte, für 3 h wieder ein isoeffektive und für ein Zeitintervall von 5 und 6 h eine erhöhte Strahlenwirkung im Vergleich zur Standardtherapie. Die



Die Netto-Wachstumsverzögerung pro Dosiseinheit ist gegen die verschiedenen Zeitintervalle zwischen den täglichen Fraktionen aufgetragen. Ein Zeitintervall von 0 Stunden bedeutet eine einzige Fraktion pro Tag, also die Kontrolle.
Die Meßpunkte entstammen den Experimenten A (□), B (△) und C (○). Die am oberen Rand (l.c.) aufgetragenen Meßpunkte bezeichnen lokale Kontrollen, denen eine unendliche Netto-Wachstumsverzögerung zugeordnet wird. Die durchgezogene Linie verbindet die Mediane der normierten Netto-Wachstumsverzögerung pro Dosiseinheit der verschiedenen Zeitintervalle.

Abbildung 1: Orginalabbildung und -text aus dem Ergebnissteil der Dissertation von Kleineidam (1990). Dargestellt sind die Ergebnisse der Nettowachstumsverzögerung (Ordinate) gegenüber dem Zeitintervall in Stunden (Abszisse). Die Daten der Tumoren, die vollständig durch Bestrahlung abgetötet wurden (lokal kontrolliert; LC) sind als unendliche Wachstumsverzögerung dargestellt.

Unterschiede der Ergebnisse zwischen den Behandlungsschemata mit kurzem und langem Zeitintervall zwischen den Fraktionen könnten durch Reparatur, Reoxygenierung und/oder Zellzykluseffekte bedingt sein. Der Faktor Reparatur subletaler Strahlenschäden erscheint als Ursache für die verminderte Strahlenwirkung im Bereich des kurzen Zeitintervalls plausibel, die erhöhte Strahlenwirkung beim langen Zeitintervall wird durch Reparatur nicht erklärt. Durch Reoxygenierung könnte die verstärkte Strahlenwirkung beim langen Zeitintervall ebenfalls beeinflußt sein. Als Nebenaspekt erscheint die Reparatur subletaler Strahlenschäden des Gefäßparenchyms beim langen Zeitintervall, das durch sein Intaktbleiben zur Reoxygenierung indirekt beitragen würde, von Bedeutung. Es erscheint auch möglich, daß die Zellen bei der Applikation der zweiten Fraktion im Behandlungsschema mit dem kurzen Zeitintervall auf Grund ihrer Position im Zellzyklus strahlenresistenter sind, beim langen Zeitintervall könnten die Zellen sich in einer empfindlicheren Zellzyklusphase befinden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Zellzykluseffekten auf das Ergebnis einer fraktionierten Bestrahlung. Um dies zu bewerkstelligen, ist es notwendig den Einfluß aller anderen Faktoren auf das Behandlungsergebnis so weit wie möglich auszuschalten. Dies wird durch den Vergleich zweier Bestrahlungsschemata erreicht, bei denen jeweils zwei Fraktionen am Tag über einen Zeitraum von 6 Wochen appliziert werden. Bei dem ersten Schema wird, nach einem Vorschlag von Kleineidam (1990), mit der ersten Fraktion 2/3 und mit der zweiten Fraktion 1/3 der Tagesdosis appliziert. Beim zweiten Schema erfolgt die tägliche Dosierung umgekehrt, zunächst wird 1/3 und dann 2/3 der Tagesdosis bestrahlt. Es wurde ein Interfraktionsintervall von drei Stunden gewählt, da die Ergebnisse von Kleineidam (1990) darauf hinweisen (Abb. 1), daß sich in diesem Falle die verschiedenen wirkungsverstärkenden und wirkungsabschwächenden Effekte ausgleichen, so daß zu erwarten ist, daß vorhandene Zellzykluseffekte sich bei diesem Zeitintervall besonders stark ausprägen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsaufbau

Als Wirtssystem wurde die seit Jahren am hiesigen Institut verwendete männlichen WAG/Rij-Albinoratte eingesetzt. Die Tiere entstammten der hauseigenen Zucht und weisen infolge von Inzucht eine hochgradige genetische Gleichheit auf. Dies war 1978 von Burek durch Hauttransplantationsversuche nachgewiesen worden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zunächst 60 männliche Tiere für die Versuche mit den experimentellen Bestrahlungsschemata verwendet. Zusätzlich wurde ein Nachfolgeexperiment durchgeführt, in dem 32 Tiere eingesetzt wurden. Den mit einer Kombination aus Xylazin (0,5 mg/100g Körpergewicht i.m.) und Ketaminhydrochlorid (4,4 mg / 100g Körpergewicht i.m.) narkotisierten Tieren wurde der Tumor subkutan in die rechte Flanke implantiert. Der Tumor wurde vorher in 1 mm^3 große Stücke zerkleinert, nachdem er möglichst weitgehend von nekrotischem Material befreit worden war. Die Hautwunde wurde mit einer Klammer geschlossen. Innerhalb von 14 bis 21 Tagen entwickelt der Tumor sein Startdurchmesser von 5 mm (Abb. 2). Alle 92 transplantierten Tumoren wuchsen auf. Die Tiere wurden bei einem Tagesrhythmus von 12 h hell und 12 h dunkel gehalten. Die Ernährung erfolgte mit Pelletts (Firma Altromin, Lage) und Wasser ad libitum.

2.2. Tumorsystem

Als Tumorsystem wurde das Rhabdomyosarkom R1H verwendet. Dieser Tumor ist 1962 in der Kiefermuskulatur einer WAG/Rij-Ratte entstanden, nachdem das Tier 8 Monate zuvor bestrahlt worden war. Aus diesem Tumor wurde die transplantierbare Tumorzellinie BA 1112 isoliert (Reinhold, 1965). Bis 1966 wurde der Tumor alternierend *in vitro* passagiert und *in vivo* transplantiert. Als Ergebnis dieses Selektionsprozesses wurde das Rhabdomyosarkom R1 erhalten (Barendsen & Broerse, 1969). Am hiesigen Institut wurde 1976 der R1-Tumor eingeführt und seit dem seriell transplantiert. In der Zwischenzeit hat sich der DNA-Index spontan von 1,4 (Kal, 1973) auf 4,3 (Beck & Omniczynski, 1980) erhöht. Diese neue Zellinie erhielt den Namen R1H [H = Hamburg] (Jung et al., 1980 und 1981). Der DNA-Index ist mittlerweile wieder auf 3,6 gefallen. Für den verwendeten R1H - Tumor beträgt der Immunogenitätsindex nach Embelton 1 (Embelton, 1987). D.h., der Tumor ist gegenüber seinem Wirtstier nicht spezifisch immunogen. Daher läßt sich ein Einfluß des Immunsystems auf den Tumor weitgehend ausschließen. Während des Wachstums bildet der Tumor eine

Abbildung 2: Fotographie einer Wag/Rij-Albinoratte. An der rechten Flanke und am Rücken sind die Haare durch Rasur entfernt worden. Deutlich ist der subkutan liegende Tumor als Wölbung zu erkennen. Der Tumor hat sein Startvolumen erreicht.

Pseudokapsel. Der Tumor metastasiert von seinem Wachstumsort hauptsächlich in die Lunge. Lymphknotenmetastasen werden selten beobachtet.

2.3. Therapieschema und Bestrahlung

Die Tumoren wurden mit 200 kVp Röntgenstrahlen (0,5 mm Cu-Filter) einer Röntgenröhre der Firma Seifert (Ahrensburg) bei einer Dosisleistung von 1,7 Gy pro Minute bestrahlt (Abb. 3). Während der Bestrahlung befanden sich die Tiere in einer Plexiglasröhre, die von Vogler (1986) entwickelt worden ist, mit einer verschiebbaren Öffnung für den Tumor (Abb. 4 und 5). Trotz des weitgehend eingeschränkten Bewegungsspielraums der Tiere war eine Verschiebung des Tumors in der Horizontalen oder Vertikalen möglich. Daraus resultiert ein Dosisfehler von ± 4%. Die Größe des Bestrahlungsfeldes betrug 3,7 x 5 cm. Die Tumoren wurden so im Strahlengang plaziert, daß die Bestrahlung tangential erfolgte. Um die ungleichmäßige Dosisverteilung durch den Dosisabfall im Gewebe zu kompensieren, wurden die Tiere abwechselnd von der linken oder rechten Seite bestrahlt. Die Dosimetrie erfolgte über eine direkt angelegte Ionisationskammer und eine Monitoreinrichtung. Für die Dauer der Bestrahlung wurde die korrekte Lage der Tumoren mit einer Videoanlage überwacht. Die Behandlung erstreckte sich über 6 Wochen, wobei am Wochenende keine Bestrahlung erfolgte. Die erste Kontrollgruppe erhielt 75 Gy in 30 Fraktionen zu einmalig 2,5 Gy pro Tag, die zweite Kontrollgruppe 90 Gy[1] in 30 Fraktionen zu einmalig 3 Gy pro Tag. In den Versuchsgruppen wurden vier Dosisgruppen gebildet: 67,5 , 75, 82,5 und 90 Gy[1] (Tab. 1). In jeder Dosisgruppe wurde nach zwei verschiedenen Schemata bestrahlt (Abb. 6). Die Gesamtdosen wurden der klinischen Standardtherapie entsprechend an 30 Tagen appliziert. Es wurden zwei Fraktionen pro Tag appliziert. Die täglichen Fraktionen wurden in einen 1/3- und in einen 2/3-Anteil unterteilt. Diese Teilfraktionen wurden in einem konstanten Zeitabstand von 3 Stunden appliziert, wobei entweder zuerst der 1/3-Anteil und nach drei Stunden der 2/3-Anteil gegeben wurde. In einem zweiten parallelen Versuchsarm wurde zuerst der 2/3-Anteil und dann der 1/3-Anteil appliziert. Da die Teilfraktionen in aufsteigender und in absteigender Dosierung gegeben wurden, wurden die Schemata mit "aufsteigend" und "absteigend" benannt. Das aufsteigende Schema ist im folgenden mit einem aufrecht stehenden Dreieck und das absteigende Schema mit einem auf dem Kopf stehenden Dreieck gekennzeichnet. Das Standardschema ist durch ein Quadrat gekennzeichnet (Abb. 6). Bei der Bestrahlung wurde stets die gleiche Reihenfolge der Tiere beibehalten, um die Zeitintervalle zwischen den Fraktionen für jedes Tier

1 Die Dosisgruppe mit 90 Gy wurde nachträglich gebildet und nur auf den Parameter lokale Kontrolle hin untersucht, da es sich am Ende der Hauptexperimente zeigte, daß dieser Parameter der ausagekräftigste war. Daher fehlen im Ergebnisteil dieser Dosisgruppe Daten zur GD, NGD und TBE.

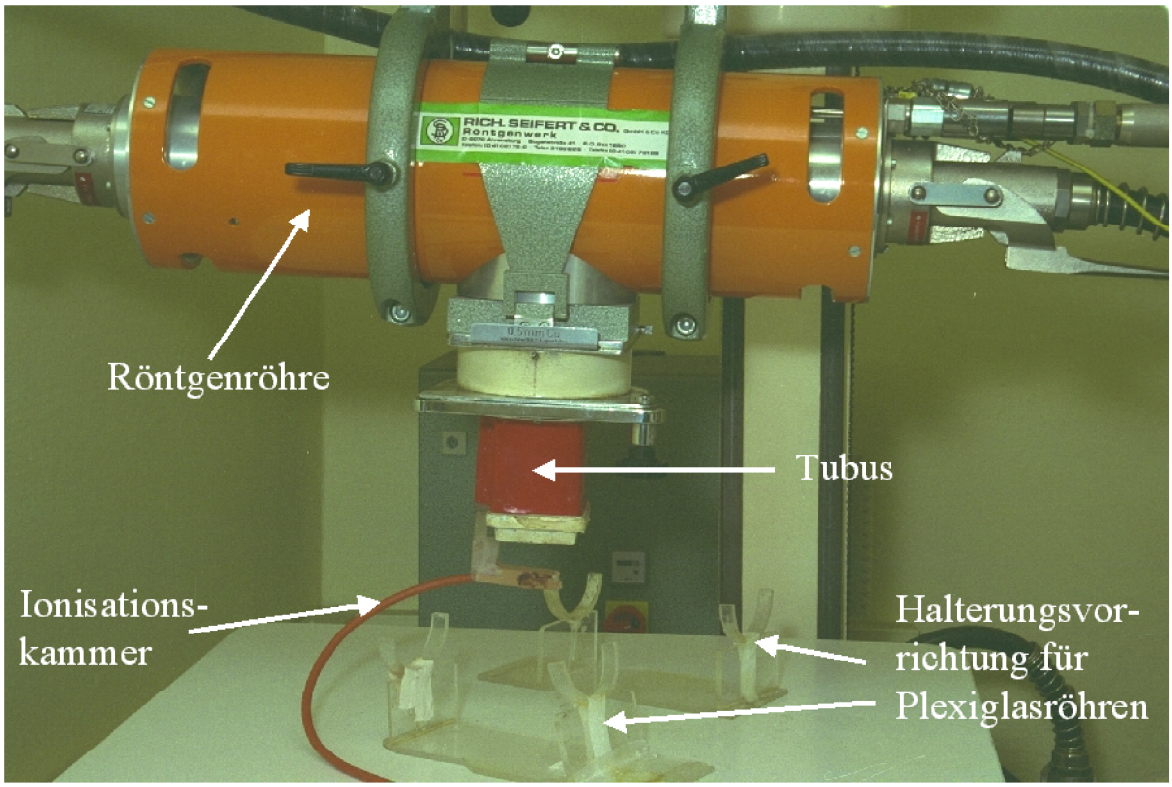


Abbildung 3: Die Tumoren wurden mit 200 kVp Röntgenstrahlen (0,5 mm Cu-Filter) einer Röntgenröhre der Firma Seifert (Ahrensburg) bei einer Dosisleistung von 1,7 Gy pro Minute bestrahlt. Die Abbildung zeigt die verwendete Röntgenröhre mit Tubus, Ionisationskammer und den Haltevorrichtungen für die Plexiglasröhren.

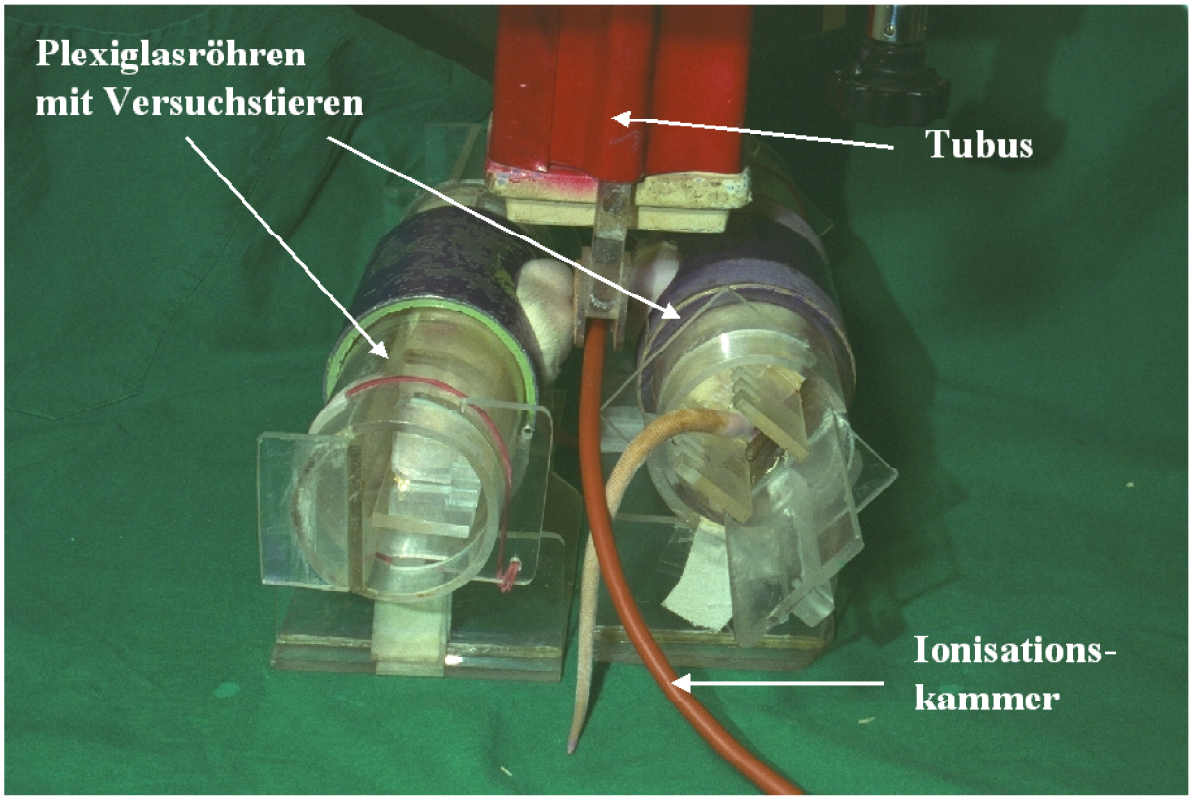


Abbildung 4: Versuchsaufbau. Während der Bestrahlung befanden sich die Tiere in Plexiglasröhren, die von Vogler (1986) entwickelt worden sind, mit einer verschiebbaren Öffnung für den Tumor.

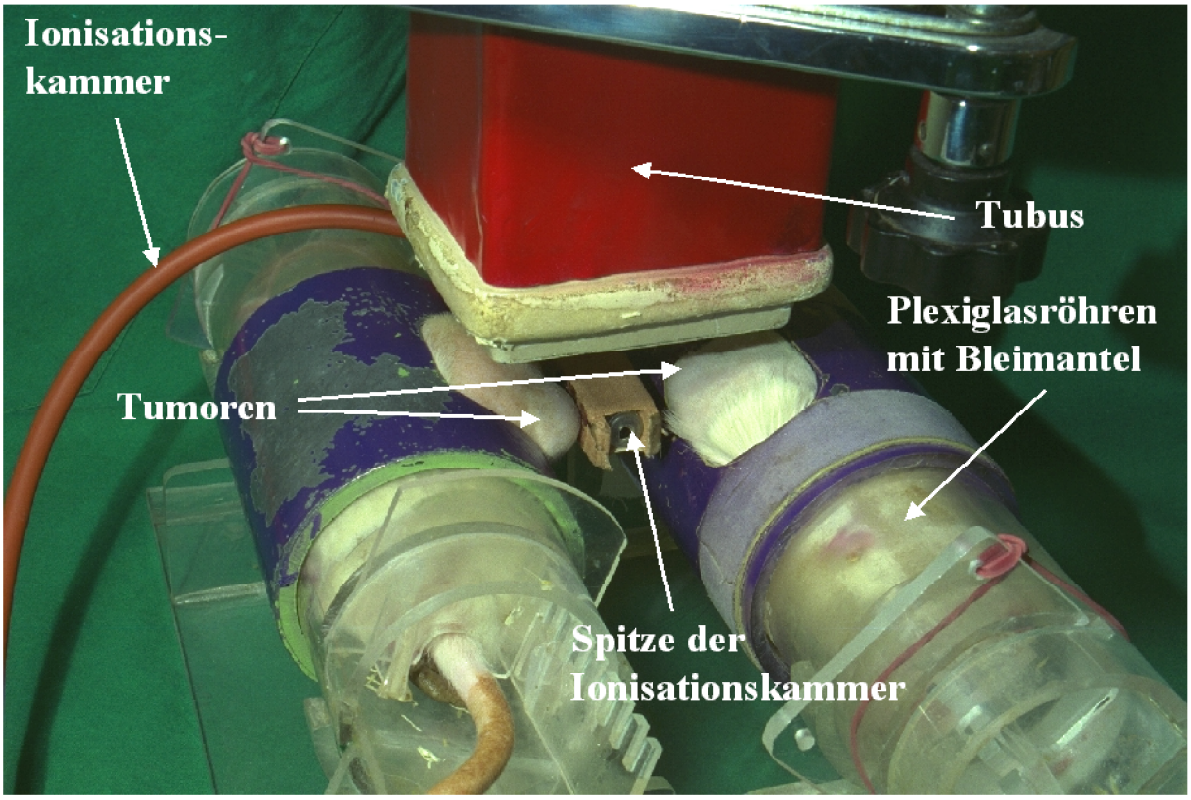


Abbildung 5: Versuchsaufbau aus der Nähe fotographiert.

möglichst konstant zu halten. Bestrahlungsbeginn war jeweils der Montag oder der Mittwoch einer Woche. Bei der Durchführung der Bestrahlung wurde aus zwei Gründen auf eine Anästhesierung der Tiere verzichtet:

A) Die große Anzahl von Fraktionen ließ den Verlust eines Teils der Tiere durch eine jedesmal durchgeführte Anästhesie befürchten. Anästhesierungen sind auch in der Klinik niemals frei von Risiken, und im Tierversuch ergeben sich bei der Narkoseüberwachung und bei der Dosierung noch zusätzliche Probleme.

B) Eine Medikation kann die Strahlensensibilität von Normalgeweben und Tumoren unkontrolliert verändern. Über den Einfluß der Anästhesie auf die Perfusion und die Temperatur eines Tumors liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. So ermittelten Johnson et al. (1976) eine 5 - 20%ige Perfusionsreduktion und einen Temperaturabfall im Tumor (Sarkom S), wohingegen Zanelli et al. (1975) über einen Anstieg der relativen Tumorperfusion um den Faktor 1,3 - 2,0 an verschiedenen Tumorsystemen berichteten. Durch eine Perfusionsänderung wird auch die hypoxische Zellfraktion variiert. Shibamoto et al. (1987) zeigten, daß eine Anästhesie mit Natrium-Pentobarbital den hypoxischen Zellanteil von 5% auf 23% erhöht. Außerdem ist eine Veränderung der Gewebsradiosensitivität durch das Pharmakon oder durch seine Stoffwechselmetaboliten nicht auszuschließen. Kal und Gaiser (1980) wiesen einen solchen strahlensensibilisierenden Effekt auf das Intestinum der Ratte für das Inhalationsnarkotikum Enfluran nach. Eine systematische Untersuchung der Effekte von Anästhetika auf die Tumorperfusion wurde von Menke und Vaupel (1988) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß eine Kontrolle der vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten des Organismus auf ein Pharmakon notwendig wäre, um weitgehend einheitliche Versuchsbedingungen zu erhalten.

2.4. Volumenmessung

Zur Bestimmung des Tumorvolumens wurden mit einer Schublehre zwei senkrecht zueinander stehende Tumorachsen ausgemessen. Die Messung erfolgte immer durch dieselbe Person, um Schwankungen bei der Kontusion des Tumors mit der Schublehre zu vermeiden. Das Tumorvolumen ließ sich nach der Formel für ein Rotationselipsoid berechnen:

$$V = \frac{\pi}{6}(a-2d)*(b-2d)^2$$

wobei a und b die gemessenen Achsen mit a > b und d die Hautdicke darstellen.

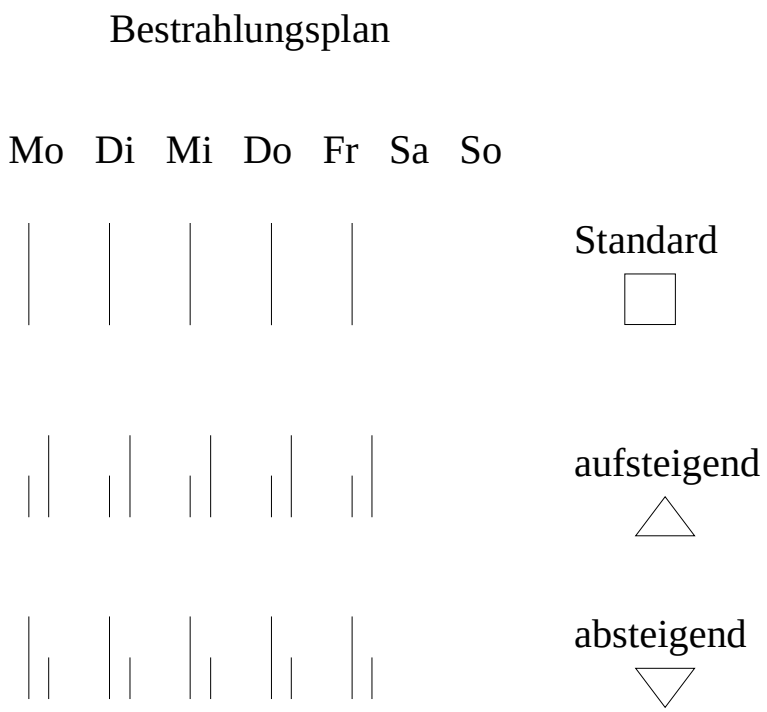


Abbildung 6: Bestrahlungsplan

Schema	Gesamtdosis	Dosis / Fraktion	Anzahl der Fraktionen	Δt (h)	1/3-Fraktion	2/3-Fraktion
Standard	75 Gy	2,5 Gy	30	0	-	-
	90 Gy	3 Gy	30	0	-	-
aufsteigend	62,5 Gy	2,25 Gy	60	3	0,7425	1,5075
&	75 Gy	2,5 Gy	60	3	0,825	1,675
absteigend	82,5Gy	2,75 Gy	60	3	0,975	1,8425
	90 Gy	3 Gy	60	3	1,0	2,0

Tabelle 1: Bestrahlungsschemata. Die Werte der 1/3- und 2/3-Fraktionen sind rein rechnerische Werte, die bei der Durchführung der Bestrahlung aus Praktikabilitätsgründen bis auf zwei Stellen hinter dem Komma gerundet wurden.

Die Dicke der Haut beträgt bei männlichen Ratten je nach Alter und Ernährungszustand zwischen 1,3 und 1,7 mm. Als Näherung wurde für alle Tiere ein Wert von 1,5 mm angenommen. Die untere Grenze der Meßbarkeit war bei Tumoren mit einem Achsendurchmesser von 5 mm erreicht. Kleinere Tumoren waren noch tastbar, konnten jedoch nicht vermessen werden. Die Tumoren wurden dann palpatorisch vermessen. Für einen gut tastbaren Tumor wurde ein Achsendurchmesser von 2 mm und für einen noch gerade eben tastbaren Tumor ein Achsendurchmesser von 1 mm festgelegt. Die Messung erfolgte zweimal pro Woche. Die Tumoren wurden zur Randomisierung ebenfalls zweimal pro Woche vermessen. Dabei wurden Tumoren mit einer äußeren Abmessung von $\geq$ 8 x 8 mm in den Versuch einbezogen.

2.5. Nachbeobachtung

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von mindestens 6 Monate nach Abschluß der Bestrahlung zwei Mal wöchentlich nachbeobachtet, da in anderen Experimenten beobachtet wurde, daß noch weit nach Bestrahlungsende Tumorrezidive auftreten können.

2.6. Wachstums-, Nettowachstumsverzögerung und Tumorbetteffekt

Zur Quantifizierung der Wirkung einer fraktionierten Bestrahlung auf das Tumorwachstum dienten u.a. die Wachstums- (engl. = growth delay; GD), die Nettowachstumsverzögerung (engl. = net growth delay; NGD) und der Tumorbetteffekt (engl. = tumor bed effect; TBE) als Endpunkte. In dieser Arbeit ist die GD definiert als zeitliche Differenz zwischen dem Zeitpunkt, an dem der bestrahlte Tumor das Zehnfache seines Startvolumens (10 V_0) erreicht, und dem Zeitpunkt, an dem er dieses Volumen als unbestrahlter Tumor erreichen würde. Die NGD ist definiert als das Zeitintervall zwischen dem Zeitpunkt, an dem der bestrahlte Tumor das Doppelte seines kleinsten Volumens (2 V_{min}) nach Behandlung erreicht, und dem Zeitpunkt, an dem der unbehandelte Tumor vor Beginn der Behandlung das gleiche Volumen besitzt (Beck-Bornholdt et al., 1987). Die Wachstumskurve eines Rezidives zeichnet sich im typischen Fall dadurch aus, daß der wiederaufwachsende Tumor, nachdem er annähernd sein ursprüngliches Volumen wieder erreicht hat, deutlich langsamer an Volumen zunimmt. Dieses Phänomen wird als Tumorbetteffekt bezeichnet und ist darauf zurückzuführen, daß bei der Bestrahlung neben dem Tumor auch das den Tumor umgebende Normalgewebe geschädigt wurde. Durch die Berechnung der NGD wird der Einfluß des TBE auf das Ergebnis minimiert. Zum Vergleich dienten die

Wachstumsdaten unbehandelter Kontrolltumoren. Die Berechnung des Tumorbetteffektes TBE wurde durch die Subtraktion der NGD von der GD durchgeführt. Abbildung 7 verdeutlicht die gemessenen Parameter in graphischer Form.

2.7. Lokale Tumorkontrolle

Die Tumoren wurden als lokal kontrolliert betrachtet, wenn innerhalb eines Zeitraumes von einem halben Jahr nach Ende der Strahlenbehandlung kein Tumorrezidiv beobachtet werden konnte. Tiere, bei denen eine dauerhafte Tumorregression eintrat, wurden nach Ende der Behandlung noch solange weiter beobachtet, bis ihr altersbedingter, natürlicher Tod eintrat.

2.8. Lokale Tumorkontrolldosis $TCD_{37\%}$

Die Auswertung der Ergebnisse der lokalen Tumorkontrolle erfolgte durch die Berechnung der sogenannten $TCD_{37\%}$ (engl.: tumor control dose). Die $TCD_{37\%}$ beschreibt diejenige Dosis, die benötigt wird, um 37% der Tumoren lokal zu kontrollieren. Sie läßt sich aus den lokalen Tumorkontrollraten der einzelnen Dosisgruppen unter Berücksichtigung der Gesamtdosis und des Tumorvolumens zu Beginn der Bestrahlung berechnen. Die Auswertung basiert auf folgender Überlegung: Unter der Voraussetzung, daß eine einzige überlebende Tumorzelle ausreicht, um ein Tumorrezidiv zu verursachen (Hewitt, 1958; Steel & Adams, 1975) und unter der Annahme einer Poissonverteilung der Anzahl der überlebenden Zellen nach Bestrahlung, ergibt sich die Wahrscheinlichkeit (p), den Tumor lokal zu kontrollieren, zu:

(I.) $$p = \exp(-N)$$

oder:

(II.) $$N = -\ln(p)$$

wobei N die durchschnittliche Anzahl der überlebenden Tumorzellen pro Tier am Ende der Behandlung darstellt. Ist N = 1, so ist $p = e^{-1} = 0{,}37$, entsprechend einer lokalen Tumorkontrollrate von 37%. Bei der $TCD_{37\%}$ verbleibt also am Ende der Behandlung im Durchschnitt eine überlebende Tumorzelle pro Tier. Unter der Vorraussetzung, daß alle Fraktionen bei einer fraktionierten Bestrahlung

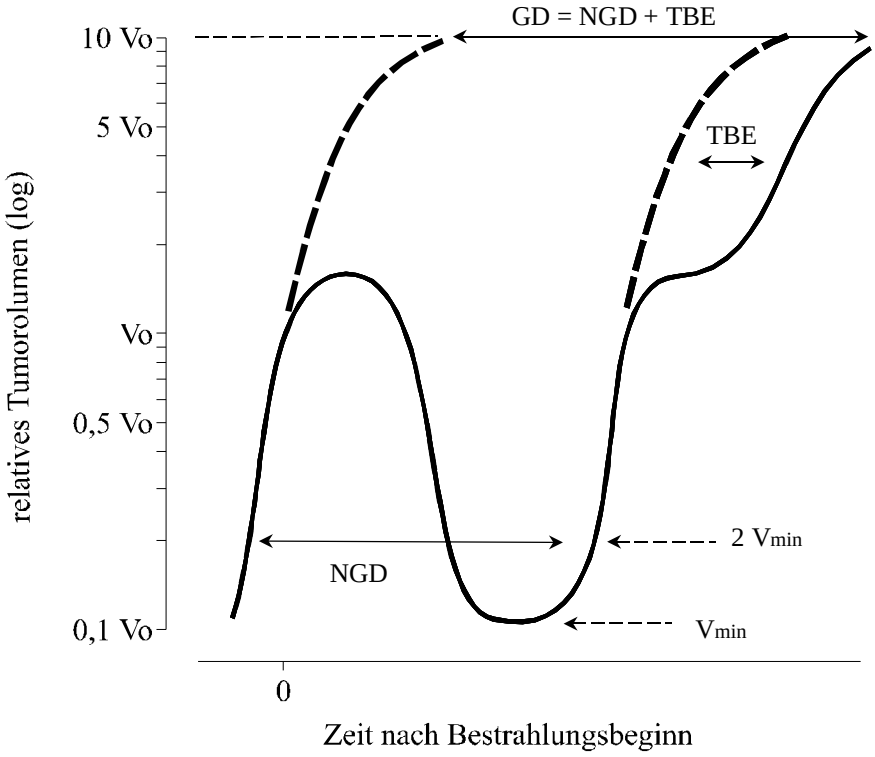


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Grundlagen für die Berechnung der Nettowachstumsverzögerung NGD, der Wachstumsverzögerung GD und des Tumorbetteffektes TBE.

— = Wachstumskurve des bestrahlen Tumors

--- = Wachstumskurve des unbestrahlten Tumors

isoeffektiv sind, ergibt sich die allgemeine Formel für die Inaktivierung von Tumorzellen als Funktion der Dosis:

(III.) $$N = N_0 \exp\left(\frac{-D}{D_0}\right)$$

wobei N_0 die Zellzahl zu Beginn der Behandlung angibt, D der applizierten Gesamtdosis entspricht und D_0 die Dosis angibt, die benötigt wird, um die Anzahl der klonogenen Zellen auf e^{-1} (= 37%) ihres Ausgangswertes im exponentiellen Abschnitt der Zellüberlebenskurve zu reduzieren. Setzt man in die Gleichung für die Dosis D die $TCD_{37\%}$ ein, so gilt definitionsgemäß, daß N = 1 ist. Bezieht man die $TCD_{37\%}$ auf Tumoren mit einem Startgewicht von 1 g, so ist die Zellzahl beim R1H-Tumor zu Beginn der Behandlung $N_0 = 2{,}3 \times 10^8$ Zellen (Jung et al., 1990). Es folgt somit:

(IV.) $$1 = 2{,}3 \, x \, 10^8 \exp\left(\frac{-TCD_{37}}{D_0}\right)$$

oder:

(V.) $$TCD_{37} = D_0 \, x \ln(2{,}3 \, x \, 10^8)$$

Auflösung der Gleichung III. nach D_0 und Einsetzen in V. ergibt:

(VI.) $$TCD_{37} = D \, x \left[\frac{\ln(2{,}3 \, x \, 10^8)}{\ln\left(\frac{N_0}{N}\right)}\right]$$

Ist V_0 das Startvolumen des Tumors, so ist:

(VII.) $$N_0 = 2{,}3\,x\,10^8\,x\,V_0$$

da 1g Tumor ein Volumen von ca. 1 cm^3 besitzt. Nach Einsetzen von II. und VII. in VI. ergibt sich:

(VIII.) $$TCD_{37} = D\,x\left[\frac{\ln(2{,}3\,x\,10^8)}{\ln\left(\frac{2{,}3\,x\,10^8\,x\,V_0}{-\ln(p)}\right)}\right]$$

Mit dieser Gleichung kann die $TCD_{37\%}$ aus dem Startvolumen V_0, der Gesamtdosis D und der lokalen Tumorkontrolle p, errechnet werden. Für die Berechnung der $TCD_{37\%}$ wurde die Maximum-Likelihood-Methode eingesetzt. Dieses als Methode der maximalen Mutmaßlichkeit bezeichnete Verfahren wird zur Gewinnung brauchbarer Schätzfunktionen für Parameter einer Verteilung eingesetzt (Kreysig, 1972). Grundlage dieses Verfahrens ist folgende Überlegung: Versucht man einen bestimmten Datensatz mit einem Modell zu beschreiben, welches eine bestimmte Anzahl von Parametern enthält, so werden einige Kombinationen dieser Parameter die Stichproben sehr schlecht beschreiben, nämlich dann, wenn die sich ergebende Funktion offensichtlich wenig oder gar nichts mit den Daten zu tun hat. Andere Kombinationen von Parametern können die Daten recht gut beschreiben. Die Quantifizierung dieser willkürlichen Einschätzung der Güte einer Approximation geschieht durch Umkehr der Fragestellung: "Gegeben sei eine bestimmte Kombination von Parametern. Wie groß ist die Wahrscheinlichkeit, genau die gemessenen Daten zu beobachten ?". Die Wahrscheinlichkeit, die gemessenen Daten zu beobachten, wird so mit der Wahrscheinlichkeit der Parameter bei gegebenen Daten identifiziert. Bei der Maximum-Likelihood-Methode werden nun die Parameter dahingehend optimiert, daß eben diese Wahrscheinlichkeit maximal wird (Press et al., 1986). Anhand der berechneten Werte ist darüber hinaus die Bestimmung des 95%-Vertrauensbereiches möglich. Die Auswertung erfolgte mit einem Computerprogramm von Herrn Prof. Dr. Beck-Bornholdt.

3. Ergebnisse

3.1. Lokale Heilungsraten

In der Abbildung 8 ist die lokale Tumorkontrollrate in Prozent auf der Ordinate gegen die Gesamtdosis in Gray auf der Abszisse aufgetragen. Das Standardschema zeigt bei Gesamtdosen von 75 und 90 Gy eine deutliche Dosiseffektbeziehung. Je höher die Gesamtdosis, desto mehr lokale Heilungen (local control = LC) treten auf. Das absteigende Schema zeigt im Dosisbereich von 67,5 bis 90 Gy ebenfalls eine Dosiseffektbeziehung, die gegenüber dem Standardschemas etwas nach rechts verschoben ist. Dasselbe gilt für das aufsteigende Schema. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant und liegen im Rahmen des Vertrauensbereichs bzw. des statistischen Meßfehlers.

3.2. TCD 37%

In der Abbildung 9 ist die $TCD_{37\%}$ für die drei Behandlungsschemata aufgetragen. Bei der Standardbehandlung werden 78 Gy (95%-VB: 64...87) benötigt, um 37% der Tumoren lokal zu kontrollieren. Demgegenüber sind hierfür beim absteigenden Schema 85 Gy (77...97) und beim aufsteigenden Schema 92 Gy (82...115) erforderlich. Die Standardbehandlung weist somit die niedrigste $TCD_{37\%}$ auf. Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant.

3.3. Wachstumskurven der Tumoren

In den Abbildungen 10 bis 12 sind die relativen Tumorvolumina bei den Gesamtdosen 67,5 bis 82,5 Gy auf der Ordinate gegen die Zeit ab Bestrahlungsbeginn in Tagen auf der Abszisse aufgetragen. Dargestellt ist jeweils derjenige Tumor, der die mediane Wachstumsverzögerung aufweist. Nach der Implantation erfolgt ein steiler Anstieg des Tumorvolumens. In einem Zeitraum von ungefähr zwei Wochen nach dem Beginn der Bestrahlung geht der Volumenzuwachs pro Zeit zurück und beginnt nach einigen Tagen abzufallen. Unter der Bestrahlung nimmt das Tumorvolumen weiter ab und erreicht erst nach Ende der Bestrahlung sein Minimum. Das minimale Tumorvolumen wird in den einzelnen Dosisgruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beginn der Bestrahlung erreicht. Die Tumoren der experimentellen Dosisgruppe (auf- und absteigendes Schema) mit 67,5 Gy erreichen etwa 7 Tage nach Ende der

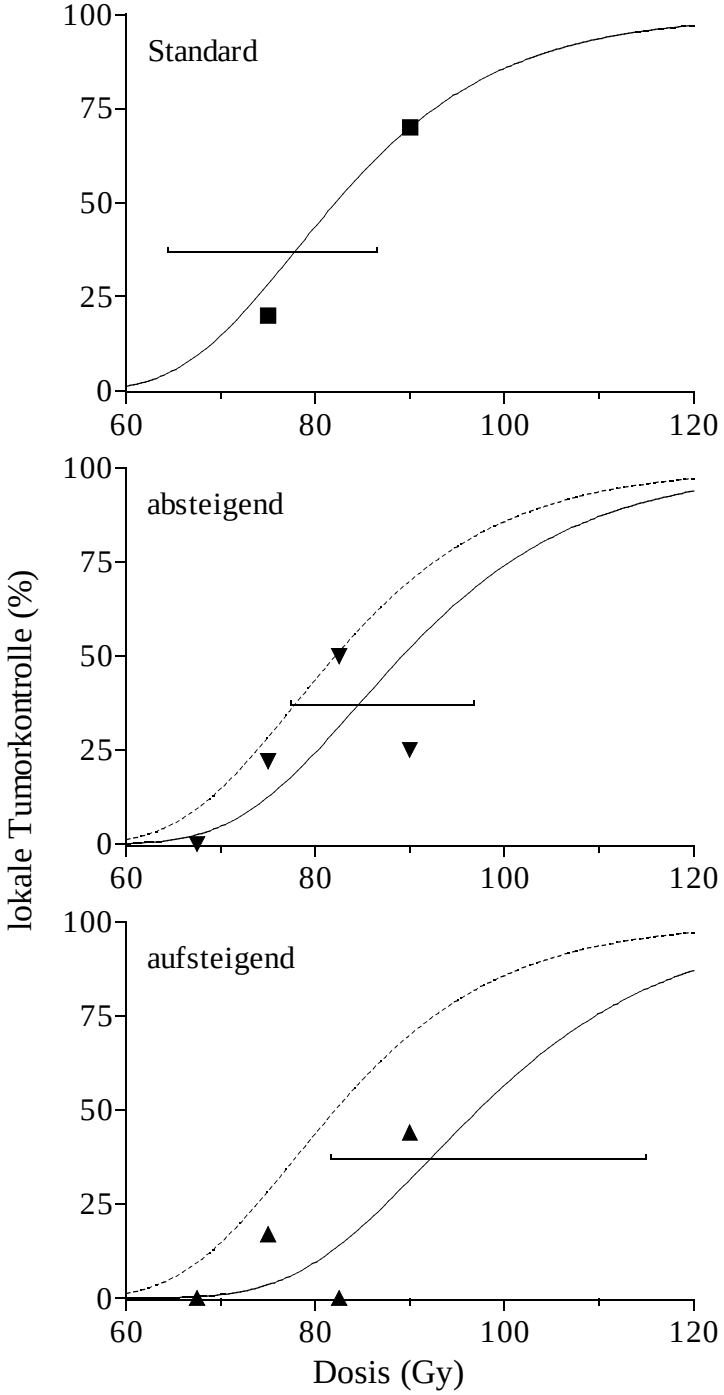


Abbildung 8: Aufgetragen ist die lokale Tumorkontrollrate in Prozent auf der Ordinate gegen die Gesamtdosis in Gray auf der Abzisse. Dargestellt ist jeweils die nichtlineare Regression (—) und der 95%-Vertrauensbereich. In den beiden unteren Abbildungen ist die Kurve des Standardschemas aus der ersten Abbildung zum Vergleich wiedergegeben (---).

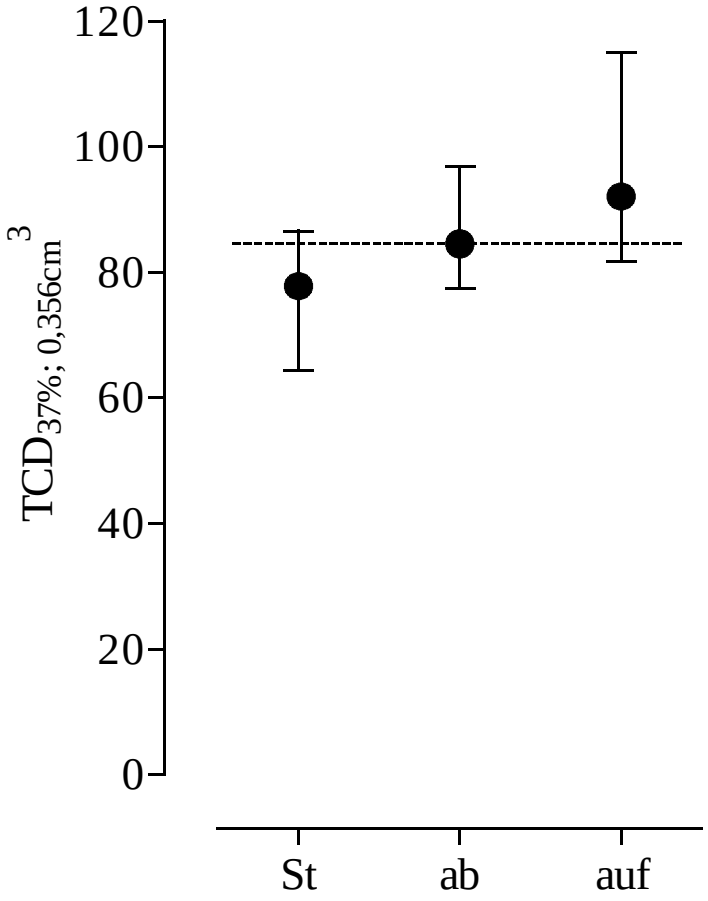


Abbildung 9: Aufgetragen ist die $TCD_{37\%}$ für die zwei experimentellen Behandlungsschemata und das Standardbehandlungsschema. Dargestellt ist der Medianwert und der 95%-Vertrauensbereich sowie die lineare Regression (---). Die Berechnung der $TCD_{37\%}$ und der Approximation erfolgte für das durchschnittliches Startvolumen von 0,356 cm^3.

Bestrahlung ihr niedrigstes Volumen und wachsen danach schnell wieder auf (Abb. 10). Nach Bestrahlung mit 75 Gy setzt das Rezidivwachstum innerhalb von 10 und 14 Tagen nach Bestrahlungsende ein (Abb. 11). Nach 82,5 Gy dauert es zwischen 24 und 35 Tagen, bis die Tumoren wieder aufwachsen (Abb. 12). Das Wachstumsverhalten der Tumoren ist somit von der Dosis abhängig. Die Gruppen mit einer Gesamtdosis von 67,5 Gy zeigen ein früheres Rezidivwachstum, als das Standardschema mit 75 Gy und das Schema mit 82,5 Gy. Die experimentellen und das Standardschema mit je 75 Gy sind isoeffektiv. Die medianen Volumenkurven bei den einzelnen Dosisgruppen erreichten ihr größtes Volumen nach Bestrahlungsbeginn ungefähr mit dem gleichen Zeitabstand: 67,5 Gy und 75 Gy = 11 Tage, 82,5 Gy = 9 Tage. Die kleinsten Volumina (V_{min}) nach Bestrahlungsbeginn wurden in den einzelnen Dosisgruppen ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht: 67,5 Gy = 46 Tage, 75 Gy = 51 Tage und 82,5 Gy = 60 Tage. Das kleinste erreichte Volumen nimmt außerdem von 67,5 Gy über 75 Gy bis 82,5 Gy ab.

3.4. Wachstums- , Nettowachstumsverzögerung und Tumorbetteffekt

In der Abbildung 13 ist die Wachstumsverzögerung (GD) in Tagen auf der Ordinate gegen die Gesamtdosis in Gray auf der Abszisse aufgetragen. Die Wachstumsverzögerung der einzelnen Schemata zeigt eine Dosis - Effekt - Beziehung. Je höher die Gesamtdosis, desto größer die GD der Tumoren. Die mediane GD der Dosisgruppe mit 67,5 Gy - aufsteigendes Schema beträgt 91 Tage (95%-Vertrauensbereich: 81...94), bei dem absteigendem Schema 88 Tage (76...96). In der Dosisgruppe mit 75 Gy - aufsteigendes Schema beträgt die mediane GD 120 Tage (94%-VB: 115...133; n=5), im absteigenden Schema 113 Tage (99...121) und im Standardschema 114 Tage (94%-VB: 109...133; n = 5). In der Dosisgruppe mit 82,5 Gy - aufsteigendes Schema beträgt die mediane GD 165 Tage (115...199). Im absteigende Schema mit 82,5 Gy beträgt die mediane GD 129 Tage (88%-VB: 123...146; n=4).

In der Abbildung 14 ist die Nettowachstumsverzögerung in Tagen auf der Ordinate gegen die Dosis in Gray auf der Abszisse aufgetragen. Bei der NGD der einzelnen Schemata zeigt sich eine Dosis - Effekt - Beziehung. Je höher die Gesamtdosis, desto größer die NGD und desto mehr lokale Kontrollen der Tumoren. Die mediane NGD der Dosisgruppe mit 67,5 Gy - aufsteigendes Schema beträgt 61 Tage (95%-VB: 55...64), beim absteigenden Schema 59 Tage (57...64). In der Dosisgruppe mit 75 Gy - aufsteigendes Schema beträgt die mediane NGD 65 Tage (94%-VB: 64...97; n=5), im absteigenden Schema 72 Tage (66...81) und im Standardschema 68,5 Tage (88%-VB: 65...77; n = 4). In

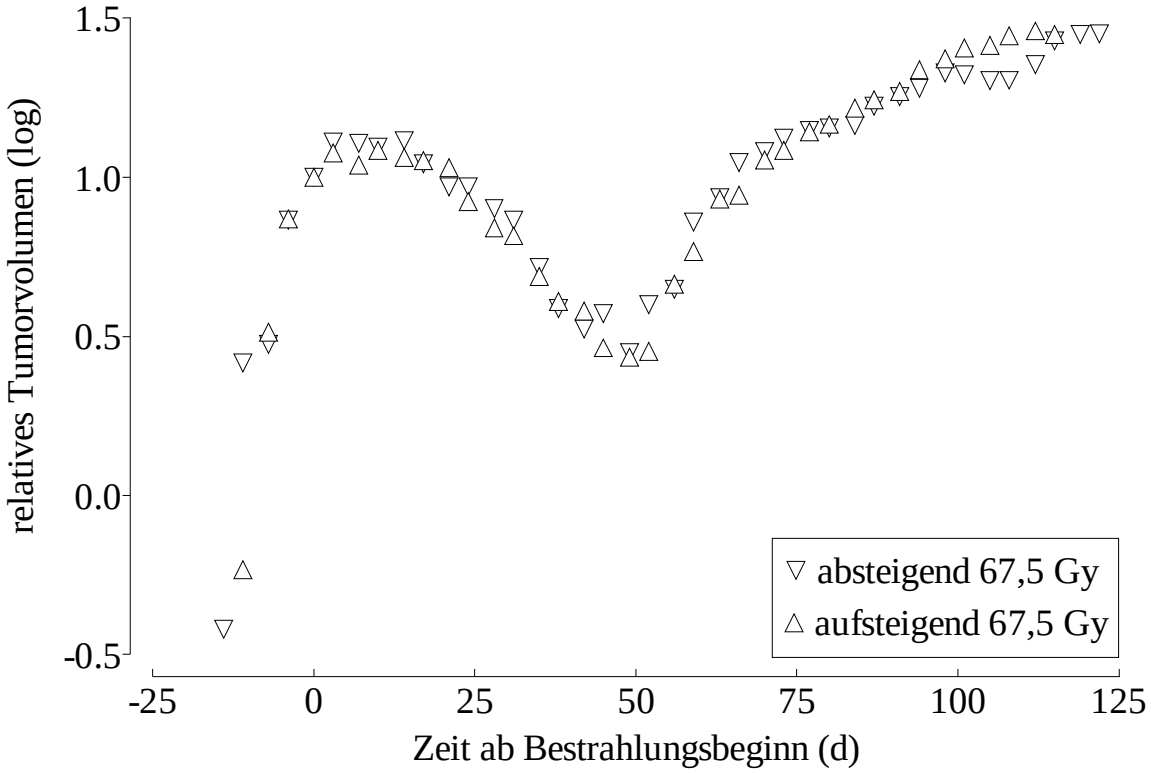


Abbildung 10: Mediane Wachstumskurven der Tumoren aus der experimentellen Dosisgruppe mit 67,5 Gy Gesamtdosis (auf- und absteigendes Schema). Auf der Ordinate ist logarithmisch das relative Tumorvolumen, auf der Abszisse die Zeit vor und nach Bestrahlungsbeginn aufgetragen.

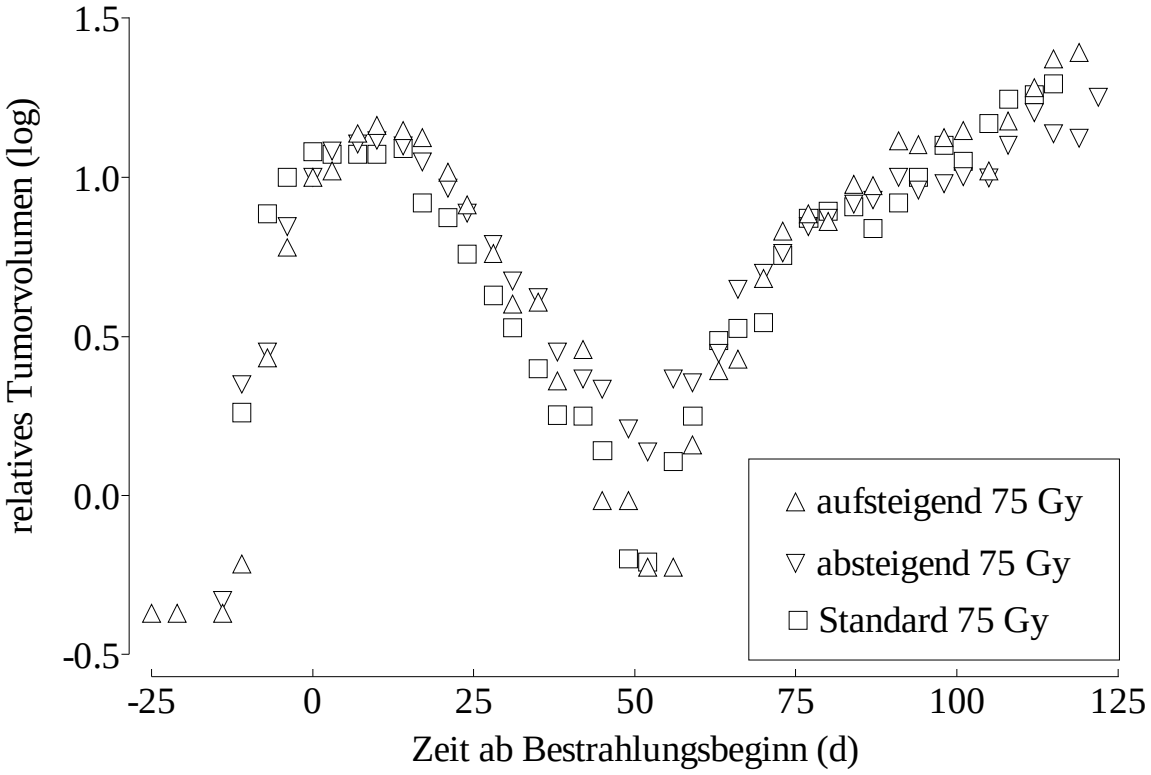


Abbildung 11: Mediane Wachstumskurven der Tumoren aus der experimentellen Dosisgruppe (auf- und absteigendes Schema) sowie des Standardschemas mit jeweils 75 Gy Gesamtdosis. Auf der Ordinate ist logarithmisch das relative Tumorvolumen, auf der Abszisse die Zeit vor und nach Bestrahlungsbeginn aufgetragen.

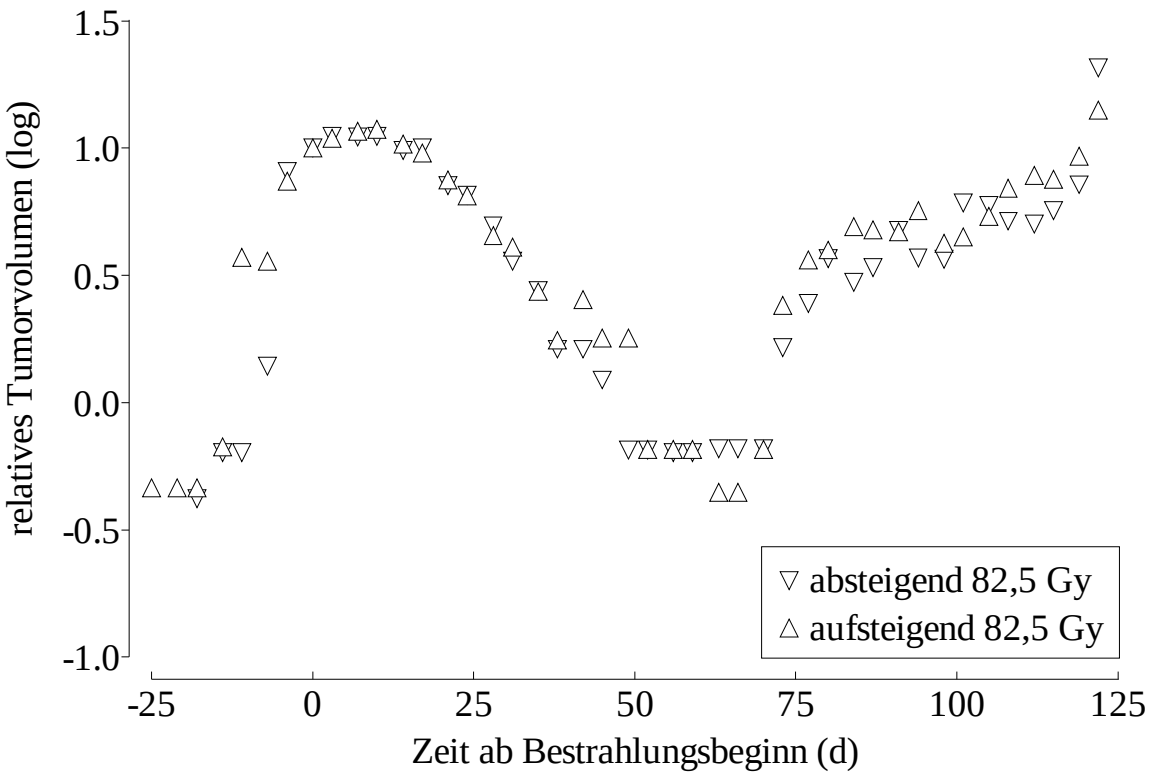


Abbildung 12: Mediane Wachstumskurven der Tumoren aus der experimentellen Dosisgruppe mit 82,5 Gy Gesamtdosis (auf- und absteigendes Schema). Auf der Ordinate ist logarithmisch das relative Tumorvolumen, auf der Abszisse die Zeit vor und nach Bestrahlungsbeginn aufgetragen.

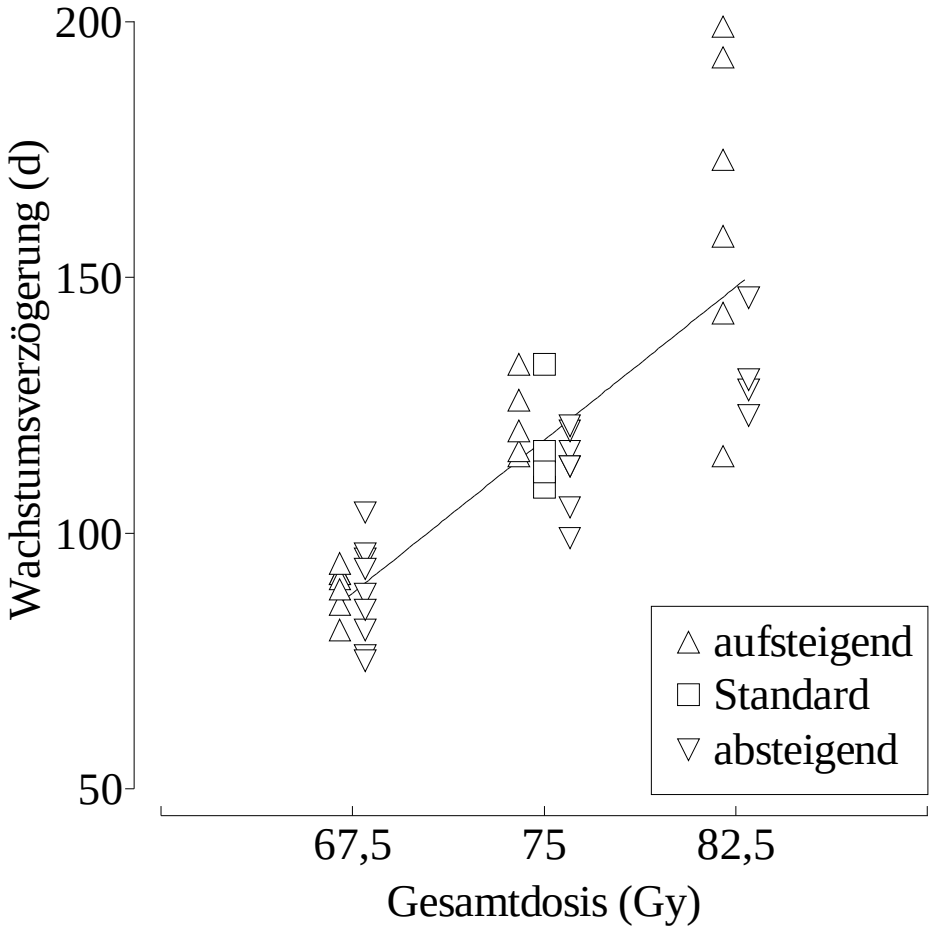


Abbildung 13: Vergleich der Wachstumsverzögerungen der einzelnen Schemata in Bezug auf die Gesamtdosis. Die Wachstumsverzögerung (GD) in Tagen auf der Ordinate ist gegen die Gesamtdosis in Gray auf der Abszisse aufgetragen.

der Dosisgruppe mit 82,5 Gy - aufsteigendes Schema beträgt die mediane NGD 91,5 Tage (72...128), für das absteigende Schema mit 82,5 Gy 80 Tage (88%-VB:68...88; n = 4).

In der Abbildung 15 ist der Tumorbetteffekt in Tagen auf der Ordinate gegen die Dosis in Gray auf der Abszisse aufgetragen. Bei dem TBE der einzelnen Schemata zeigt sich wiederum eine Dosis - Effekt - Beziehung. Je höher die Gesamtdosis, desto größer der TBE. Der mediane TBE der Dosisgruppe mit 67,5 Gy - aufsteigendes Schema beträgt 30 Tage (17...34), beim absteigenden Schema 29 Tage (20...32). In der Dosisgruppe mit 75 Gy - aufsteigendes Schema beträgt der mediane TBE 52 Tage (94%-VB: 36...56; n=5), im absteigenden Schema 39 Tage (27...48) und im Standardschema 47 Tage (88%-VB: 41...56; n = 4). In der Dosisgruppe mit 82,5 Gy - aufsteigendes Schema beträgt der mediane TBE 68 Tage (40...95). Im absteigende Schema mit 82,5 Gy beträgt der mediane TBE 55 Tage (88%-VB: 40...61; n = 4).

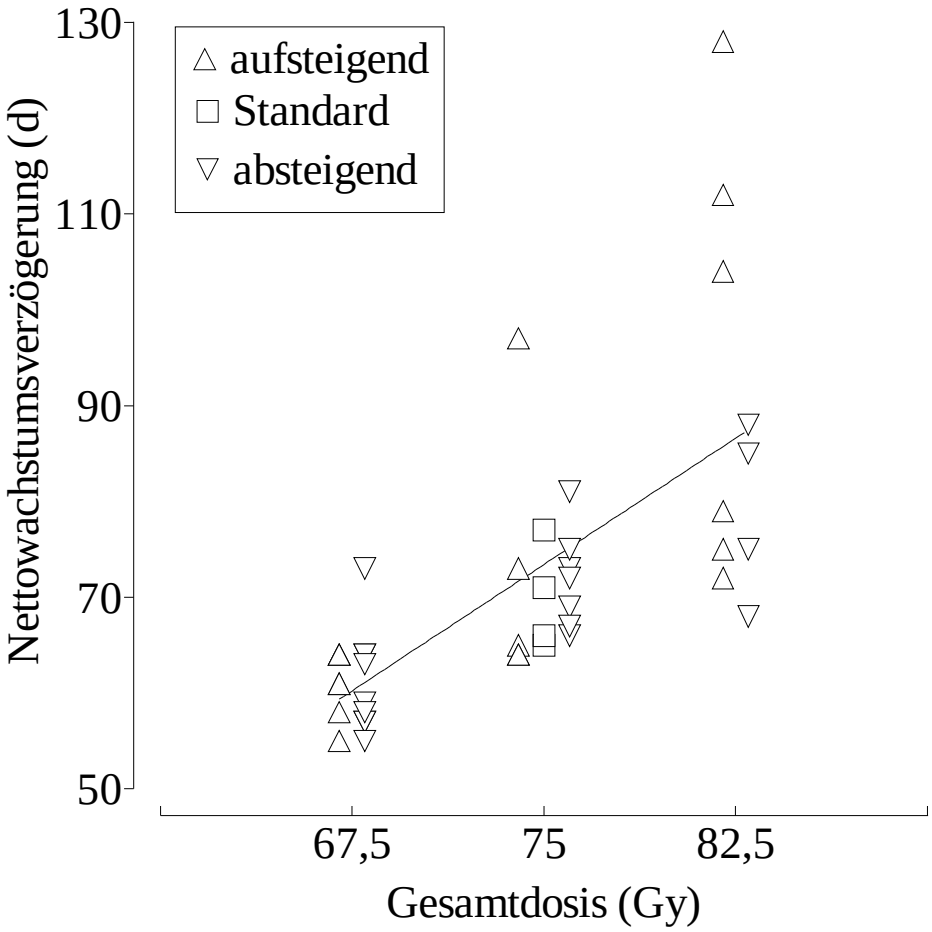


Abbildung 14: Vergleich der Nettowachstumsverzögerungen der einzelnen Schemata in Bezug auf die Gesamtdosis. Die Nettowachstumsverzögerung (NGD) in Tagen auf der Ordinate ist gegen die Gesamtdosis in Gy auf der Abszisse aufgetragen.

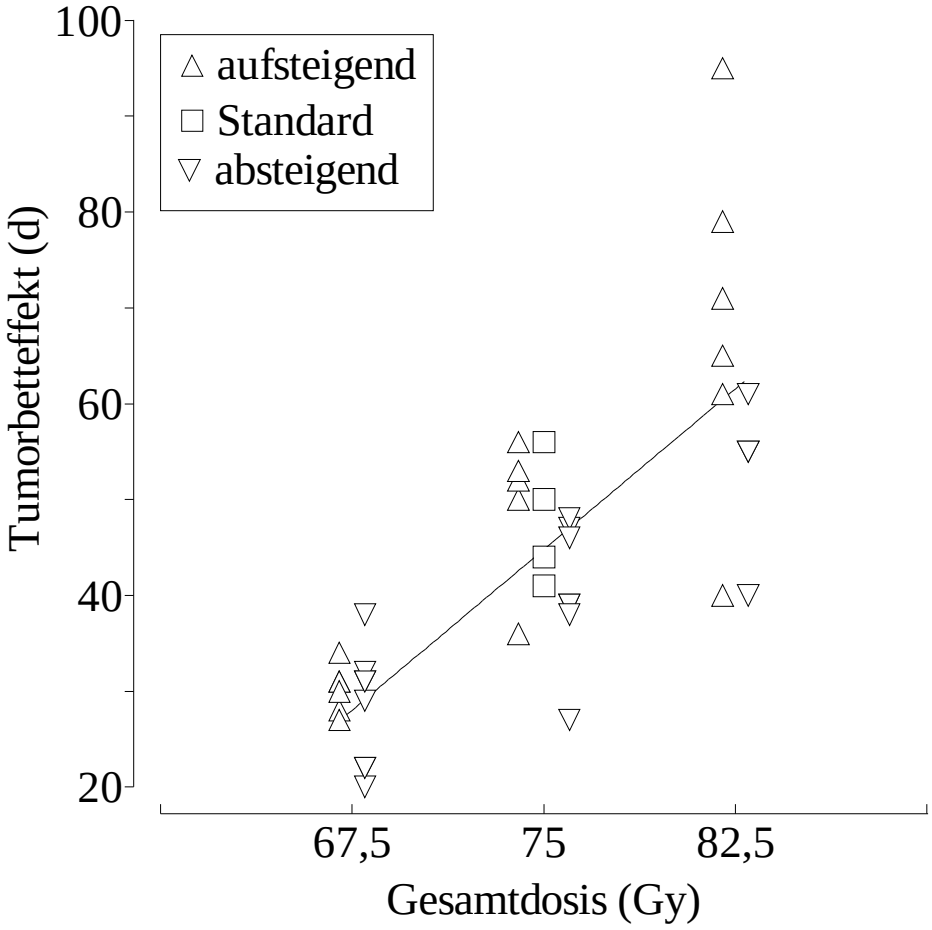


Abbildung 15: Vergleich des Tumorbetteffektes der einzelnen Schemata in Bezug auf die Gesamtdosis. Der Tumorbetteffekt (TBE) in Tagen auf der Ordinate ist gegen die Gesamtdosis in Gray auf der Abszisse aufgetragen.

4. Diskussion von Material und Methoden

4.1. Streuung der Startvolumina

Idealerweise wird ein Tumor dann in den Versuch genommen, wenn seine beiden äußeren Achsen jeweils 8 mm betragen. Diesen Achsendurchmesser haben die Tumoren nicht immer dann, wenn sie auch in den Versuch genommen werden sollen. Beispielsweise kann ein Tumor diese Achsendurchmesser am Freitag erreichen. Versuchsbeginn ist aber jeweils Montag und Mittwochs. Daher muß bis Montag abgewartet werden. Dann aber ist der Tumor schon wieder vier Tage gewachsen. Aus diesem Grund streuen die Startvolumina der einzelnen Schemata um einen Median. Da jede Änderung der kleinen Achse mit dem Quadrat in das Volumen eingeht, streuen die Startvolumina stark. Abbildung 16 zeigt die Streuung der Startvolumina.

4.2. Abhängigkeit der Wachstums-, Nettowachstumsverzögerung und des Tumorbetteffektes vom Startvolumen

Es liegt die Vermutung nahe, daß große Tumoren strahlenresistenter sind als kleine, da ein größerer Tumor einen höheren Anteil an hypoxischen Zellen besitzen könnte. Für ein undifferenziertes Adenokarzinom auf WAG/Rij-Ratten wurde gezeigt, daß die Wachstumsverzögerung von der Größe des Tumors abhängen kann (Kal & van Berkel, 1988). Zur Klärung der Frage, ob möglicherweise die Größe des Tumors einen Einfluß auf das Therapieergebnis hat, wurde in den Abbildungen 17 bis 19 das Startvolumen V_0 in cm^3 auf der Abszisse gegen die GD, die NGD und den TBE in Tagen auf der Ordinate aufgetragen. Die lineare Regression weicht kaum von Null ab, woraus ersichtlich ist, daß die GD, die NGD und der TBE nicht vom Startvolumen abhängig sind. Damit sind die Reaktionen von kleineren und größeren Tumoren auf die Bestrahlung vergleichbar.

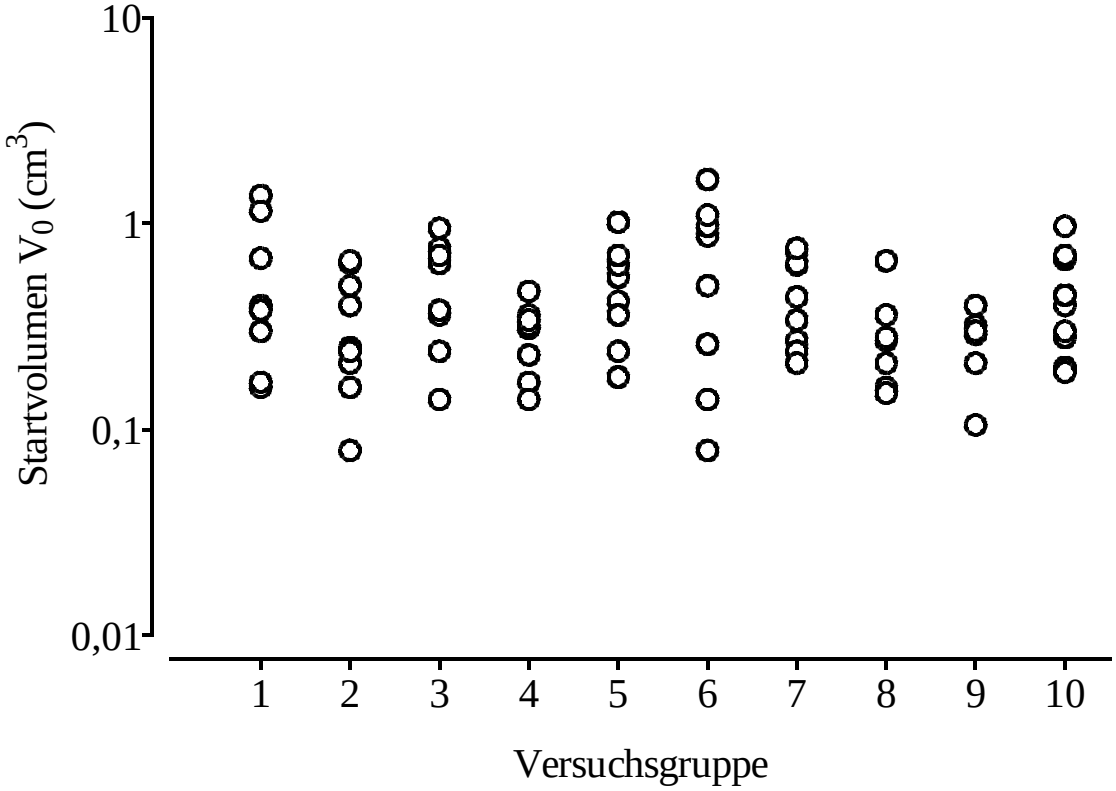


Abbildung 16: Streuung der Startvolumina. Die Zahlen auf der Abszisse bezeichnen die verschiedenen experimentellen und Standarddosisgruppen (Siehe Tabelle 2).

Versuchsgruppen

Schema	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
auf	67,5 Gy	75 Gy	82,5 Gy	90 Gy						
ab					67,5 Gy	75 Gy	82,5 Gy	90 Gy		
Standard									75 Gy	90 Gy

Tabelle 2: Legende für Abbildung 16.

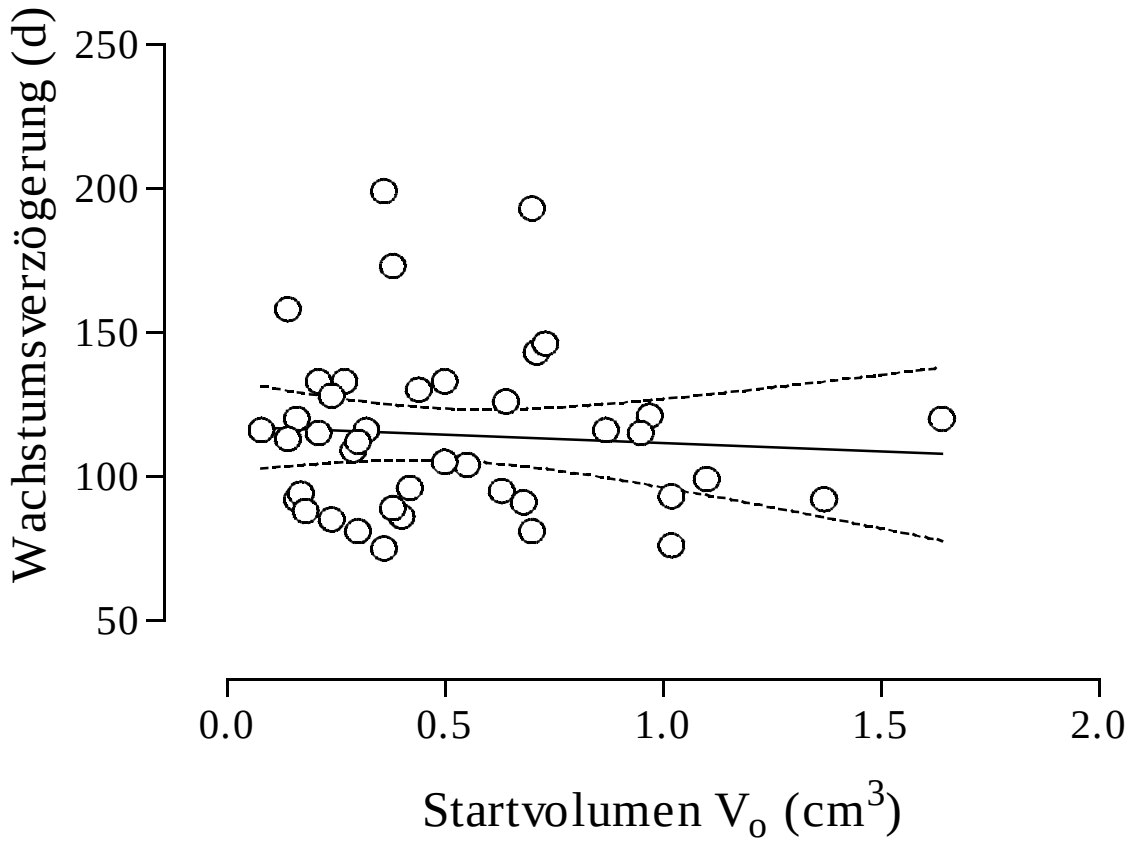


Abbildung 17: Streuung der Startvolumina in Bezug auf die GD. Die lineare Regression weicht kaum von Null ab, (p = 0,63), 95%-Vertrauensbereich (---).

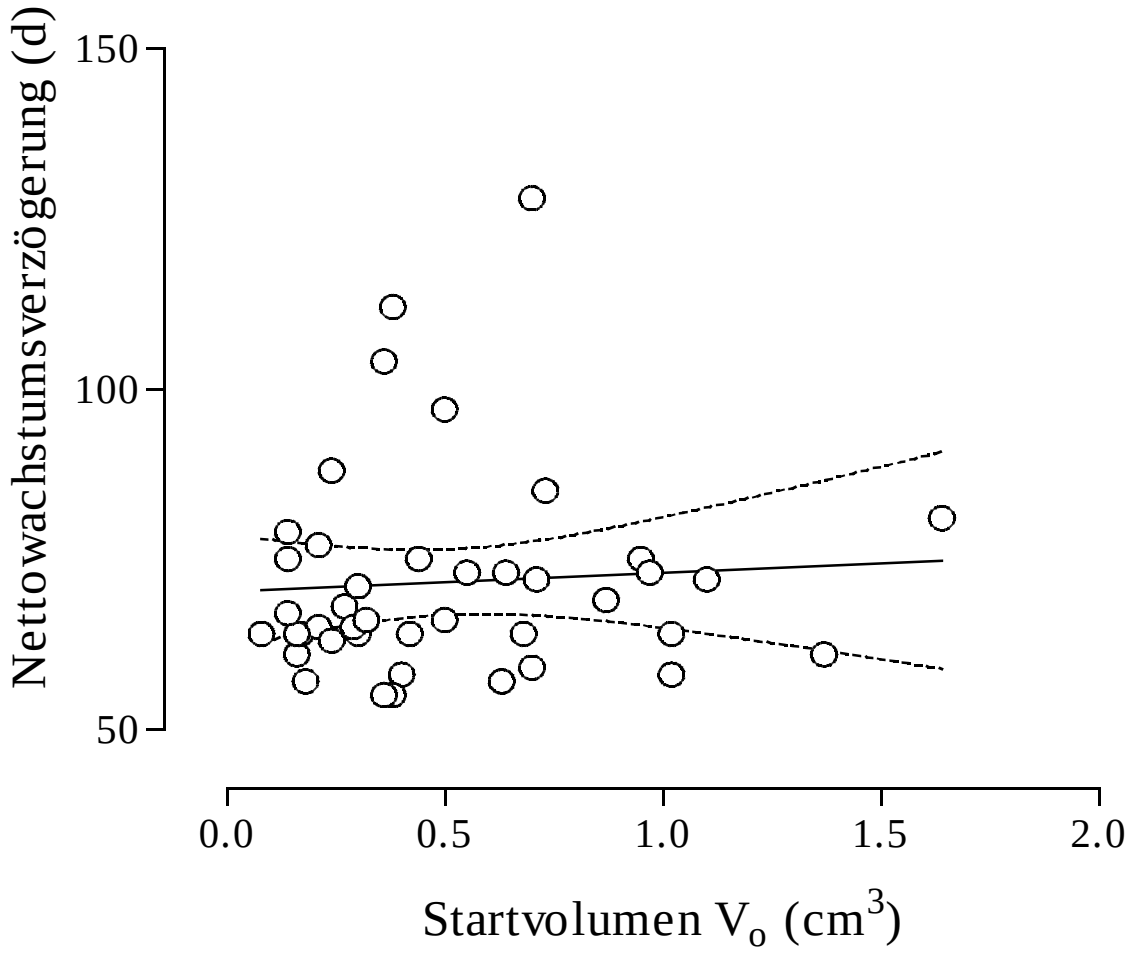


Abbildung 18: Streuung der Startvolumina in Bezug auf die NGD. Die lineare Regression weicht kaum von Null ab (p = 0,67), 95%-Vertrauensbereich (---).

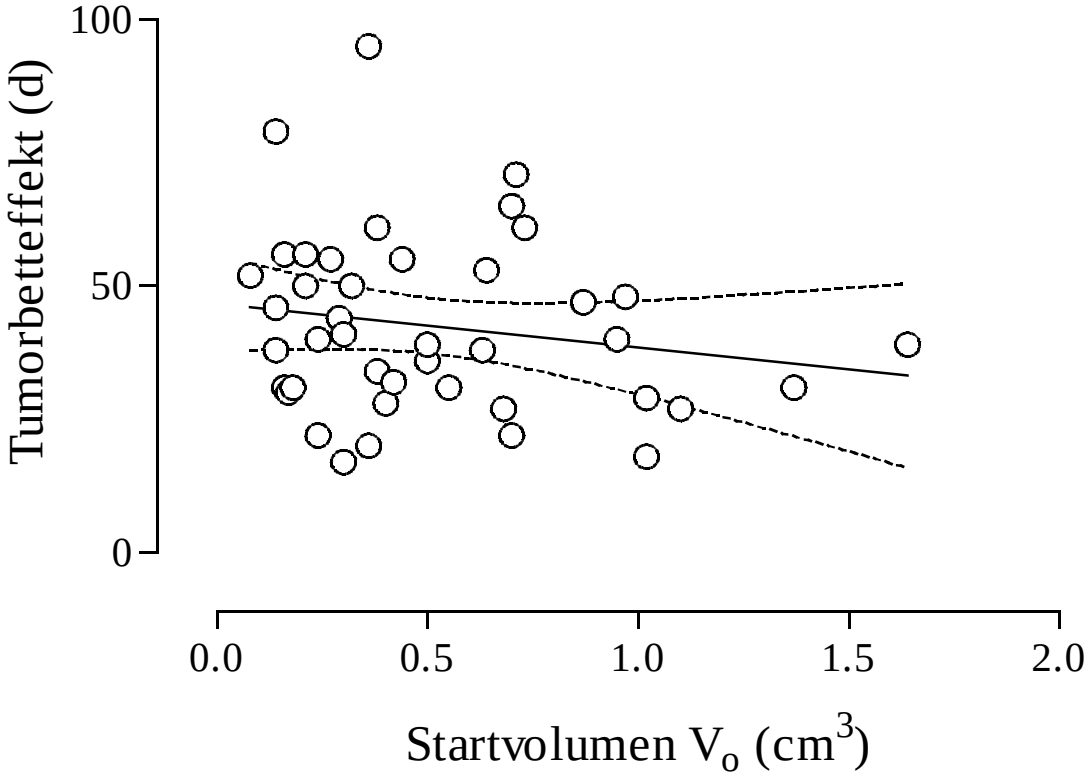


Abbildung 19: Streuung der Startvolumina in Bezug auf den TBE. Die lineare Regression weicht kaum von Null ab (p = 0,25), 95%-Vertrauensbereich (---)

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. $TCD_{37\%}$

Aus der Berechnung der $TCD_{37\%}$ ergibt sich, daß die beiden experimentellen Schemata im Rahmen des statistischen Meßfehlers isoeffektiv sind. Diese Ergebnisse zeigen, daß Zellzykluseffekte nicht in dem Maße zumtragen gekommen sind, denn sonst würden sich Unterschiede zwischen den experimentellen Schemata zeigen.

5.2. Lokale Heilungsraten

Die Ergebnisse der lokalen Heilungsraten bestätigen die der Netto-Wachstumsverzögerung. Eine Ausnahme bietet hier das aufsteigende Schema mit einer Gesamtdosis von 82,5 Gy. Hier finden sich keine lokalen Heilungsraten. Ob dieses Ergebnis durch Zellzykluseffekte verursacht worden ist, ist im Rahmen der statistischen Schwankungen fraglich, da sich in den niedrigeren Dosisgruppen zumindest ein leichter Unterschied hätte zeigen müssen. Die Ergebnisse sollten aber überprüft werden.

5.3. Wachstumskurven der Tumore

Die verschiedenen Zeitpunkte für das Erreichen von V_{min} können durch die unterschiedliche Zahl abgetöteter Tumorzellen erklärt werden. Je mehr Dosis appliziert wird, desto mehr Zellen werden abgetötet und desto mehr Zellen müssen von Makrophagen abgeräumt werden. Unter der Annahme konstanter Resorptionsraten für abgestorbene Zellen dauert die Resorptionsphase nach Bestrahlungsende bei größeren Dosen länger, entsprechend wird V_{min} später erreicht. Nach der Behandlung bleiben unterschiedlich viele klonogene Zellen übrig, die wieder aufwachsen können. Bei kleineren Dosen ist die entsprechende Zellzahl größer und der Tumor rezidiviert früher (Jung et al., 1990). Die deutliche Abflachung der Volumenkurve des Tumorrezidivs bei einer Gesamtdosis von 82,5 Gy wird durch den sogenannten Tumor-Bett-Effekt verursacht. Die den Tumor versorgenden Gefäße werden bei zunehmend höheren Dosen geschädigt und damit in ihrer Funktion eingeschränkt (Zywietz, 1990). Der Tumor wird schlechter mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Solange diese Gefäße geschädigt sind, wirkt sich dieser Umstand negativ auf das Tumorwachstum aus.

Nachdem sich die Gefäße erholt oder neu gebildet haben, steigt die Tumorwachstumskurve wieder steil an.

5.4. Wachstums-, Nettowachstumsverzögerung und Tumorbetteffekt

Die Ergebnisse der GD, NGD und TBE zeigen, daß bei der Aufspaltung der täglichen Dosis in zwei Fraktionen der Therapieerfolg nicht von der Standardtherapie abweicht. Die Applikation einer aufgeteilten Fraktion mit einem konstanten Zeitintervall von 3 h spielt keine entscheidende Rolle. Somit ergibt sich aus diesem Experiment, daß die experimentellen Schemata isoeffektiv im Rahmen des statistischen Meßfehlers in Bezug auf das Standardschema sind. Dies bedeutet, daß die verwendeten experimentellen Bestrahlungsschemata keinen potenzierenden Effekt auf die Dosiswirkung hatten, der durch eine erhöhte GD, NGD oder TBE sichtbar wäre. Die Ergebnisse zeigen aber auch, daß es zu keinem Dosiswirkungsverlust in Bezug auf das Standardschema gekommen ist, da die Bestrahlungsschemata untereinander isoeffektiv sind. Also müssen in den experimentellen Bestrahlungsschemata strahlenbiologische Mechanismen zum tragen gekommen sein, die das Zeitintervall in Bezug auf den Dosisverlust kompensiert haben. Zellzykluseffekte können nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse von Willers et al. (1997) zeigen, daß auch kleinste Unterschiede, die meßtechnisch nicht erfaßbar sind, sich im Verlauf einer fraktionierten Bestrahlung potenzieren können.

Der Einfluß der Reparatur auf das Überleben von Tumorzellen läßt sich aus den vorhandenen Ergebnissen nur schwer abschätzen. Allerdings ist zu vermuten, daß in einem Zeitintervall von nur 3 Stunden zwischen den Fraktionen Strahlenschäden repariert wurden, denn die experimentellen Bestrahlungsschemata sind genauso effektiv wie das Standardschema. Nach dem Reparaturmodell (Haynes, 1966; Alper, 1979; Goodhead, 1982; Dikomey & Franzke, 1986) hat die Reparatur von subletalen Strahlenschäden im Bereich, in dem keine Sättigung der Reparaturenzyme vorliegt, einen exponentiellen Verlauf.

In Bezug auf die Reoxygenierung sollte eine Verlängerung des Zeitintervalls auf drei Stunden einen geringeren Einfluß haben, als die Veränderung von einer Einzeldosis zu einer zweimal täglichen Behandlung mit einem Zeitintervall von drei Stunden. Eine Kompensation der Reparatur der subletalen Strahlenschäden durch eine Strahlensensibilisierung infolge einer verbesserte Sauerstoffversorgung in den Tumorzellen müßte also in diesem Zeitintervall auftreten, wenn man voraussetzt, daß sowohl Tumorzellen als auch Endothelzellen der Tumorgefäße einen ähnlich schnellen Reparaturmechanismus besitzen und die Reoxygenierung

von der Schonung der Gefäße abhängt. Die Annahme, daß Reoxygenierung in größerem Umfange unter der Therapie stattfände, beruht auf der Beobachtung des Tumorbetteffektes nach fraktionierter Bestrahlung (Becker, 1988). Aus der Schonung der Normalgewebe, zu denen auch die Endothelzellen der Gefäße gehören, schloß man auf eine erhöhte Reoxygenierung, die sich jedoch im Tumor nicht nachweisen läßt. Eine durch die Wachstumsgeschwindigkeit des Rezidives lange nach Behandlungsende beurteilte Endothelschonung durch eine Erhöhung der Anzahl der Fraktionen läßt einen gewissen Rückschluß auf den Grad der Reoxygenierung während der Behandlung zu. Der Grad der Reoxygenierung der Tumore in diesem Experiment läßt sich nur schwer abschätzen, da das Ausmaß der Reoxygenierung bei experimentellen tierischen Tumoren stark schwanken kann. Ebenso ist die zeitliche Dimension der Reoxygenierung nur ungenau feststellbar, da sie auch von Tumorsystem zu Tumorsystem schwankt (Rockwell et al., 1985).

Die Ergebnisse von Willers et al. (1997) zeigen erst bei höheren Dosen pro Fraktion einen deutlichen Zellzykluseffekt. Somit stellt sich im Zusammenhang mit den gewählten Dosen dieser Arbeit die Frage, ob Zellzykluseffekte bei diesen hier verwendeten Dosen noch nicht beobachtet werden konnten. Der Hinweis von Willers et al. (1997) in Bezug auf die Potenzierung kleinster nicht meßbarer Unterschiede im Verlauf einer Bestrahlung muß auch in Bezug auf Zellzykluseffekte berücksichtigt werden.

Im Rahmen der Meßfehler konnte kein nennenswerter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Bestrahlungsschemata gefunden werden. Wenn Zellzykluseffekte eine wesentliche Rolle spielen würden, dann hätte sich dies in einem deutlichen Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Behandlungen niederschlagen sollen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen somit darauf hin, daß Zellzykluseffekte bei einer sechswöchigen fraktionierten Bestrahlung unter ambienten Bedingungen bei diesem Tumormodell eine untergeordnete Rolle spielen. Der von Kleineidam (1990) beobachtete Einfluß des Zeitintervalls zwischen den Bestrahlungen auf das Therapieergebnis scheint primär durch die Reoxygenierung bedingt zu sein.

6. Zusammenfassung

Zur Optimierung einer Strahlentherapie von Tumoren wurde u.a. versucht, die unterschiedliche Strahlensensibilität von Tumorzellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu nutzen. Diese Dissertation untersucht die Fragestellung, ob die Ergebnisse einer anderen Dissertation (Kleineidam, 1990) durch Zellzykluseffekte zu erklären sind. Zu diesem Zweck wurde ein Bestrahlungskonzept erstellt, das den Umstand berücksichtigt, daß Zellzykluseffekte sowohl dosis- als auch zeitabhängig sind. Es wurde die Wachstumstendenz von subkutanen Tumoren unter und nach externer Bestrahlung untersucht. Als Gesamtdosen im experimentellen Teil wurden 67,5 , 75, 82,5 , und in einem Nachfolgeexperiment 90 Gy gewählt. Die Gesamtdosen im Standardteil betrugen 75 und 90 Gy. Die tägliche Dosis pro Fraktion im experimentellen Teil wurde in einen 1/3- und einen 2/3-Anteil aufgeteilt. Die unterschiedlichen Anteile wurden in einem konstanten Zeitabstand von 3 Stunden appliziert. In dem einen Versuchsarm wurde zuerst der kleinere Anteil, drei Stunden später der größere Anteil appliziert. In einem zweiten Versuchsarm wurde umgekehrt vorgegangen. Im Standardversuchsteil wurde täglich nur einmal mit einer Fraktion bestrahlt. Durch die unterschiedliche Größenverteilung der aufgeteilten Fraktionen bei konstantem Zeitintervall wurde versucht, die Dosisabhängigkeit der Zellzykluseffekte zu nutzen. Die Ergebnisse der subkutan wachsenden Tumore zeigen im Hinblick auf die untersuchten Parameter Wachstumsverzögerung (GD), Nettowachstums-verzögerung (NGD), lokale Tumorkontrolldosis 37% ($TCD_{37\%}$), Tumorbetteffekt (TBE) und lokale Tumorkontrolle (LC) keine signifikanten Unterschiede durch die angewandten experimentellen Bestrahlungsschemata im Hinblick auf ein Standardbestrahlungsschema. Unter Berücksichtigung anderer Ergebnisse (Willers et al., 1997) läßt sich vermuten, daß in den gewählten Dosisbereichen Zellzykluseffekte noch nicht zu beobachten sind oder das Zeitintervall kompensieren. Als weiterer Mechanismus für die Erklärung der Ergebnisse von Kleineidamm (1990) kommt die Reoxygenierung in Betracht, die weiter untersucht werden sollte.

7. Literatur

Alper T (1979) Cellular Radiobiology. University Press, Cambridge

Barendsen GW, Broerse JJ (1969) Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV X-rays. I. Effects of single exposures. Europ J Cancer 5:373-377

Bartelink H (1983) Prognostic value of the regression rate of neck node metastases during radiotherapy.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 9:993-996

Baumann M, Taghian A, Budach W (1993) Radiosensitivity of tumor cells: The predictive value of SF2. In: Beck-Bornholdt, HP (ed) Medical radiology: Current topics in clinical radiobiology of tumours. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 87-98

Beck HP (1978) A new analytical method for determining duration of phases, rate of DNA synthesis and degree of synchronization from flow-cytometric data on synchronized cell populations.
Cell Tissue Kinet 11:139-148

Beck HP, Omniczynski M (1980) Comparison of the applicability of flow cytometry and autoradiography for cell kinetic studies. Radiotoxic effects of incorporated 3H-thymidine and tumour response to irradiation. In: Laerum OD, Lindmo T, Thorud E (eds) Flow Cytometry IV. Universitetsforlaget, Oslo, p 327

Beck-Bornholdt, HP (1998) Strahlenbiologische Grundlagen: II. Biologische Wirkung der Dosis-Fraktionierung. In: Jung, H. Grundkurs im Strahlenschutz für Ärzte nach der Röntgenverordung.
Ärztekammer Hamburg, Hamburg.

Beck-Bornholdt HP, Würschmidt F, Vogler H (1987) Net growth delay: A novel parameter derived from tumor growth curves.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 13:773-777

Becker S (1988) Experimentelle Strahlentherapie des Rhabdomyosarkoms R1H der Ratte: Einfluss der Anzahl der Fraktionen und der Gesamtbehandlungszeit auf Tumorparenchym und Stroma. Med. Dissertation. Universität Hamburg

Bernier J, Batani JP (1986) Regional outcome in oropharyngeal and pharyngeal cancer treated with high dose per fraction radiotherapy. Analysis of neck disease response in 1646 cases.
Radiother Oncol 6:87-103

Burek JD (1978) Pathology of aging rats. CRC Press, West Palm Beach, Florida.

Denekamp J (1973) Changes in the rate of repopulation during multifractionation irradiation in mouse skin. Br J Radiol 46:381-387

Denekamp J (1977) Tumour regression as a guide to prognosis: A study with experimental animals. Br J Radiol 50:271-279

Dikomey E, Franzke J (1986) Three classes of DNA strand breaks induced by x-irradiation and internal beta-rays.
Int J Radiat Oncol Biol Phys 5:893-908

Dische S, Saunders MI (1980) Tumor regression and prognosis: A clinical study. Br J Cancer 41 (Suppl 4):11-13

Dörr W, Kummermehr J (1990) Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiations or following single doses. Radiother Oncol 17:249-254

Embelton MJ (1987) How to determine tumour immunogenicity In: Kallman RF (ed) Rodent tumor models in experimental cancer therapy. Pergamon Press

Goodhead DT (1982) An assessment of the role of microdosimetry in radiobiology. Radiat Res 1:45-76

Hall EJ (1994) Radiobiology for the Radiologist. J.B. Lippincott Company

Haynes (1966) The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena. Radiat Res Suppl 6:1-29

Herrmann T, Baummann M (1997) Klinische Strahlenbiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm

Hermens AF, Barendsen GW (1969) Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after X-irradiation. Eur J Cancer 5:173-189

Herold G (1997) Innere Medizin. Köln

Hewitt HB (1958) Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice. Br J Cancer 12:378-401

Hong JH, Chen MS, Lin FJ, Tang SG (1992) Prognostic assessment of tumor regression after external irradiation for cervical cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 22:913-917

Johnson R, Fowler JF, Zanelli GD (1976) Changes in mouse blood pressure, tumor blood flow, and core and tumor temperatures following Nembutal or Urethane anaesthesia. Radiology 118:697-703

Jung H, Beck HP, Brammer I, Zywietz F (1980) Factors contributing to tumour growth after irradiation. Br J Cancer 41:226-229

Jung H, Beck HP, Brammer I, Zywietz F (1981) Depopulation and repopulation of the R1H rhabdomyosarkoma of the rat after X-irradiation. Europ J Cancer 17:375

Jung H, Krüger HJ, Beck-Bornholdt HP (1990) Cell population kinetics of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat after single doses of X-rays. Int J Radiat Biol 57:567-589

Kal HB (1973) Proliferation behavior of P and Q cells in a rat rhabdomyosarcoma after irradiation as determined by DNA measurements. Europ J Cancer 9:753

Kal HB, Gaiser JF (1980) The effect of anaesthesia on the radiosensitivity of rat intestine, foot skin, and R-1 tumors. Int J Radiat Biol 37:447-450

Kal HB, van Berkel AH (1988) Responsivness of subcutaneously and intrapulmonarily growing rat bronchial carcinomas to a dose of 20 Gy. Vortrag, 7th Annual Meeting ESTRO, Den Haag, 1988.

Kellerer AM, Rossi HH (1972) The theory of dual radiation action. Curr. Top. Rad. Res. Q. 8:85-97

Kleineidam M (1990) Strahlentherapie des R1H-Tumors: Der Einfluß des Zeitintervalls zwischen den beiden täglichen Fraktionen einer hyperfraktionierten Behandlung auf Tumorparenchym, Tumorstroma und Haut. Med. Dissertation, Universität Hamburg

Kreyszig E (1972) Statistische Methoden und ihre Anwendung. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen

Maciejewski B (1987) Regression rate of metastatic neck lymph nodes after radiation treatment as a prognostic factor for local control. Radiother Oncol 8:301-308

Menke H, Vaupel P (1988) Effect of injectable or inhalational anesthetics and neuroleptic, neuroleptanalgesic, and sedative agents on tumor blood flow. Radiat Res 114:64-76

Pentland AP, Mahoney M, Jacobs SC, Holtzman MJ (1990) Enhanced prostaglandin synthesis after ultraviolett injury is mediated by endogenous histamine stimulation. A mechanism for irradiation erythema. J Clin Invest 86:566-574

Press WH, Flannery BP, Teukolsky SA, Vetterling WT (1986) Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, Cambridge

Reinhold HS (1965) A cell dispersion technique for use in quantitative transplantation studies with solid tumors. Europ J Cancer 1:67-71

Riede UN, Schaefer HE, Wehner H (1989) Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, Stuttgart

Rockwell S, Moulder JE (1985) Biological factors of importance in splitt-course radiotherapy. In: Paliwal BR, Herbert DE, Orton CG (eds): Optimization of Cancer Radiotherapy, pp 171 - 182. New York, American Institut of Physics.

Shibamoto Y, Sasai K, Abe M (1987) The radiation response of SCCVII Tumor cells in C3H/He mice varies with the irradiation conditions. Radiat Res 109:352-354

Sobel S, Rubin P, Keller B, Poulter C (1976) Tumor persistence as a predictor of outcome after radiation therapy of head and neck cancers. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1:873-880

Steel GG (1977) Growth kinetics of tumors. Clarendon Press, Oxford

Steel GG (1993) The radiobiology of tumours. In: Steel GG Basic clinical radiobiology. Edward Arnold, pp 108-119

Steel GG, Adams K (1975) Stem-cell survival and tumor control in the Lewis lung carcinoma. Cancer Res 35:1530-1535

Stephens TC, Currie GA, Peacock JH (1978) Repopulation of gamma-irradiated Lewis lung carcinoma by malignant cells and host macrophage progenitors. Cancer 38:573-582

Terry N, Pollack A, Cao S, Meistrich M, White R (1993) A method to measure recruitment of previously quiscent cells in murine tumors after irradiation. Proceedings of the 41st Annual Meeting of the Radiation Research Society: 153

Thames HD, Hendry JH (1987) Fractionation in radiotherapy. Taylor & Francis, London New York Philadelphia.

Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A (1990) Introduction to radiobiology. Taylor & Francis, London New York Philadelphia.

Vogler H (1986) Zelluläre Inaktivierungskinetik beim Rhabdomyosarkom R1H der Ratte während fraktionierter Röntgenbestrahlung. Med. Dissertation, Universität Hamburg.

Willers H (1994) Der Einfluß des Zeitfaktors auf die Ergebnisse der Röntgen-therapie maligner Tumoren. Literaturauswertung unter besonderer Berücksichtigung der Veröffentlichungen in der Zeitschrift „Strahlentherapie“ von 1919 bis 1939. Med. Dissertation, Universität Hamburg.

Willers H, Prosch B, Beck-Bornholdt HP (1997) Impact of the interfraction interval on clonogenic cell survival in split-dose irradiation of R1H rhabdomyosarcoma of the rat in vitro. Radiother Oncol 43:93-96

Withers HR (1974) The 4 R´s of radiotherapy. In: Lett JT & Adler H (eds) Advances in Radiation Biology, Vol. 5, New York

Zanelli GD, Lucas PB, Fowler JF (1975) The effect of anaesthetics on blood perfusion in transplantated mouse tumors. Br J Cancer 32:380-390

Zywietz F (1990) Vascular and cellular damage in a murine tumour during fractionated treatment with radiation and hyperthermia.
Strahlenther Onkol 7:493-501

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Jung für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation und Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Beck-Bornholdt für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die ausgezeichnete Betreuung sowie für die über diese Arbeit hinausgehenden Hilfen und anregenden Gespräche.

Bedanken möchte ich mich weiterhin namentlich bei Frau Maria Omniczynski für die Tumortransplantation und die Begleitung der Experimente, den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Beck-Bornholdt: PD Dr. Michael Baumann, Dr. Hans-Herrmann Dubben, Dr. Annette Raabe, Frank Rosbiegal, Kirsten Horn und Sylvai Quaester für ihre Unterstützung und Diskussion sowie bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biophysik und Strahlenbiologie für die freundliche Aufnahme.

Itzehoe, im November 2000

9. Lebenslauf

Name:	Manuel Rett
Geburtsdatum:	27. Oktober 1968
Geburtsort:	Bad Oldesloe

Schulausbildung

1975 - 1977	Grundschule Ahrensburg
1977 - 1979	Grundschule Bad Oldesloe
1979 - 1986	Gymnasium Bad Oldesloe
1986 - 1988	Gymnasium Brunsbüttel
Mai 1988 Abitur	

Zivildienst

1988 – 1990	Kreiskrankenhaus Wedel

Berufsausbildung

1990 - 1997	Studium Humanmedizin Universität Hamburg
1992	Physikum
1993	1. Staatsexamen
1996	2. Staatsexamen
1996 - 1997	Praktisches Jahr
1997	3. Staatsexamen
1997 - 1999	Arzt im Praktikum im Perinatalzentrum Altona / Intensivstation, Kinderkrankenhaus Altona
seit 1999	Assistenzarzt zur Weiterbildung im Fach Pädiatrie im Altonaer Kinderkrankenhaus

10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig 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, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

_____